

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie

**Untersuchungen zur intratumoralen Heterogenität
der Genexpression beim Adenokarzinom des Ösophagus**

Philipp Sebastian Ewald

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. Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler
2. Priv.-Doz. Dr. M. Bauer (schriftl. Beurteilung)
3. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitingner (mündl. Prüfung)

Die Dissertation wurde am 12.10.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2011 angenommen.

gewidmet meiner geliebten Freundin Sanja Brandt und
meinen Eltern Petra und Christian sowie meinem Bruder Fabian

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	7
1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Adenokarzinoms des Ösophagus	7
1.2 Klassifikation und Pathogenese	8
1.3 Diagnostik und Therapie	11
1.3.1 Chirurgische und minimal invasive Therapie	12
1.3.2 Multimodale Therapie	13
1.4 Responseprädiktion	16
1.5 Molekulargenetische intratumorale Heterogenität	17
1.6 Zielsetzung der Arbeit	18
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Gewebematerial und Patientenkollektiv	19
2.2 Methoden	19
2.2.1 Herstellung der histologischen Präparate	19
2.2.2 Entparaffinierung und Mikrodisektion	22
2.2.3 Durchführung der RNA- Extraktion aus mikrodiseziertem Gewebe	23
2.2.4 Quantitative Real Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR)	24
2.2.4.1 cDNA-Synthese	24
2.2.4.2 Grundlagen der Real Time RT-PCR	26
2.2.4.3 Praktische Durchführung der Real Time RT-PCR	29
2.2.4.4 Prinzip der Berechnung der relativen Genexpression	33
2.2.4.5 Erstellung der relativen Standardkurven mithilfe eines Kalibrators	34
2.2.4.6 Durchführung der statistischen Auswertung	37

3. ERGEBNISSE	39
3.1 Statistik	39
3.2 Ergebnisse	40
3.2.1 Caldesmon	40
3.2.1.1 Intratumorale Heterogenität	40
3.2.1.2 Intertumorale Heterogenität	41
3.2.1.3 Korrelation von Tumor und PE	41
3.2.2 DPD	42
3.2.2.1 Intratumorale Heterogenität	42
3.2.2.2 Intertumorale Heterogenität	44
3.2.2.3 Korrelation von Tumor und PE	44
3.2.3 ERCC4	45
3.2.3.1 Intratumorale Heterogenität	45
3.2.3.2 Intertumorale Heterogenität	46
3.2.3.3 Korrelation von Tumor und PE	46
3.2.4 Her2-/neu	47
3.2.4.1 Intratumorale Heterogenität	47
3.2.4.2 Intertumorale Heterogenität	49
3.2.4.3 Korrelation von Tumor und PE	49
3.2.5 MRP1	50
3.2.5.1 Intratumorale Heterogenität	50
3.2.5.2 Intertumorale Heterogenität	51
3.2.5.3 Korrelation von Tumor und PE	52
3.2.6 MTHFR	52
3.2.6.1 Intratumorale Heterogenität	52
3.2.6.2 Intertumorale Heterogenität	54
3.2.6.3 Korrelation von Tumor und PE	54

3.2.7 TP	55
3.2.7.1 Intratumorale Heterogenität	55
3.2.7.2 Intertumorale Heterogenität	56
3.2.7.3 Korrelation von Tumor und PE	57
3.3 Tabellen der Rohdaten	58
4. DISKUSSION	60
4.1 Kurzpräsentation der Ergebnisse	60
4.2 Hintergrund der Themenstellung	62
4.2.1 Biomarker prädiktiver Responseuntersuchungen	62
4.2.2 Intratumorale Heterogenität	68
4.3 Diskussion der Methoden	72
4.4 Diskussion der Ergebnisse	75
4.5 Schlussfolgerung und Fazit	79
5. ZUSAMMENFASSUNG	83
6. LITERATURVERZEICHNIS	86
7. ANHANG	108
7.1 Abkürzungsverzeichnis	108
7.2 Materialien	109
7.2.1 Allgemeine Gebrauchsgegenstände	109
7.2.2 Lösungen und Reagenzien	110
7.3 Standardkurven	113
7.4 Lebenslauf	116
8. DANKSAGUNG	117

Diese Arbeit entstand im Rahmen eines Promotionsvorhabens von Philipp Sebastian Ewald, geboren 11.07.1979, am Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert im Clinical Cancer Research und American Journal of Pathology:

Langer, R., Specht, K., Becker, K., Ewald, P., Bekesch, M., Sarbia, M., Busch, R., Feith, M., Stein, H.J., Siewert, J.R., Höfler, H. **Association of pretherapeutic expression of chemotherapy-related genes with response to neoadjuvant chemotherapy in Barrett carcinoma.** Clin Cancer Res. 11 (2005) 7462 – 7469

Langer, R., Specht, K., Becker, K., Ewald, P., Ott, K., Lordick, F., Siewert, J.R., Höfler, H. **Comparison of pretherapeutic and posttherapeutic expression levels of chemotherapy-associated genes in adenocarcinomas of the esophagus treated by 5-fluorouracil- and cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy.** Am. J. Clin. Pathol. 128 (2007) 191 – 197.

1. EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Adenokarzinoms des Ösophagus

Das Adenokarzinom des Ösophagus stellt eine Erkrankung der westlichen Industrienationen dar (Pera M et al., 2000, 2005). Inzidenz und Prävalenz haben hier in den letzten Jahrzehnten rapide zugenommen, mehr als die jedes anderen Malignoms in der westlichen Welt (DeMeester SR, 2006, 2009; Corley DA et al., 2008). Mittlerweile ist das Adenokarzinom des Ösophagus in diesen Ländern bereits die siebthäufigste krebsbezogene Todesursache (Jemal A et al., 2009) und übertrifft in Großbritannien sowie in der kaukasischen Bevölkerung Amerikas bereits die Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms der Speiseröhre (DeMeester SR 2009; Bollschweiler E et al., 2001; Vizcaino AP et al., 2002). Die Gründe für die enorme Steigerung der Inzidenz verbleiben letztlich unklar.

Während für die Entwicklung des Plattenepithelkarzinoms der Speiseröhre neben weiteren anderen Risikofaktoren ein direkter Zusammenhang mit exogenen Noxen wie Alkohol, Nikotin und Verzehr Nitrosamin-haltiger Nahrungsmittel sowie ein niedriger sozial-ökonomischer Status zu Grunde gelegt wird, konnten diese Risikofaktoren für Adenokarzinome nicht eindeutig nachgewiesen werden (Lagergren J et al., 2005). Eine fettreiche Ernährung sowie das Vorliegen einer insbesondere abdominalen Adipositas (Kubo A et al., 2009; Corley DA et al., 2007, 2008; Edelstein ZR et al., 2007; Lagergren J et al., 2005; Hampel H et al., 2005) scheinen in der Pathogenese des Adenokarzinoms des Ösophagus über Begünstigung einer gastroösophagealen Refluxkrankheit (GERD) und Entstehung eines Barrett-Ösophagus indirekt beteiligt zu sein. Eine ausreichende Zufuhr an Antioxidanzien, insbesondere Vitamin C, (Fountoulakis A et al., 2004; Dong LM et al., 2008; Kubo A et al., 2009) sowie eine ballaststoffreiche Ernährung (Mayne ST et al., 2001), scheinen protektiv der Entwicklung eines Adenokarzinoms des Ösophagus entgegen zu wirken.

Ein direkter kausaler Zusammenhang in der Pathogenese des Adenokarzinoms des Ösophagus konnte für das Vorliegen eines Barrett-Ösophagus und der gastroösophagealen Refluxerkrankung (GERD) (Lagergren J, 1999, 2005; Carneiro F et al., 2006) sowie in neueren Studien auch für den Tabakkonsum (Carneiro F et al., 2006) aufgezeigt werden. Anhand prospektiver Langzeitbeobachtungsstudien konnte nachgewiesen werden, dass bei Patienten mit einem Barrett-Ösophagus im

Vergleich zur Normalbevölkerung ein zirka 30 bis 125mal höheres Risiko für die Entwicklung eines Adenokarzinoms des Ösophagus besteht (Altorki NK et al., 1997; Tytgat GNJ, 1995). Etwa 0,5 bis 1 Prozent der Patienten mit einem Barrett-Ösophagus entwickeln pro Jahr ein Adenokarzinom (Basu KK, et al., 2002).

Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Diagnose liegt beim Adenokarzinom bei zirka 63 Jahren (Zimmermann F et al., 2006) und damit etwa 10 Jahre höher als beim Plattenepithelkarzinom. Epidemiologischen Studien zu Folge tritt der überwiegende Anteil aller Adenokarzinome des Ösophagus bei weißen Männern auf, wobei die geschlechterspezifische Verteilung zirka 5-7:1 beträgt (Powell J et al., 2002; Vizcaino AP et al., 2002). Für Gesamtdeutschland weist das Robert Koch-Institut in der Todesursachenstatistik für die Jahre 2003 - 2004 einen Anteil an Ösophaguskarzinomen (Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome) von 3,1 Prozent für Männer und 1,1 Prozent für Frauen in Bezug auf alle bösartigen Neubildungen aus (Robert Koch-Institut, 2008).

1.2 Klassifikation und Pathogenese

Das Adenokarzinom des distalen Ösophagus, nach dem englischen Chirurg Norman Barrett auch als Barrettkarzinom bezeichnet, wird entsprechend der Empfehlung der International Gastric Cancer Association und International Society for Diseases of the Esophagus anhand einer von J. R. Siewert vorgeschlagenen Definition, welche im Areal von 5 cm oral bis 5 cm aboral der anatomischen Cardia nach anatomischer Lokalisation des Tumorzentrums drei Tumorentitäten klar voneinander differenziert, als AEG Typ I eingeteilt (Siewert JR et al., 2005, 2006).

Die Klassifikation der Eindringtiefe des Primärtumors, Lymphknotenmetastasierung und Vorliegen von Fernmetastasen erfolgt anhand von Richtlinien der UICC, welche 2010 erstmals eine eigene Klassifikation der Tumoren des gastroösophagealen Übergangs beinhaltet (Sobin LH et al., 2010). Der Tumorwachstumstyp nach Lauren weist beim Adenokarzinom des Ösophagus in etwa 80% der Fälle einen intestinalen Typ auf (Stein H et al., 2006).

In annähernd 100 Prozent der Fälle besteht beim Adenokarzinom des Ösophagus eine Korrelation mit einer intestinalen Epithelmetaplasie (Theisen J et al., 2006; Chandrasoma P et al., 2007), bestehend aus einschichtigen Zylinderepithel mit Becherzellen, welches auch als spezialisiertes Epithel vom intestinalen Typ

bezeichnet wird (Goldblum JR, 2003) und im distalen Ösophagus auf dem Boden eines chronischen duodeno-gastro-ösophagealen Reflux entsteht und bei einer Ausdehnung von über 3 cm (bzw. 2 cm) als klassischer Barrett-Ösophagus (Skinner DB et al., 1983) oder auch Long-Segment-Barrett-Ösophagus (LSBE) bezeichnet wird. Dieser weist im Vergleich zum Short-Segment-Barrett-Ösophagus (SSBE) ein deutlich höheres Risiko für die Entstehung eines Adenokarzinoms des Ösophagus auf (Weston AP et al., 1997; Thomas T et al., 2007).

Die Pathogenese des Barrett-Ösophagus ist noch immer nicht im Detail geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass der Metaplasie eine DNA-Schädigung des normalen Plattenepithels des distalen Ösophagus als Komplikation auf dem Boden einer chronischen Entzündungsreaktion durch einen unphysiologischen duodeno-gastro-ösophagealen Reflux zugrunde liegt, und in deren Verlauf pluripotente Stammzellen, mutmaßlich von Epithelzellen ösophagealer Drüsenausführungsgänge (Leedham SJ et al., 2008), in eine ungeschützte oberflächliche Position kommen, in der sie den Noxen direkt ausgesetzt sind (Jankowski JA et al., 1999; Atherfold PA et al., 2006). Dies spiegelt sich in einer Überexpression entsprechender Gene, z.B. COX -2, dem über eine Expression modulatorischer Gene der Angiogenese und Lymphangiogenese bzw. des anti-apoptotischen Proteins bcl-2 eine Bedeutung in der Pathogenese des Adenokarzinoms des Ösophagus zugeschrieben wird, wider (Shirvani VN et al., 2000; von Rahden BH et al., 2005; Shimizu D et al., 2006). Neben sporadisch beobachteten familiären Häufungen (Groves C et al., 2005) stellt der Barrett-Ösophagus in der Regel somit eine erworbene Kondition dar.

Die gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD) ist ein starker Risikofaktor sowohl für die Entwicklung eines Barrett-Ösophagus als auch für die Entstehung eines Adenokarzinoms des Ösophagus. Etwa 10 Prozent der Patienten mit chronischer Refluxösophagitis entwickeln im Verlauf einen Barrett-Ösophagus. Neben der Dauer der Refluxepisoden sowie einer Dysfunktion des Tonus des unteren Ösophagussphinkters, welche mit einer gestörten Selbstreinigungsfunktion einhergeht (Dent J, 1998; Holloway RH et al., 1995), wobei ein prädisponierender Faktor für eine Insuffizienz des unteren Ösophagussphinkters das Vorliegen einer Hiatushernie zu sein scheint, und eine positive Korrelation zwischen der Größe der Hernie und dem Sphinktertonus sowie dem damit verbundenen Ausmaß des Reflux nachgewiesen werden konnte (Campos GM et al., 2001; Avidan B et al., 2002), wird biliärem Reflux, insbesondere in Kombination mit Magensäure und somit pH-Wert-

abhängig, eine entscheidende pathogenetische Bedeutung beigemessen (Campos GM et al., 2001; Oberg S et al., 2000; Shirvani VN et al., 2000; DeMeester TR, 2001; Theisen J et al., 2005; Kaur BS et al., 2000). So konnten zytotoxische Schäden durch Gallensalze in einem Tiermodell nachgewiesen werden (Chen X et al., 2000). Die Zusammensetzung des Refluxates weist große interindividuelle Unterschiede auf und kann oro-ösophageale (Speichel, ösophageale Sekrete, Nahrungsbestandteile), gastrische (Magensäure, Pepsin, Mukus) und duodenale (Gallensalze, Trypsin, Cholesterin, Lipase) Komponenten enthalten (Gutschow CA et al., 2002), welche in verschiedenen Entwicklungsphasen der Pathogenese eine Rolle spielen können (Tobey NA et al., 2001; Jankowski JA et al., 2000). Darüber hinaus wird auch Gastrin ein mitogenes Potential in der Barrettmukosa zugeschrieben (Haigh CR et al., 2003). Eine infektiöse Genese, insbesondere durch *Helicobacter pylori*, erscheint unwahrscheinlich (Weston AP et al., 2000). Für zytotoxische (CagA+) Stämme gibt es sogar Hinweise, protektiv der Entstehung von Refluxkrankheit, Barrett-Ösophagus und Adenokarzinom des distalen Ösophagus entgegen zu wirken (Ye W et al., 2004; Corley DA et al., 2008).

Die Karzinogenese des Adenokarzinoms des Ösophagus erfolgt schrittweise über eine zunehmende genomische Instabilität mit Abnormalitäten im Zellzyklus, ein Auftreten von aneuploiden Zellfraktionen und eine Progression mit fließenden Übergängen einer LGIN über eine HGIN bis hin zum invasiven Karzinom, begleitet von einer sequentiellen Anhäufung diverser genetischer Alterationen (Fléjou JF 2005; Atherfold PA et al., 2006), so dass eine Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz postuliert wurde (Fléjou JF, 2005). Im Allgemeinen werden für die Genese maligner Zellen genotypische Veränderungen verantwortlich gemacht, welche die Unabhängigkeit von äußeren Wachstumssignalen, die Resistenz gegenüber Wachstumsinhibitoren und Apoptoseinduktoren, Angiogenese, Gewebsinvasion und Metastasierung bedingen (Hanahan D et al., 2000).

Während der Karzinogenese werden Allelverluste (LOH) relevanter Genloki (Walch A et al., 2000), Mikrosatelliteninstabilität und Genamplifikationen, z.B. durch Promotor-Hypermethylierung, welche zu einer verminderten Expression Zellzyklus-regulierender bzw. Differenzierungs-assoziiierter Gene wie z.B. den Tumorsuppressorgenen p53, p16 und APC und den Onkogenen K-ras, cyclin D1, c-erb-2 (Kimchi ET et al., 2005; Helm J et al., 2005) bzw. zu einer Überexpression von Apoptose verhindernden und proliferationsfördernden Genen (Whittles CE et al.,

1999) wie z.B. das zur Familie der Apoptose-Inhibitoren zugehörige Survivin, das auch als potentieller Biomarker für die Entwicklung eines Adenokarzinoms (Vallböhmer D et al., 2005) und bei Überexpression mit einer Prognoseverbesserung radiochemotherapierter Adenokarzinome des Ösophagus gilt (Warnecke-Eberz U et al., 2005), beobachtet. Spezifische genetische und epigenetische Alterationen konnten jedoch bislang keiner genauen zeitlichen Abfolge in der Karzinogenese zugeordnet werden. Es liegen lediglich Hinweise für früh bzw. spät eintretende molekulargenetische Ereignisse vor (Feagins LA et al., 2005). Bislang gibt es bis auf die Bestimmung des Proliferationsmarkers Ki-67 (Hong MK et al., 1995) und dem Nachweis einer Aneuploidie mittels Durchflusszytometrie als Hinweis für eine genomische Instabilität (Rabinovitch PS et al., 2001) keine validen molekularbiologischen Marker zur Früherkennung bzw. Selektion tumorgefährdeter Patienten. Lediglich der histologische Nachweis einer intraepithelialen Neoplasie (LGIN, HGIN) ist Prognose- und Therapie- entscheidend (Fléjou JF, 2005; Oberg S et al., 2005; Hennig EE et al., 2008; Jankowski JA et al., 2009).

1.3 Diagnostik und Therapie

Wie für alle bösartigen Tumoren gilt auch für das Adenokarzinom des Ösophagus, dass mit früherer Diagnose eine günstigere Prognose besteht. Im Gegensatz zu Hoch-Inzidenzgebieten stehen in Deutschland auf Grund der relativen Seltenheit des Adenokarzinoms des Ösophagus Aufwand und Effektivität von Screeninguntersuchungen jedoch in keinem vertretbaren Kosten-Nutzen-Verhältnis, da das Risiko ein Adenokarzinom zu entwickeln, mit zunehmender Größe und Nachweis einer intraepithelialen Neoplasie anzusteigen scheint (Weston AP et al., 1997), und das Entartungsrisiko einer LGIN mit einer Größenordnung von etwa 1/200 Patientenjahren bzw. 0,5 Prozent pro Patient und Jahr relativ gering ist und sogar in 2/3 der Fälle in Kontrollendoskopien nicht mehr nachweisbar ist (Sharma P et al., 2006). Zur Überwachung von Barrett-Ösophagus-Patienten, mit oder ohne Vorliegen einer intraepithelialen Neoplasie, wurde vom American College of Gastroenterology und der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen eine differenzierte Überwachungsstrategie empfohlen. Hierbei erfolgt ein endoskopisches Mapping mit Durchführung einer 4-Quadrantenbiopsie (Index-Endoskopie). In der histopathologischen Diagnostik des Adenokarzinoms des

Ösophagus und insbesondere seiner dysplastischen Vorläuferläsionen zeigt sich eine hohe Intra- und Interobservervariabilität, weshalb bei jeder Diagnosestellung einer Barrettmukosa mit einer intraepithelialen Neoplasie eine Bestätigung durch einen zweiten, auf diesem Gebiet erfahrenen Pathologen gefordert wird (Faller G et al., 2003).

Videoendoskopie, in Frühstadien und bei dysplastischen Vorstufen gegebenenfalls auch Chromoendoskopie (Canto MI et al., 2002; Gossner L et al., 2001) mit Entnahme von Probiopsien sowie endosonographischer Ultraschall werden bei Karzinomverdacht primär durchgeführt. Im Allgemeinen wird das Staging durch ein Spiral-CT des Thorax und Abdomens ergänzt. Die T-Klassifikation, welche ausschlaggebend für eine angestrebte komplette Tumorresektion (R0-Resektion) ist, kann hiermit relativ genau bestimmt werden. An Zentren der Maximalversorgung wird zusätzlich ein FDG-PET mit 18-Fluordesoxyglukose durchgeführt, mit dem der Glukose-Metabolismus des Tumors bestimmt wird und genauere Informationen über das Vorliegen systemischer Metastasen erlangt werden können (Lerut T et al., 2000; van Westreenen HL et al., 2004). Durch die Kombination mit der Computertomographie (PET-CT) können gleichzeitig morphologische und funktionelle Informationen erfasst werden, was die Genauigkeit beider Methoden erhöht und deren Durchführung vereinfacht.

1.3.1 Chirurgische und minimal invasive Therapie

Bei Patienten mit HGIN, T_{is} und T1-Karzinomen, welche eindeutig auf die Mukosa beschränkt sind (T1a), können minimal invasive Therapieverfahren wie endoskopische Resektion mittels Kappe oder Schlinge (Ell C et al., 2000; Pathirana A et al., 2001; Manner H et al., 2008) erfolgen. Der Einsatz minimal invasiver Therapiemodalitäten ist jedoch auf Grund wenig sensitiver Stagingmethoden in der Diskriminierung von Mukosa- und Submukosakarzinomen (Pech O et al., 2006) sowie einer häufig vorliegenden Multizentrität sehr begrenzt. Bei funktionell operablen Patienten stellt bei Vorliegen eines Submukosakarzinoms (T1b), bei dem in bis zu 20 Prozent der Fälle bereits eine Lymphknoten-(Mikro)metastasierung vorliegt (Burian M et al., 2004), eine modifizierte Operation nach Merendino den Goldstandard dar (Stein HJ et al., 2005; Theisen J et al., 2007), wobei bei Adenokarzinomen des Ösophagus mit einem präoperativen Tumorstadium bis

T2N0M0 eine patientenindividualisierte minimal invasive Therapie mittels Sentinel-Lymphknoten-Mapping und selektiver Lymphadenektomie durchgeführt werden kann (Burian M et al., 2004; Lamb PJ et al., 2005; Takeuchi H et al., 2009). In der Subgruppe der pT1 Karzinome kann nach chirurgischer Resektion eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 85 Prozent erzielt werden, so dass diese Patienten nach dem Eingriff als geheilt anzusehen sind (Stein HJ et al., 2004, 2005).

Adenokarzinome des Ösophagus mit einer Tumorkategorie $\geq T2$ nach der UICC-Klassifikation, bei denen eine R0-Resektion wahrscheinlich erscheint und keine Fernmetastasierung vorliegt, werden primär chirurgisch in Form einer radikalen Ösophagektomie therapiert. Hierbei wird eine standardisierte rechts thorakoabdominelle Ösophagektomie mit 2-Feld-Lymphadenektomie des hinteren unteren Mediastinums sowie entlang des Truncus coeliacus und intrathorakaler Anastomose mit geringer Komplikationsrate und guter Lebensqualität durchgeführt (Siewert JR et al., 2005; Ott K et al., 2009; von Rahden BH et al., 2006). Bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen stellt eine erweiterte Lymphadenektomie um die retroperitonealen Lymphabflusswege zum linken Nierenstiel den Goldstandard dar (Lerut T et al., 2005). Die transmediastinale Ösophagektomie kommt bei Patienten mit hohem, vor allem pulmonal bedingtem Operationsrisiko, welches anhand etablierter Scores präoperativ abgeschätzt wird (Bartels H et al., 2000), zum Einsatz (Stein HJ et al., 2005; Hulscher JB et al., 2002).

1.3.2 Multimodale Therapie

Viele Patienten weisen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits lokal fortgeschrittene Tumore auf, da häufig erst zu einem späten Zeitpunkt Symptome wie Dysphagie auftreten. Gewichtsverlust, Kachexie, Schmerzen und Heiserkeit sind weitere Symptome, welche ein fortgeschrittenes Tumorstadium anzeigen. Die Gesamtprognose der Ösophaguskarzinome verbleibt aus diesem Grund schlecht (Holmes RS et al., 2007).

Eine komplette Tumorsektion ist in den meisten dieser Fälle durch eine primäre chirurgische Therapie nicht zu erreichen (Siewert JR et al., 2001, 2003). Ziel der multimodalen Therapie ist die Verbesserung der R0-Resektionsrate durch eine chemotherapeutisch erreichte präoperative Tumorverkleinerung, die Verminderung einer lymphogenen (Mikro-)metastasierung und die Elimination klinisch nicht

erfassbarer Fernmetastasen, wodurch im Falle eines Ansprechens auf die neoadjuvante Chemotherapie eine Verlängerung der gesamten und rezidivfreien Überlebenszeit erreicht wird (Schneider PM et al., 2005; Berger AC et al., 2005; Cunninham D et al., 2006; Gebski V et al., 2007). Aus diesem Grund ist die neoadjuvante Chemotherapie fester Bestandteil der Therapiekonzepte lokal fortgeschrittener Tumore des oberen Gastrointestinaltraktes (Lordick F et al., 2004, 2007).

Eine alleinige neoadjuvante Polychemotherapie weist gegenüber einer neoadjuvanten Radiochemotherapie, trotz teilweise geringerer Ansprechraten im Sinne einer pathologischen kompletten Tumorresponse, mit einer verminderten postoperativen Morbidität und Mortalität einen Langzeitüberlebensvorteil für Patienten mit lokal fortgeschrittenen Adenokarzinomen des Ösophagus auf, so dass diese Therapiemodalität vorzugsweise erfolgen sollte (Luu TD et al., 2008).

Die zahlreichen Therapieprotokolle multimodaler Behandlungskonzepte, die im Rahmen klinischer Studien an Zentren mit entsprechender Erfahrung und hohen Fallzahlen durchgeführt werden, unterscheiden sich hauptsächlich in der Zusammensetzung und zeitlichen Abfolge der verwendeten Chemotherapeutika (Ajani JA et al., 1998; Geh JI et al., 2000). Als klassisches Kombinationsregime wird Cisplatin und 5-Fluorouracil (5-FU) mit Gabe von Leukovorin und optional zusätzlicher Gabe von Paclitaxel eingesetzt (Bader FG et al., 2008; Lordick F et al., 2004, 2007; Zacherl J et al., 2003; Fink U et al., 1998).

5-FU ist ein substituiertes Pyrimidinanalogon, das über einen anabolen Stoffwechselweg in ein toxisches Nukleotid umgewandelt wird und über eine irreversible Hemmung der Thymidylat-Synthetase die DNA-Synthese inhibiert, was zum Absterben der Tumorzellen führt (Longley DB et al., 2003). Platinderivate wie z.B. Cisplatin bilden kovalente Addukte mit Basen der DNA mit konsekutiver Inter- und Intrastrangquervernetzung. Im Folgenden kommt es durch Behinderung der Replikation und Transkription sowie Konformationsänderung der DNA zur Apoptose und Nekrose (Rabik CA et al., 2007). Eine weitere zytotoxische Eigenschaft scheint durch Generierung freier Radikale zu bestehen (Masuda H et al., 1994). Taxane, z.B. Paclitaxel, ein zytotoxisches Gift der Pazifischen Eibe, oder das Taxan-Analogon Docetaxel, welches additiv bei polychemotherapierten Tumoren des oberen Intestinaltraktes verabreicht wird, führen über eine Bindung an Tubulin zu einer übermäßigen Stabilisierung der Mikrotubuli, wodurch deren Depolymerisation

verhindert wird, was über eine zykluspezifische Störung der Mitose in der M-Phase letztlich ebenfalls eine Apoptose bewirkt (Deeks ED et al., 2007).

Zur histopathologischen Beurteilung des Tumorgewebes nach erfolgter Chemotherapie wird am Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie seit über 15 Jahren ein standardisiertes Untersuchungsschema für Magenkarzinome und nachfolgend auch für Adenokarzinome des Ösophagus verwendet (Becker K et al., 2003; Langer R et al., 2009). Der Grad der Tumorregression, als Maß des Ansprechens des Tumors auf die neoadjuvante Chemotherapie, wird basierend auf einer Schätzung des prozentualen Anteils an vitalem Tumorzellgewebe in Relation zu dem makroskopisch identifizierbaren Tumorbett, welches histologisch evaluiert wurde, bestimmt, und in 3 Tumorregressionsgrade eingeteilt. Hiernach werden alle Patienten mit keinem verbliebenem Tumorzellgewebe als komplette Responder (Tumorregressionsgrad 1a), bei einem Tumorregressionsgrad 1b (1-10% verbliebenes vitales Tumorgewebe) als subtotale Responder bzw. bei einem Tumorregressionsgrad 2 (11-50% verbliebenes vitales Tumorgewebe) als partielle Responder und bei einem Tumorregressionsgrad von 3 (über 50% verbliebenes vitales Tumorgewebe) als Nonresponder klassifiziert.

Die Prognose des in kurativer Absicht operierten Adenokarzinoms des distalen Ösophagus ist stadienabhängig und wird bestimmt durch den bei Erstdiagnose vorliegenden Lymphknotenstatus (pN), dem Ausmaß der erzielten Resektion (Siewert JR et al., 2006) sowie dem Tumorzelleinbruch ins Lymphgefäßsystem (von Rahden BH et al., 2005). Die morphologisch deskriptive (Grading) und histopathologische Tumorklassifikation nach Lauren scheinen ebenso wenig wie die T-Kategorie unabhängige prognostische Parameter darzustellen (Schneider PM et al., 2005). Patienten mit einem kompetten histopathologischen Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie (Responder) und in gewissem Grad auch Patienten mit einer subtotalen und partiellen Response weisen im Gegensatz zu nicht neoadjuvant therapierten Patienten und Nonrespondern einen Überlebensvorteil auf (Langer R et al., 2009; Berger AC et al., 2005; Schneider PM et al., 2005; Siewert JR et al., 2007). Die Prognose neoadjuvant behandelter Patienten scheint mit dem histopathologischen Remissionsgrad inklusive des Lymphknotenstatus sowie der Lymphgefäßinfiltration besser zu korrelieren als mit der noch immer als Standard herangezogenen TNM-Klassifikation (Langer R et al., 2009; Rizk NP et al., 2007; Schneider PM et al., 2005; Swisher SG et al., 2005).

40-60 Prozent der chemotherapierten Patienten zeigen allerdings keinen objektivierbaren Response im Sinne einer kompletten histopathologischen Tumorremission, und die Prognose dieser Patienten scheint schlechter zu sein als die primär chirurgisch behandelten Patienten (Burak WE et al., 2003; Lordick F et al., 2004; Zacherl J et al., 2003). Hierfür werden Nebenwirkungen durch die Chemotherapie, Selektion chemotherapieresistenter, aggressiver Tumorzelllinien und eine Verzögerung chirurgischer Therapie angeführt (Ancona E et al., 2001; Lordick F et al., 2004).

Unter Miteinbeziehung der postoperativen Letalität und aller Tumorstadien liegt die 5-JÜR nach R0-Resektion beim Adenokarzinom des Ösophagus bei etwa 40 Prozent (Stein HJ et al., 2005).

Die MRC Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy (MAGIC)-Studie und Medical Research Council (MRC)-Studie konnten eine 25%-ige Reduktion der Mortalität sowie eine signifikant verbesserte 5-JÜR neoadjuvant therapierter Patienten im Vergleich zu primär resezierten Patienten aufzeigen (Cunningham D et al., 2006; MRC Oesophageal Cancer Working Group, 2002). In der Subgruppe der Patienten mit einem histologisch kompletten Response (ypT0) nach (Radio-)Chemotherapie zeigen klinische Daten eine 5-JÜR von etwa 60-70 Prozent (Swisher SG et al., 2005; Rizk NP et al., 2007) bis sogar 100 Prozent (Langer R et al., 2009) auf.

1.4 Responseprädiktion

Da nur etwa maximal 50 Prozent der Patienten auf eine neoadjuvante Chemotherapie ansprechen (Cunningham D et al., 2006), Nonresponder möglicherweise sogar ein schlechteres Überleben als primär resezierte Patienten aufweisen (Ancona E et al., 2001) und eine valide prätherapeutische Responseprädiktion derzeit weder anhand von klinischen, histopathologischen noch molekulargenetischen Parametern möglich ist, kommt der Erforschung und Etablierung prätherapeutischer diagnostischer Methoden zur Diskriminierung von Respondern und Nonrespondern eine zentrale Bedeutung zu.

In zahlreichen Studien wurde nach prädiktiven bzw. prognostischen Biomarkern gesucht, um die Effektivität neoadjuvanter Therapieprotokolle zu verbessern. Anhand von Genexpressionsanalysen an prätherapeutischen Gewebeproben und deren Korrelation mit dem Ansprechen auf eine applizierte Chemotherapie konnten in den

letzten Jahren einige potentielle Biomarker charakterisiert werden (Langer R et al., 2005, 2008; Napieralski R et al., 2005; Luthra R et al., 2006; Fareed KR et al., 2009). Auf die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gene sowie weitere potentielle Biomarker prädiktiver Responseuntersuchungen wird in der Diskussion näher eingegangen. Einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Gene gibt **Tab. 1.1** wider.

Gen	Ziel	Funktion
Thymidylat- Phosphorylase (TP)	5-FU	Pyrimidin-Metabolismus Angiogenese
Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD)	5-FU	Pyrimidin-Metabolismus
Methylen-tetra-hydrofolat-Reduktase (MTHFR)	5-FU	Reduktase
Excision Repair Cross-Complementing (Group) 4 (ERCC4)	Cisplatin, Taxol	Exodesoxyribonuklease
Multidrug Resistance associated Protein 1 (MRP1)	Cisplatin, Taxol	Transport, Detoxifikation
Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Her2-/neu)	Cisplatin, Taxol	Tyrosin Protein Kinase Rezeptor
Caldesmon	Cisplatin	Non-motor actin binding protein
Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)		Haushaltsgen

Tab. 1.1: Potentielle Kandidatengene für eine Responseprädiktion chemotherapierter Adenokarzinome des Ösophagus und Haushaltsgen GAPDH

1.5 Molekulargenetische intratumorale Heterogenität

Neben anderen Tumorentitäten wie z.B. Mamma- (Aubele M et al., 1999; Lichy JH et al., 2000; Pertschuk LP et al., 2002; Hanna W et al., 2007), Harnblasen- (Diaz-Cano SJ et al., 2000), Kolon- (Baisse B et al., 2001), Prostata- (Macintosh CA et al., 1998; Zitzelsberger H et al., 1998), Ovarial- (Jochumsen KM et al., 2007) sowie Cervixkarzinomen (Lyng H et al., 2004), Oropharyngealkarzinomen (Pramana J et al., 2007) und auch Neuroblastomen (Albino D et al., 2008) wurde in einigen wenigen publizierten Arbeiten auch für das Ösophaguskarzinom eine intratumorale Heterogenität, überwiegend auf DNA-Ebene mittels PCR oder Durchflusszytometrie, sowohl für Plattenepithelkarzinome (Haraguchi Y et al., 1995; Sasaki K et al., 1991)

als auch für Adenokarzinome (Owonikoko T et al., 2002; Walch A et al., 2000; Robaszekiewicz M et al., 1992) beschrieben.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Molekulargenetische Untersuchungen werden gewöhnlich an prätherapeutisch entnommenen Probebiopsien (PE) der Tumore zur Prädiktion des Ansprechens auf eine spätere Chemotherapie durchgeführt. Da Probebiopsien lediglich oberflächliche, endoluminale Tumorareale abbilden, kommt einer molekulargenetischen intratumoralen Heterogenität eine erhebliche tumorbiologische und therapeutische Bedeutung zu, da bei deren Vorliegen, insbesondere in durch die PE nicht erfassbaren tiefen Tumorregionen, keine validen prätherapeutischen Responseuntersuchungen möglich wären.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es zu klären, ob beim Adenokarzinom des Ösophagus prätherapeutisch entnommene gepoolte Probebiopsien ein repräsentatives Abbild des gesamten Tumors darstellen können, oder ob eine intratumorale molekulargenetische Heterogenität prätherapeutischen prädiktiven Responseuntersuchungen erschwerend entgegensteht bzw. diese unmöglich macht. Hierfür wurden die Expressionslevel von 7 Genen, deren Expression in unmittelbaren Voruntersuchungen eine Assoziation mit einer Chemotherapieantwort gezeigt hatten, in fünf topographisch unterschiedlichen Tumorarealen primär resezierter, lokal fortgeschrittener Tumore, jeweils in zwei oberflächlichen und zwei tiefen Tumorinvasionsfronten sowie einem Tumorzentrum mittels quantitativer Real Time RT-PCR untersucht und statistisch auf eine intratumorale Heterogenität der Tumorresektate hin überprüft. Weiterhin wurden die Genexpressionslevel mit denen der korrespondierenden diagnostischen gepoolten PE auf eine Korrelation überprüft. Die Analyse wurde an formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Archivmaterial durchgeführt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Gewebematerial und Patientenkollektiv

Aus dem Gewebearchiv des Instituts für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München wurden neun Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Adenokarzinom des distalen Ösophagus (AEG Typ I) der Jahre 1995 bis 2002 ausgewählt, von denen ausreichend Gewebematerial für eine topographisch fraktionierte Analyse des Primärtumors, d.h. mindestens zwei Paraffinblöcke sowie jeweils genügend dazugehöriges Normalgewebe und Probebiopsien vorlagen.

Das ausgewählte Patientenkollektiv umfasste ausschließlich nicht neoadjuvant vorbehandelte, primär resezierte Patienten, um mögliche Effekte durch eine Chemotherapie in Form von veränderten Genexpressionsprofilen zu vermeiden (Langer R et al., 2007, Schneider S et al., 2005). Dadurch wurde ein direkter Vergleich der Genexpressionslevel von Probebiopsien und Primärtumoren gewährleistet.

Für die Untersuchung einer möglicherweise vorliegenden molekulargenetischen intratumoralen Heterogenität wurde bei den Primärtumoren eine topographische Fraktionierung in fünf Areale vorgenommen. Diese fünf unterschiedlichen Tumorareale bestanden aus jeweils zwei oberflächlichen und zwei tiefen Invasionsfronten sowie einem Tumorzentrum. Einen schematischen Überblick hierüber verschafft **Abb. 2.1**.

Die Separation der zu untersuchenden Zellareale erfolgte mittels manueller Mikrodissektion. Das zu dissezierende Gewebe war zuvor von einem Pathologen (Dr. R. Langer) evaluiert und die fünf topographisch fraktionierten Tumorareale gekennzeichnet worden (**Abb. 2.2**). Eine Übersicht über die wichtigsten klinischen und pathologischen Tumorcharakteristika gibt **Tab. 2.1** wider.

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung der histologischen Präparate

Das Gewebe der Probebiopsien war entsprechend histologischen Standardprotokollen des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München in 4% gepuffertem Formalin fixiert

und in Paraffinblöcke eingebettet worden. Die Archivierung der Operationspräparate war nach initialem Eröffnen und Aufspannen unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff, gefolgt von einer mindestens 24-stündigen Fixation, ebenfalls entsprechend erfolgt. Die nachfolgende Bearbeitung für die RNA-Extraktion und RT-PCR erfolgte im Wesentlichen nach am Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie etablierten Protokollen (Specht K et al., 2000, 2001; Walch A et al., 2000, 2001).

Fall	Alter	Geschlecht	Tumorgröße (max. Ausdehnung)	Lauren-Klassifikation	Grading	pT-Stadium	pN-Stadium	pM-Stadium	Re-sektions-Status	Klin. Stadien n. UICC
A	64	w	6 cm	Intestinal	G3	pT3	pN0 (0/19)	pMx	R0	IIA
B	58	m	4 cm	Intestinal	G2	pT3	pN0 (0/22)	pM0	R0	IIA
C	52	m	6 cm	Intestinal	G3	pT3	pN1 (19/23)	pM1 (Pleura)	R1	IVB
D	56	m	9 cm	Intestinal	G2	pT3	pN1 (1/12)	pMx	R0	III
E	75	m	9 cm	Intestinal	G3	pT3	pN1 (6/23)	pMx	R0	III
F	49	m	7 cm	Intestinal	G3	pT3	pN1 (9/21)	pMx	R1	III
G	52	w	3,5 cm	Intestinal	G2	pT3	pN1 (5/38)	pMx	R0	III
H	74	m	3 cm	Nicht klasifizier- -bar	G3	pT3	pN1 (13/15)	pMx	R1	III
I	59	m	10 cm	Intestinal	G3	pT3	pN1 (6/47)	pM1 (Leber)	R2	IVB

Tab. 2.1: Patientenkollektiv und Tumorcharakteristika

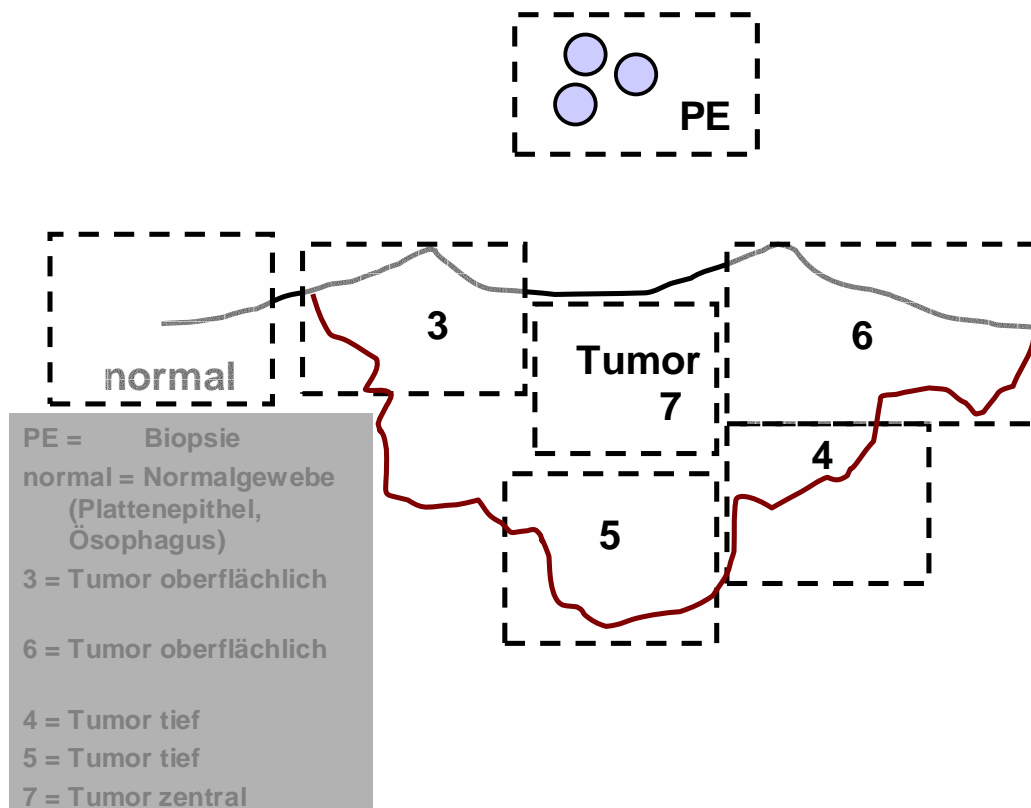


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der mikrodisezierten Tumorareale

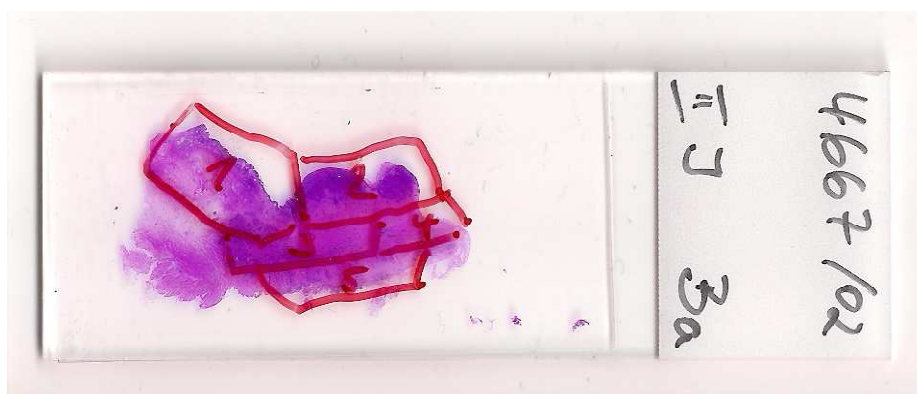


Abb. 2.2: HE- gefärbter Kontrollschnitt der zu mikrodisezierenden Tumorareale

Die Gewebeblöcke wurden nach Standardprotokollen für Mikrodisektion (Schichtdicke 10 µm) im Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München mit dem Mikrotom (HM335E, Fa. MICROM GmbH, Walldorf) geschnitten und auf dünne Glasobjektträger (SuperfrostPlus®, Fa.

MENZELGLÄSER, Braunschweig) aufgebracht. Um das frisch geschnittene Gewebe vor Verdauung durch RNasen und DNasen zu schützen, wurden der Arbeitsplatz und das Mikrotom mit RNase-free Spray (RNase Erase, Fa. ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA) sorgfältig gereinigt. Für das Wasserbad wurde DEPC-behandeltes Wasser (Fa. Boehringer, Ingelheim) bei einer Temperatur von 38 - 42°C verwendet und regelmäßig nach etwa 30 Schnitten gewechselt. Vom Primärtumor wurden insgesamt 3 Schnitte in Serie von zwei verschiedenen Tumorblöcken angefertigt, vom Normalgewebe jeweils ein Schnitt, und die Probebiopsien, auf Grund eines deutlich geringeren Tumorzellgehalts aus jeweils 3 Probebiopsien in 4 Schnittstufen gepoolt, um einen exakten Vergleich der relativen quantitativen Expressionsmuster der Probebiopsien mit denen der Primärtumoren zu ermöglichen. Nach Entparaffinierung und Hämalaun-Färbung (Instant Hämalaun, Fa. Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA) diente ein Schnitt zur Reevaluation und als Orientierungshilfe für die zu mikrodissiezierenden Areale und die übrigen zur RNA-Extraktion nach durchgeführter Mikrodissektion bzw. zu Archivierungszwecken.

2.2.2 Entparaffinierung und Mikrodissektion

Die 10 µm dicken Schnitte wurden direkt vor Durchführung der manuellen Mikrodissektion für 2 mal 20 Minuten in RNase-freien Gefäßen mit Xylol entparaffiniert, woran sich eine absteigend konzentrierte Alkoholreihe zur Rehydrierung anschloss. Die Entparaffinierung endete in reinem, DEPC-behandeltem Wasser (Fa. Boehringer, Ingelheim), um eine kurze Hämalaun-Gegenfärbung (Instant Hämalaun, Fa. Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA) zu ermöglichen. Einen Überblick über die Gewebeentparaffinierung gibt **Tab. 2.2**.

Xylol	20 min.
Xylol	20 min.
100% Ethanol	5 min.
90% Ethanol	5 min.
80% Ethanol	5 min.
70% Ethanol	5 min.
DEPC-behandeltes Wasser	5 min.
Hämalaun-Schnellfärbung	sek.

Tab. 2.2: Entparaffinierung

Alle Arbeiten wurden mit Handschuhen durchgeführt, um eine ausreichende RNA-Menge von guter Qualität in den mikrodisszierten Gewebsabschnitten durch Vermeidung einer Degradation der Tumorzell-RNA zu gewährleisten. Unter lichtmikroskopischer Sicht (WILD, Photomakroskop M 400, HEERBRUGG, Leica, Wetzlar) wurden die Zellareale beurteilt, mit den HE-gefärbten Kontrollschnitten verglichen, und manuell mit einem sterilen Skalpell (Fa. Gebrüder Martin, Tuttlingen) von dem mit DEPC-behandeltem Wasser angefeuchteten Objektträger abgekratzt und in sterile, autoklavierte 1,5 ml fassende Eppendorf-Cups verbracht, in welche zuvor bereits 200 µl RNA Lysepuffer (Sodiumdodecylsulfat) pipettiert worden war. Nach Durchführung der Mikrodissektion wurden nach abschließender Zugabe von 10 µl Proteinase K in einer Konzentration von 50 mg/ml (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) die Caps fest auf die Eppendorf-Cups gesetzt und über Nacht bei 60°C inkubiert. Dabei wurden die Eppendorf-Cups im Brutschrank auf eine bewegliche, rotierende Metallplatte gestellt, so dass eine gleichmäßige Konzentration der Proteinase K in der Pufferlösung erzielt werden konnte. Durch die enzymatische Andauung der Zellen wurde eine Lösung von Zellbestandteilen in den Ansatz erreicht. Am darauffolgenden Tag wurde der Ansatz für die RNA-Extraktion weiterverarbeitet.

2.2.3 Durchführung der RNA-Extraktion aus mikrodissiziertem Gewebe

Nachdem durch visuelle Kontrolle eine ausreichende enzymatische Verdauung durch die Proteinase K gewährleistet war, wurde mit der RNA-Extraktion begonnen. Im Falle einer unzureichenden Verdauung, entsprechend noch sichtbarer Hämalaun-gefärbter Zellbestandteile, wurden weitere, maximal 10µl Proteinase K der Probe zugegeben, so dass maximal 10 Prozent der Probenvolumina Proteinase K entsprachen, und erneut für weitere zirka 1 - 2 Stunden bei 60°C inkubiert.

In die Probenansätze wurden für die Phenolextraktion zum in der SDS-Pufferlösung lysierten Probenmaterial 20 µl 2M Natriumacetat (pH 4,0 - 4,5), 200 µl Phenol (pH bei 25°C 4,5 - 5,5, Phenol : Wasser 3,75 : 1, v/v; Fa. Gibco, Karlsruhe) und 100 µl Chloroform (99+%; Fa. SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim) pipettiert und zwischen den einzelnen Pipettierschritten durch die Benutzung eines Vortex-Gerätes eine gleichmäßige Durchmischung der Reagenzien erzielt. Nach 6-minütigem Zentrifugieren in der Ultrazentrifuge (Eppendorf centrifuge 5417 R, Fa.

Eppendorf AG, Hamburg) mit 12.000 rpm bei 4°C wurde die in der wässrigen oberen Phase enthaltene RNA mit einer Pipette entnommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Die untere organische Phase, in der sich die Proteine und Zellreste gesammelt hatten, wurde verworfen. Um die Löslichkeit der RNA in der wässrigen Phase herabzusetzen wurden 220 µl Isopropanol sowie 2 µl Glykogen in einer Konzentration von 10 mg/ml, was zu einer Ausfällung und Präzipitation der RNA-Moleküle führen sollte, hinzugefügt. Nachfolgend wurden die Proben eine Stunde bei -20°C gelagert und anschließend mit 12000 rpm bei 4°C 30 Minuten zentrifugiert. Am Boden der Eppendorf-Gefäße zeigte sich nun ein aus Glykogen und RNA bestehendes Präzipitat, auch Pellet genannt. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Zur Reinigung der Pellets wurden 300 µl 70% Ethanol verwendet und erneut mit 12000 rpm bei 4°C 15 Minuten zentrifugiert. Die nun im Ethanol befindlichen Pellets wurden unter Raumtemperatur 20 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde wiederum der Überstand abgenommen und das verbliebene Pellet für maximal 5 Minuten offen an der Luft getrocknet. Abschließend wurden die Pellets, die nun nach Entfernen des Glykogens aus gereinigter RNA bestanden in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und bei -70°C eingefroren.

2.2.4 Quantitative Real Time Reverse-Transcriptase-Polymerase Chain

Reaction (Real Time RT-PCR)

2.2.4.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese stellt den letzten Schritt vor Durchführung einer RT-PCR dar. Sie ist notwendig, da sich bei der Vermehrung von Protein-kodierenden DNA-Genabschnitten, so genannten Exons, zwischengeschaltete Introns, keine genetisch wertvolle Information beinhaltende Genabschnitte, als störend erweisen. Die reverse Transkription stellt eine etablierte Methode dar, kodierende Genabschnitte zu synthetisieren. Hierbei entsteht mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus der in den vorangegangenen Arbeitsschritten isolierten und gereinigten RNA ein RNA/DNA-Hybridstrang. Durch die Teilaktivität der Ribonuklease, einem Enzym, das der RNA zugehörig ist, wird der RNA-Anteil des Hybridstrangs durch Hydrolyse abgespalten, so dass lediglich eine einsträngige, Intron-freie, sogenannte

komplementäre DNA (cDNA) übrig bleibt. Diese kann dann im Folgenden der RT-PCR zugeführt werden.

10 µl RNA der bei -70°C gelagerten Patientenproben,
+ 1 µl Random Primer (Hexanukleotidmix),
+ 4 µl First-Strand Puffer,
+ 2 µl DTT 0,1 M (im RT-Kit enthalten),
+ 1 µl dNTPs 10mM,
+ 1 µl RNasin (RNase-Inhibitor, Fa. Roche),
+ 1 µl Reverse Transkriptase (Superscript Enzym, Fa. Gibco),

Gesamtvolumen eines Ansatzes: 20 µl.

Tab. 2.3: Ansätze für die reverse Transkription

Das Anfertigen der Ansätze erfolgte bei allen untersuchten Patientenproben nach in **Tab. 2.3** angeführtem, etabliertem Protokoll. Das Ansatzvolumen von 20 µl eignet sich zur Einzelstrangsynthese einer cDNA aus bis zu 500 ng mRNA je Probe (Specht K et al., 2000, 2001). Den bei -70°C gelagerten Patientenproben mit der in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser enthaltenen RNA wurden zunächst weitere 50 µl gereinigten Wassers hinzugegeben, bevor je 10 µl pro Ansatz für die Synthese der cDNA mittels reverser Transkription entnommen wurden. Auf Grund einer besseren Praktikabilität wurden insgesamt fünf Ansätze pro Patient vorbereitet. Die verbliebenen 50 µl Patienten-RNA wurden für eventuelle Kontrolluntersuchungen oder weitere Experimente wieder bei -70°C tiefgefroren.

Zunächst wurde 1 µl eines als Hexanukleotidmix vorliegenden Random Primers (500 µg/ml) der bereits in ein RNase-freies Microtube-Röhrchen pipettierten 10 µl Patientenprobe hinzugefügt, und zwecks Anlagerung des Random Primer an die RNA bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden in den Ansatz 4 µl First-Strand Puffer, 2 µl DTT 0,1 M, 1 µl dNTP Mix 10 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) sowie 1 µl RNasin (Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl, Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), ein RNase-Inhibitor zur Verhinderung einer Degradation der RNA durch eine eventuelle RNase-Aktivität in den Reaktionsgefäßen, sowie als letzte Substanz 1 µl des Enzyms Reverse Transkriptase (SuperScript™II RNase H-RT, 200 U/µl, Fa. Gibco, Karlsruhe) jedem Ansatz hinzugefügt. Während dieser Pipettierschritte wurden die Microtube-Röhrchen auf Eis gelagert. Im Anschluss fand

die Synthese der cDNA bei 42°C für eine Stunde statt. Um eine Inaktivierung des Enzyms herbeizuführen, schloss sich nach Beendigung der cDNA-Synthese eine Erhitzung auf 95°C für 5 Minuten an. Nach Poolen der pro Patient vorbereiteten fünf Ansätze wurden der nun bereits in 100 µl vorliegenden cDNA weitere 120 µl gereinigten Wassers hinzugefügt, so dass für die darauffolgende RT-PCR 220 µl cDNA pro Gewebeprobe zur Verfügung standen. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C oder bei am Folgetag geplanter RT-PCR bei 4°C .

2.2.4.2 Grundlagen der Real Time RT-PCR

Eine PCR (Polymerase-Chain-Reaction) ermöglicht die Amplifikation eines durch zwei flankierende Oligonukleotide (Primer) definierten Sequenzbereichs einer im Gewebe vorliegenden DNA bzw. synthetisierten cDNA mithilfe einer DNA-Polymerase (Mullis KB et al., 1987). Die bei der Real Time RT-PCR eingesetzte TaqMan® Probe, ein aus 20 - 30 Nukleotiden bestehendes Oligonukleotid mit 5'-3'-Exonuklease-Aktivität (Lawyer FC et al., 1989; Holland PM et al., 1991), welche sich zwischen Forward und Reverse Primer anlagert, stellt eine fluorogene Sonde dar, deren 5'-Ende mit einem energiereichen fluoreszierenden Reportermolekül (Fluoreszein-Derivat: FAM: 6-Carboxy-Fluorescein) markiert ist, während das 3'-Ende einen energieärmeren Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat: TAMRA: 6 Carboxy-tetramethyl-rhodamin) trägt (Lee LG et al., 1993; Livak KJ et al., 1995). Der Fluoreszenz-Energietransfer vom energiereichen zum energiearmen Ende wird durch die räumliche Nähe zum Quencher-Farbstoff unterdrückt (Lakowicz JR, 1983, 2006; Förster T, 1948). Während des Amplifikationsvorganges kommt es jedoch durch Anlagerung der AmpliTaq® DNA-Polymerase zu einer Konformitätsänderung der Sonde. Die nun Y-förmige Sekundärstruktur der Sonde führt über Aktivierung der 5'-Exonuklease-Aktivität durch Hydrolyse zu ihrer eigenen Abspaltung, was durch Aufhebung der räumlichen Nähe zum Quencher-Farbstoff den Fluoreszenz-Energietransfer ermöglicht und somit entsprechend mit einer Spezifität von 100 Prozent bei jedem Zyklus zu einem Anstieg der Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes bei einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm führt, welche durch das ABI Prism 7700 Sequence Detection System zu jedem Zeitpunkt der Reaktion erfasst wird und relative quantitative Aussagen über den Amplifikationsvorgang ermöglicht (Higuchi R et al., 1992, 1993).

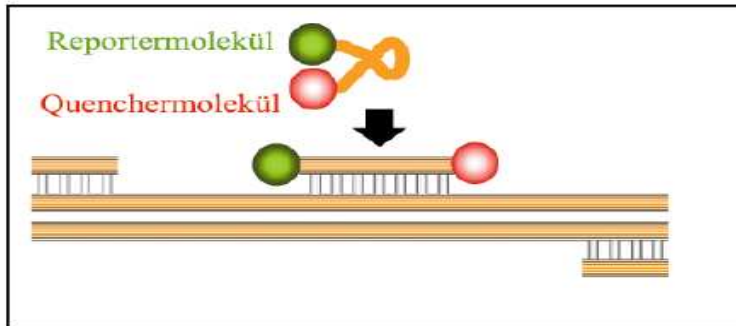


Abb. 2.3(a): 5'-Nuklease Assay: Hybridisierung einer fluorogenen Sonde an den cDNA-Strang

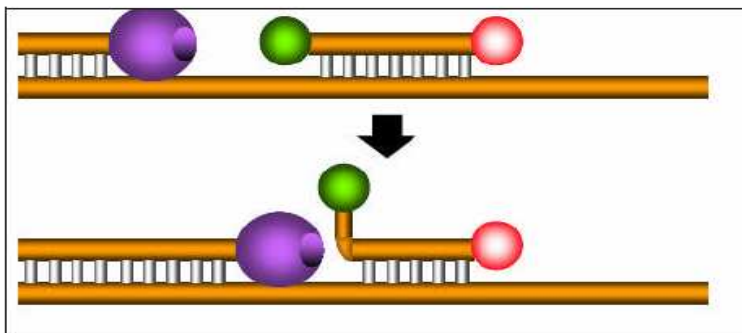


Abb. 2.3(b): Die TaqMan Polymerase trifft auf die Probe; Aktivierung der 5'-Exonuklease Aktivität

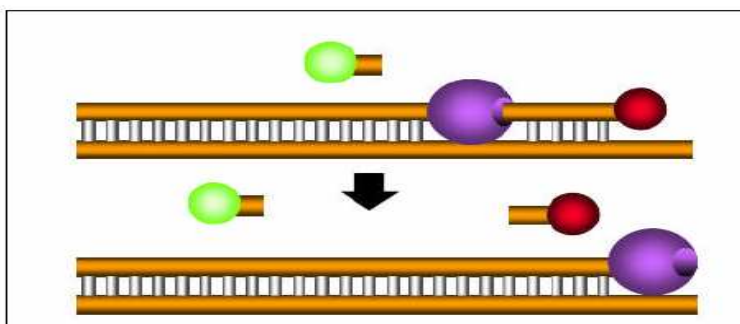


Abb. 2.3(c): Abspaltung des Reporter-Moleküls von der Sonde und Sondenhydrolyse

(modifiziert nach Livak KJ et al., 1995 in Lakowicz JR ed. In: Principles of Fluorescent Spectroscopy, 3rd edition 2006, Springer Science + Business Media, LLE, Chapter 21 DNA Technology. pp. 705 – 740)

Die PCR lässt sich in 3 Abschnitte - Anfangsphase, exponentielle Phase und Plateauphase - unterteilen. Am Anfang der Reaktion stellen die Amplifikationskurven des Reportersignals entsprechend eines linearen Beginns eine Basislinie ohne nennenswerte Veränderungen dar. Bei jedem weiteren Amplifikationszyklus der PCR findet eine Verdopplung der entsprechenden Genabschnitte statt, was während der exponentiellen Phase zu einem sprunghaften Anstieg des Reportersignals führt. In diesem Reaktionsabschnitt befindet sich die Detektionsschwelle, sogenannter Threshold-Zyklus, bei deren Erreichen man vom C_T -Wert spricht, mit dem die einzelnen Ergebnisse der Reaktion untereinander verglichen werden können. Durch Aufbrauchen der Reaktionsprodukte kommt es mit zunehmender Reaktionsdauer zum Ende des Amplifikationsvorgangs und zur Degradation der empfindlichen Nukleinsäuren. Die unterschiedlichen Ausgangsmengen der Proben bedingen eine große Variabilität des Zeitpunktes und des Niveaus der Plateaukurve.

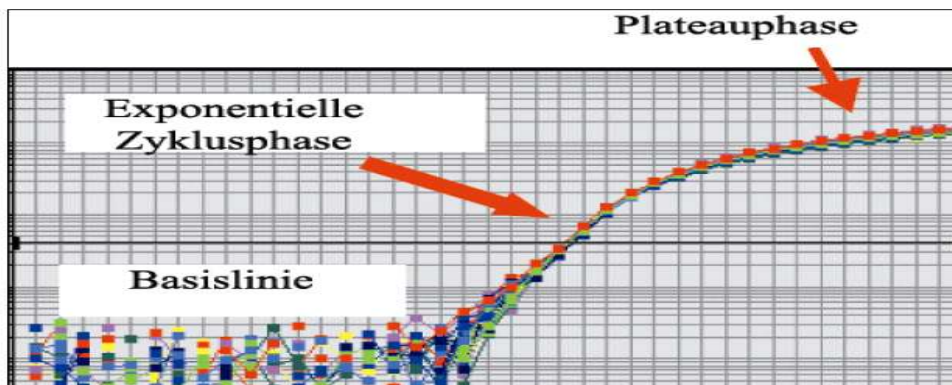


Abb. 2.4: Darstellung des Ablaufs einer PCR in 3 Phasen
(User Bulletin #2 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, 1998)

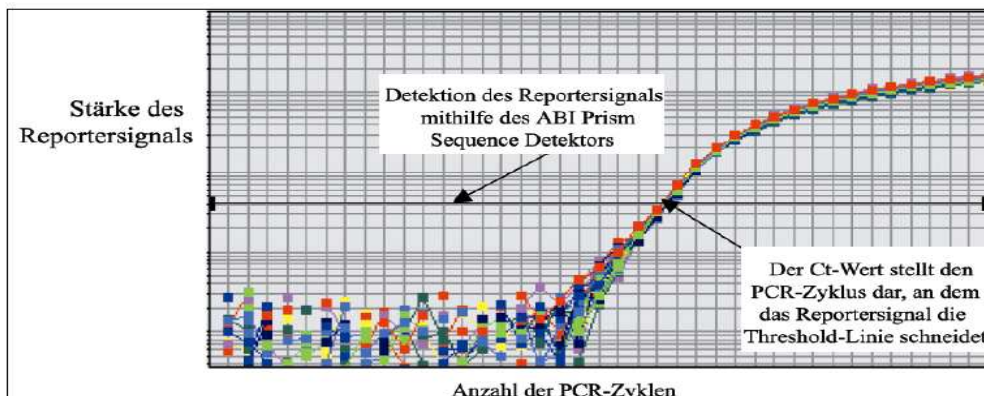


Abb. 2.5: Graphische Darstellung einer Amplifikationskurve mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System
(User Bulletin #2 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, 1998)

Das mit Zunahme der Kopienzahl direkt proportional steigende Fluoreszenzsignal im geschlossenen optisch geeichten Reaktionsgefäß wird in Echtzeit durch Bildschirmübertragung des ABI PRISM 7700 Sequence Detection System von Zyklus zu Zyklus graphisch sichtbar gemacht. Die sogenannte Threshold-Linie zeigt die erstmals über die Grundlinie angestiegene Reporter-Fluoreszenz an. Den PCR-Zyklus, bei dem dies auftritt, bezeichnet man als Threshold-Zyklus. Der C_T -Wert dieses Zyklus ist abhängig von der Anzahl der Startkopien und nimmt bei einer angenommenen Reaktions-Effektivität von 100 Prozent mit jeder Verdopplung der Startkopienzahl um einen Zyklus ab. Die quantitative Real Time RT-PCR ermöglicht eine schnelle automatisierte in-vitro-Beobachtung des Reaktionsablaufs in der exponentiellen Phase mit der selbst kleinste Änderungen der Gesamtzahl an DNA-Kopien erfasst werden können. Bei Auswahl der Sonden und dem Sondendesign sind bestimmte Punkte zu beachten, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann, da die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten sequenzspezifischen Sonden der standardisierten Primer-Probe-Sets für die hier untersuchten Gene als Assay-on-demand (Fa. PE Applied Biosystems, Foster City, USA) angeboten wurden und auf Herstellerangaben verwiesen werden muss.

2.2.4.3 Praktische Durchführung der Real Time RT-PCR

Der letzte Schritt der praktischen Durchführung der RT-PCR für die Fälle A - I der unbekannt Patienteproben der topographisch fraktionierten Tumoreareale, der PE und des Normalgewebes wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Einzelne Gesamtansätze von 25 µl wurden nach in **Tab. 2.4** bzw. **Tab. 2.5** aufgelistetem Pipettierschema hergestellt und anschließend jeweils 5 µl der unbekannt cDNA zugegeben, so dass pro Well ein Gesamtvolumen von 30 µl vorlag. Hierbei wurden für die untersuchten Gene Caldesmon, MRP1 (ABCC1) und MTHFR, für die in 1,5 µl Gesamtvolumen vorgefertigte Forwardprimer, Reverseprimer sowie Probes als Assay-on-demand vorlagen (Fa. PE Applied Biosystems, Foster City, USA; **Tab. 2.6**), zu 15 µl Taqman Universal PCR Mastermix (Fa. PE Applied Biosystems, Foster City, USA, Bestell-Nr.4304437), bestehend aus PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), $MgCl_2$ 5 mM, dNTPs mit einer Endkonzentration von 10 mM und der TaqPolymerase (5 U/µl), 8,5 µl DEPC-gereinigtes Wasser hinzugefügt (**Tab. 2.5**). Für die untersuchten Gene DPD, ERCC4,

Her2-/neu und TP sowie für das Haushaltsgen GAPDH (**Tab. 2.7**) wurde zu je 1 μl der einzeln vorliegenden Forward- und Reverseprimer (je 3 μM) und der Probe (2 μM) noch 7 μl DEPC-gereinigtes Wasser addiert (**Tab. 2.4**). Um Kontaminationen mit Fremd-RNA oder DNA auszuschließen, wurde bei jedem Reaktionsansatz ein cDNA-freier, lediglich aus Wasser bestehender Ansatz als Negativkontrolle (NoTemplateControl, NTC), mitgeführt. Daneben wurde stets als Kalibrator die Zelllinie HT 29 mitgeführt. Die Ansätze wurden in 96-well-optical-Mikropipettierplatten (Fa. PE Applied Biosystems, Foster City, USA) pipettiert und 5 μl cDNA hinzugefügt. Pro Mikropipettierplatte wurden jeweils 4 Gene, jede Patientenprobe sowie Negativkontrolle und Kalibrator in doppeltem Ansatz untersucht. Dafür wurden 26-fache Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 650 μl gewählt. Dies beinhaltete 50 μl Überschuss pro Platte und Gen, um etwaigen Pipettierungenauigkeiten Rechnung zu tragen. Die einzelnen Wells wurden mit optisch geeichten Caps luftdicht verschlossen. Für alle PCR-Untersuchungen wurde der Thermo-Cycler TaqMan-Prozessor 7700 (Fa. PE Applied Biosystems, Foster City, USA) mit jeweils identischen Einstellungen verwendet. Die Ansätze wurden initial bei 50°C für eine Dauer von 2 Minuten der Wirkung der AmpErase UNG ausgesetzt. Nach 10-minütiger Aktivierungszeit der Taq-Polymerase bei 95°C folgten 40 Zyklen, jeweils bestehend aus 15 Sekunden bei 95°C zur Denaturierung und weiteren 60 Sekunden bei 60°C zwecks Anlagerung der Primer (Annealing) und Synthese (Extension). Nach Beendigung der 40 Zyklen folgten 7 Minuten bei 72°C. Nach abgeschlossenem Durchlauf, der jedes Mal 1 Stunde 56 Minuten betrug, wurden die RT-PCR-Produkte bei 4°C gekühlt und mit der computerunterstützten Auswertung der Amplifikationskurven begonnen.

DEPC-H ₂ O	7 µl
2 x Taqman Universal PCR Mastermix	15 µl
Fowardprimer (3 µM)	1 µl
Reverseprimer (3 µM)	1 µl
Probe (2 µM)	1 µl

Tab. 2.4: Pipettierschema der untersuchten Gene DPD, ERCC4, Her2-/neu, TP sowie des Haushaltsgens GAPDH

DEPC-H ₂ O	8,5 µl
2 x Taqman Universal PCR Mastermix	15 µl
Fowardprimer + Reverseprimer + Probe (Assay-on-demand, Fa. Applied Biosystems)	1,5 µl

Tab. 2.5: Pipettierschema der untersuchten Gene MRP1, Caldesmon und MTHFR

MTHFR	Koenzym (Reduktase) im Folsäuremetabolismus	SAP-Mat.Nr.: Hs00195560_m1
CALD	Non-motor actin binding protein	SAP-Mat.Nr.: Hs00263998_m1
MRP1	Signaling/transport carrier/ Chemotherapeutikaresistenz	SAP-Mat.Nr.: Hs 00219905_m1

Tab. 2.6: Primer-Probe-Sets (Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix; Fa. PE Applied Biosystems)

Gen	Funktion	Gensequenz
Thymidylat-Phosphorylase (TP)	Koenzym im Pyrimidinmetabolismus (5-FU)	
Forwardprimer TPNM1953mRNA736F	9 nmol	CAG AGA TGT GAC AGC CAC CGT
Reverseprimer TPNM1953mRNA831R	5 nmol	TCC ACC ACC AGA GCG GAC A
Probe		CTGCCACTCATCACAGCCTCCATTCTC
Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD)	Koenzym im Pyrimidinmetabolismus (5-FU)	
Forwardprimer	12 nmol	TGG TCT TCA GTT TCT CCA TAG TGG
Reverseprimer	10 nmol	CTT CGA TCA CAG TGA AAT CCT GAT
Probe		CCGTCTCCAGGTATGCAGTGCCAT
ERCC4	Exodeoxyribonuclease (Cisplatin, Taxol)	
Forwardprimer ERCC4F1956-1982	7 nmol	AAA CTT AGA CCT AGT AAG AGG CAC AGC
Reverseprimer ERCC4R2027-2012	10 nmol	TCC TGG CCA CCG GCT T
Probe		TGCAGATGTTTCCACTGACACTCGGAA
Her2-/neu	Tyrosin-Proteinkinase-Rezeptor	
Forwardprimer HuHER2mRNA2612F	10 nmol	ACC TGC TGA ACT GGT GTA TGC A
Reverseprimer HuHER2mRNA2679R	8 nmol	GTG TAC GAG CCG CAC ATC CT
Probe		TCCAGGTAGCTCATCCCCTTGGAAT
GAPDH	Haushaltsgen	
Forwardprimer GAPDH-FP548F	8 nmol	CGT GGA AGG ACT CAT GAC CA
Reverseprimer GAPDH-RP635R	10 nmol	GCC ATC ACG CCA CAG TTT C
Probe		CAGAAGACTGTGGATGGCCCCCTCC

Tab. 2.7: Sequenzen von Primer und Probe (Herstellerangabe); Verdünnung der Probe: jeweils 6 nM als lyophilisiertes Pellet in 1µl DEPC-Wasser gelöst ⇒ Endkonzentration im Well der PCR: 300 nM

Für die Amplifikation der cDNA von DPD, ERCC4, Her2-/neu, TP und GAPDH konnte auf mit dem Primer-Express-Programm von Applied Biosystems (Fa. PE Applied Biosystems, Foster City, USA) bereits in Vorarbeiten (Napieralski R et al., 2005; Specht K et al., 2000, 2001, 2002) erstellte und am Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München etablierte Sets zurückgegriffen werden. Für die übrigen Gene Caldesmon, MRP1 (ABCC1) und MTHFR lagen von der Firma PE Applied Biosystems vorgefertigte Primer-Probe Sets als Assays-on-demand vor.

2.2.4.4 Prinzip der Berechnung der relativen Genexpression (nach Perkin-Elmer Corporation, 1998)

Bei der Durchführung einer quantitativen TaqMan® PCR werden die Genexpressionsverhältnisse unbekannter Proben mithilfe einer relativen Quantifizierung verifiziert und vergleichbar gemacht. Hierbei wird das Expressionslevel der Zielsequenz semiquantitativ mithilfe eines Vergleichs zu einer zweiten, nicht verwandten Zielsequenz, ein in allen Zellen vorhandenem und gleichmäßig exprimiertem, so genanntem Haushaltsgen (Vandesompele J et al., 2002), abschätzt. Das konstante Expressionsniveau eines Haushaltsgens dient somit als endogene Kontrolle zu der Expressionswerte der zu bestimmenden Gene ins Verhältnis gesetzt werden können. Dies ist auf Grund von unterschiedlichen Tumorzell- und RNA-Mengen der unbekanntenen Proben erforderlich.

Für eine relative Quantifizierung der mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System erhobenen Daten unter Verwendung der Software-Version 1.6 stehen insgesamt vier verschiedene Methoden zur Verfügung, die alle vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse ohne signifikante Unterschiede ermöglichen. In dieser Arbeit wurde die Standardkurven-Methode unter Verwendung separater Reaktionsgefäße angewendet (Collins ML et al., 1995). Zwar erfordert diese Methode ein ständiges Mitführen eines Kalibrators auf den 96-wells-Mikropipettierplatten, was einen Mehrverbrauch an Primer-Probe-Sets erforderlich macht und anfällig ist gegenüber möglichen Fehlern bei den Verdünnungsschritten während der Erstellung der Standardkurven, benötigt aber gegenüber der komparativen C_T -Wert-Methode kein darüber hinaus durchzuführendes Beweisexperiment, um die in etwa gleiche Effektivität der Amplifikation der zu untersuchenden Gensequenzen und des

Haushaltsgens zu belegen. Beide Methoden können auch mithilfe unterschiedlicher Reporter-Farbstoffe mit unterschiedlichen spezifischen Wellenlängen in einer so genannten Multiplex-PCR durchgeführt werden. Hierbei werden die untersuchte Gensequenz und die endogene Kontrolle in einem Reaktionsgefäß untersucht. Dieser Versuchsansatz minimiert Pipettierfehler, erzeugt allerdings auf Grund der hierbei vermehrt benötigten Einzelkomponenten neue Fehlerquellen, die das Endergebnis beeinträchtigen können (Perkin-Elmer Corporation, 1998).

Mithilfe einer Standardprobe (Kalibrator), für welche eine bekannte Konzentration von RNA sowie die Anwesenheit der zu untersuchenden Zielsequenz und das Fehlen einer Fremdkontamination gewährleistet ist, werden die Werte der Zielsequenzen durch Herstellung einer exakt durchgeführten Verdünnungsreihe für einzelne Verdünnungsstufen bestimmt und durch Interpolation für jede Zielsequenz Standardkurven mit bekannter Geradengleichung erstellt (Perkin-Elmer Corporation, 1998). Die Geradengleichung der Standardkurven erlaubt nun Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der zu untersuchenden Gensequenzen in den unbekanntem Proben.

Das Prinzip der relativen Quantifizierung mittels relativer Standardkurven-Methode stellt somit ein einfaches Verfahren dar, Expressionsverhältnisse verschiedener Gene unbekannter Proben miteinander vergleichen zu können.

2.2.4.5 Erstellung der relativen Standardkurven mithilfe eines Kalibrators

In der vorliegenden Arbeit wurden relative Standardkurven erstellt, d.h. die Messergebnisse der unbekanntem Proben werden ins Verhältnis zum Kalibrator gesetzt, so dass das Endergebnis eine einheitsfreie Zahl darstellt. Dies erlaubt die Verwendung einer x-beliebigen Menge an Stammlösung. Bei der Herstellung der Standardkurven wurde auf eine exakt durchgeführte Verdünnung der Stammlösung geachtet. Hierbei wurden 3,5 µl cDNA (\approx ca. 50 ng cDNA) der Stammlösung 1:5, 1:25, 1:125 und 1:625 mit destilliertem Wasser verdünnt. Als Kalibrator diente in der vorliegenden Arbeit die Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie HT 29 (HTB 38; American Type Culture Collection).

Da bei einer relativen Quantifizierung die Werte der Zielsequenzen in Beziehung zum Haushaltsgen, hier GAPDH (Gyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), interpretiert werden, wurden die Standardkurven sowohl für die 7 Zielgene als auch für GAPDH

erstellt. Die Durchführung der RT-PCR des Kalibrators (= Stammlösung) wurde analog wie bei den unbekanntem Proben nach Protokoll durchgeführt. Alle zu untersuchenden Zielsequenzen wurden auf einer 96-wells-Mikropipettierplatte in doppeltem Ansatz bestimmt, um den Standardmessfehler in Form etwaiger Pipettiergenauigkeiten zu minimieren. Das jeweilige Mitführen von humaner genomischer, intronhaltiger DNA, deren quantitativer Wert nach PCR 0 ergeben musste, diente neben den NTCs (No template control), Ansätzen ohne cDNA-Gehalt, als Negativkontrolle zwecks Erkennung einer Fremdkontamination.

Folgende Abbildung zeigt die Anordnung der Reaktionsansätze auf der 96-well-Mikropipettierplatte am Beispiel von MRP1 (ABCC1).

Dieses Pipettierschema wurde analog bei allen anderen zu untersuchenden Gensequenzen und dem Haushaltsgen GAPDH verwendet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MRP1 A1	MRP1 A1	MRP1 A2	MRP1 A2	MRP1 A3	MRP1 A3	MRP1 A4	MRP1 A4	MRP1 A5	MRP1 A5	NTC	NTC
B											Gen. DNA	Gen. DNA
C												
D												
E												
F												
G												
H												

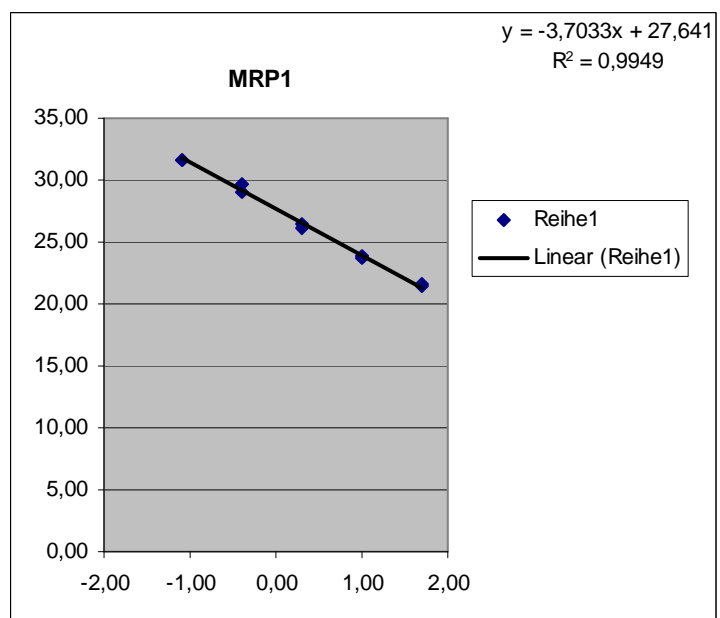
Tab. 2.8: Pipettierschema auf der 96-well-Mikropipettierplatte am Beispiel von MRP1 (ABCC1);
(NTC: No template control; Gen. DNA: Genomische DNA)

In der **Tab. 2.8** zeigen die Zahlen A1 - A5 die 5 in Doppelansätzen bestimmten Verdünnungsstufen an. Die erste Stufe beinhaltete 5 µl unverdünnter Stammlösung pro Well. Für die nächste Verdünnungsstufe wurden 30 µl aus der unverdünnten Lösung mit 120 µl DEPC-gereinigtem Wasser versetzt, was einer Verdünnung von 1:5 entspricht. Hiervon wurden wiederum 5 µl pro Well eingesetzt. Nach demselben Schema wurde auch bei allen weiteren 1:5-Verdünnungsstufen verfahren. Dies wurde insgesamt 4 Mal durchgeführt (A1 - A5).

Für die relative Quantifizierung ist der C_T -Wert und der Logarithmus der DNA-Menge, die in der Ausgangskonzentration der Stammlösung bekannt war und

entsprechend dem jeweiligen Verdünnungsverhältnis abnahm, von entscheidender Bedeutung. Mithilfe der EXCEL-Diagrammfunktion (Scatter-Graph) wurden die einzelnen Standardkurven der Gene erstellt. Dabei wurden horizontal auf der X-Achse die logarithmisierten Werte der cDNA-Menge und auf der Y-Achse die Daten der C_T -Werte eingetragen. Die folgende Tabelle (**Tab. 2.9**) zeigt einen Ausschnitt aus dem EXCEL- Datenblatt. Die daraus resultierende Standardkurve, aus der die Funktion des Graphen abzulesen ist, gibt nebenstehende Abbildung (**Abb. 2.6**) beispielhaft für MRP1 wider. Sämtliche analog zu MRP1 erstellten Standardkurven für die untersuchten Gene und GAPDH sind im Anhang aufgeführt (**Kapitel 7.3**).

MRP1	ng	Log ng	Ct
	50	1,70	21,39
	50	1,70	21,62
	10	1,00	23,77
	10	1,00	23,85
	2	0,30	26,15
	2	0,30	26,39
	0,4	-0,40	29,02
	0,4	-0,40	29,75
	0,08	-1,10	31,68
	0,08	-1,10	31,64



Tab. 2.9: Wertetabelle zur Berechnung der Standardkurven am Beispiel MRP1

Abb. 2.6: Beispielhafte Darstellung einer Standardkurve (MRP1)

2.2.4.6 Durchführung der statistischen Auswertung

Standardkurven-Methode

Die durch die relative Standardkurven-Methode erhaltene Geradenfunktion ermöglicht die Berechnung der in den unbekanntenen Proben enthaltenen Ausgangskonzentration an RNA der jeweiligen Zielsequenzen aus den durch die Real Time RT-PCR gewonnenen C_T -Werten anhand nachfolgend aufgeführter Formeln.

$$y = mx + b \text{ (Geradenfunktion)}$$

$$\log \text{AusgangskonzentrationProbe} = [(C_T - \text{Wert Probe}) - b]/m$$

$$\text{AusgangskonzentrationProbe} = 10^{[\text{Zellen mit log Ausgangskonzentration}]}$$

Aus den beiden Werten des Doppelansatzes der logarithmisierten Ausgangskonzentrationen wurden die Zehnerpotenzen gebildet und anschließend der arithmetische Mittelwert gebildet, welcher ins Verhältnis zum jeweiligen Mittelwert der endogenen Kontrolle gesetzt wird, um die verschiedenen Ausgangskonzentrationen der Zielsequenzen der zu untersuchenden Fälle miteinander vergleichen zu können.

Die Standardabweichung der Quotienten beider Mittelwerte von der zu untersuchenden Gensequenz und dem Haushaltsgen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$cv = \sqrt{(cv_1^2 + cv_2^2)}$$

Um den Standardmessfehler zu minimieren, wurden alle Genexpressionsanalysen in Doppelansätzen untersucht. Eine Abweichung der C_T -Werte der Doppelbestimmungen untereinander von bis zu 0,5 (+/- 0,1) wurde toleriert, so dass die Maximalabweichung der Expressionslevel deutlich unter 25% blieb.

Bei höheren Abweichungen der einzelnen C_T -Werte wurde eine erneute Untersuchung der jeweiligen Patientenprobe vorgenommen.

Die Umrechnung der C_T -Werte der untersuchten Gene in Mittelwertverhältnisse zum Haushaltsgen GAPDH wurde mit der Microsoft® EXCEL Software (Version 2002)

entsprechend dem Protokoll von Applied Biosystems (Fa. PE Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Statistik

Für die statistische Auswertung der Untersuchung zur intratumoralen molekulargenetischen Heterogenität wurde der Friedman Test (Rangvarianzanalyse) herangezogen, um Unterschiede der Genexpressionslevel in den verschiedenen Tumorarealen auf Signifikanz hin zu überprüfen. Hierbei erfolgte ein Vergleich der Mediane der Genexpressionslevel in den fünf jeweils korrespondierenden Tumorarealen der 9 Fälle A - I. Die Tabellen **3.1 - 3.7** der jeweiligen Kapitel **3.2.1 - 3.2.7** geben die auf 2 Dezimalstellen gerundeten Mittelwerte und Mediane der relativen Genexpressionslevel der untersuchten Gene Caldesmon, DPD, ERCC4, Her2-/neu, MRP1, MTHFR und TP im Verhältnis zum Haushaltsgen GAPDH wider. In den entsprechenden Kapiteln erfolgt die graphische Darstellung in Form von 3-D-Säulendiagrammen. Die Rohdaten der relativen quantitativen Genexpressionlevel der einzelnen 5 verschiedenen Tumorareale der 9 untersuchten Tumoren, der Probebiopsien und des Normalgewebes geben die Tabellen **3.8 – 3.10** wider.

Der Fragestellung nach einer intertumoralen Heterogenität wurde mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA nachgegangen. In der Post-Hoc Analyse der Differenzen der Mittelwerte untereinander erfolgten außerdem Mehrfachvergleiche mit dem LSD-Test, jeweils 72 Einzelvergleiche pro untersuchtem Gen.

Neben der Untersuchung einer intra- und intertumoralen Heterogenität wurde darüber hinaus eine Korrelationsanalyse der Genexpressionslevel der gepoolten Probebiopsien mit den entsprechenden Einzelwerten der jeweils zugehörigen 5 topographisch fraktionierten Areale der 9 Primärtumoren unter Verwendung des Rangkorrelationskoeffizienten Spearman-Rho für nicht normalverteilte Stichproben durchgeführt. Die Rohdaten der relativen quantitativen Genexpressionlevel der gepoolten Probebiopsien gibt **Tab. 3.9** wider.

Um die unterschiedliche Anzahl an mRNA-Kopien in der PE und dem Primärtumor auf Signifikanz zu beurteilen, wurde außerdem der Wilcoxon Rangsummentest angewendet.

Die Berechnungen wurden unter Verwendung des SPSS Software Pakets Version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und Microsoft® EXCEL Software (Version 2002) durchgeführt.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Caldesmon

3.2.1.1 Intratumorale Heterogenität

Der Median der Expressionslevel des Strukturproteingens Caldesmon wies in den beiden oberflächlichen Tumorperipherien 3 und 6 einen Wert von 1,47 (Range 0,25 - 15,19) bzw. 1,05 (Range 0,25 - 12,21) bei einem arithmetischen Mittelwert von 2,88 ($\pm 4,69$) bzw. 2,33 ($\pm 3,75$) auf.

In den tiefen Tumorperipherien 4 und 5 lag der Median bei 0,84 (Range 0,35 - 16,10) bzw. 1,49 (Range 0,45 - 6,12) mit einem arithmetischen Mittelwert von 2,64 ($\pm 5,06$) bzw. 1,91 ($\pm 1,74$). Für das Tumorzentrum wurde ein Median von 1,28 (Range 0,36 - 15,57) und ein arithmetischer Mittelwert von 2,78 ($\pm 4,83$) ermittelt.

Im Normalgewebe war der Median der Genexpressionslevel mit 0,92 (Range 0,89 - 1,70) bzw. einem Mittelwert von 0,96 deutlich niedriger.

Patient	Mittelwert	Median	Range (Minimum – Maximum)
A	1,86	1,66	1,23 – 2,44
B	0,96	0,89	0,59 – 1,75
C	1,12	0,96	0,80 – 1,98
D	0,33	0,35	0,25 – 0,45
E	13,03	15,19	6,12 – 16,08
F	1,10	1,04	0,77 – 1,47
G	1,61	1,71	0,81 – 2,47
H	0,85	0,71	0,52 – 1,49
I	1,71	1,28	0,77 – 3,01

Tab. 3.1: Expressionslevel Caldesmon ($p= 0,840$ für Vorliegen einer intratumoralen Heterogenität)

Mit einer asymptotischen Signifikanz von $p= 0,840$ konnte keine intratumorale Heterogenität für die Expression von Caldesmon an Hand der 5 fraktionierten Tumorareale der 9 untersuchten Fälle aufgezeigt werden.

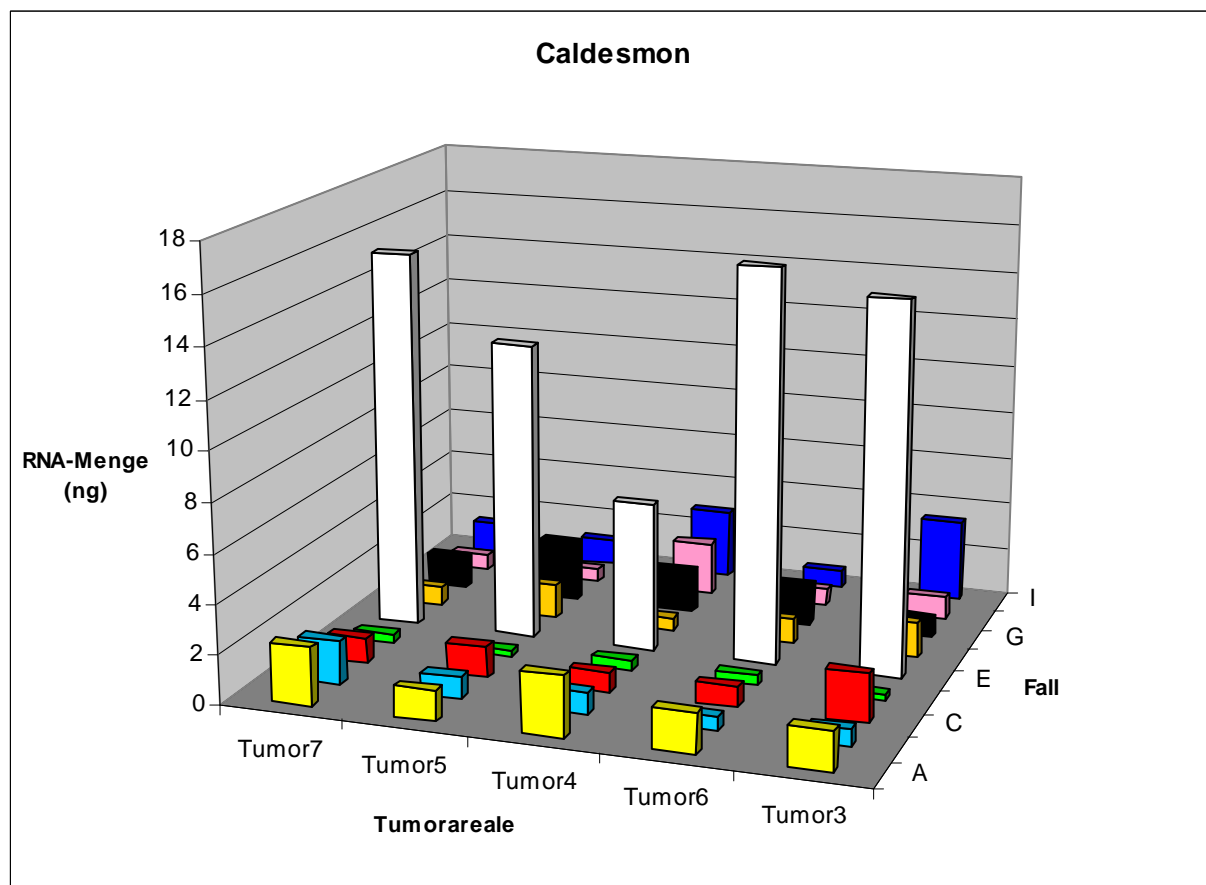


Abb. 3.1: 3-D-Säulendiagramm: Intratumorale Genexpressionslevel von Caldesmon (x-Achse: Tumor 3 + 6 = oberflächlich, Tumor 4 + 5 = tief, Tumor 7 = Zentrum; vgl. **Abb. 2.1**; y-Achse: mRNA-Menge in ng; z-Achse: Fälle A – I)

3.2.1.2 Intertumorale Heterogenität

Die Varianzanalyse (ANOVA) zeigte im Vergleich der einzelnen 9 untersuchten Fälle untereinander signifikant unterschiedliche Expressionslevel von Caldesmon ($F=36,427$; $p=0,000$).

Hierbei wies der Fall E zu allen anderen untersuchten Fällen in der Post-Hoc Analyse mittels LSD-Test signifikante Unterschiede der Genexpression von Caldesmon auf (A - I zu E, E zu allen anderen).

3.2.1.3 Korrelation von Tumor und PE

Die mittlere Expression von Caldesmon in der PE lag bei 1,96 (0,54 - 6,64) und einem Median von 1,00. Demgegenüber wurde im Tumorgewebe der 9 untersuchten Fälle eine mittlere Genexpression von 2,51 (0,33 - 13,03) und ein Median von 1,04 vorgefunden.

Zwischen der PE und dem Tumorgewebe, welches pro untersuchtem Patienten 5 fraktionierte Tumorareale umfasste und somit insgesamt 45 verschiedene Tumorgewebsproben beinhaltete, konnte mit einem Wert von 0,426 ($p = 0,04$) eine signifikante schwache positive Rangkorrelation nach Spearman aufgezeigt werden.

In der Mehrzahl der Fälle (B, C, D, F, H) lagen in den Probebiopsien höhere Genexpressionslevel von Caldesmon als in den einzelnen Tumorarealen vor (**Kapitel 3.3**). Dies war nach dem Wilcoxon Test auf einem 2-seitigen Niveau von 0,05 allerdings nicht signifikant ($Z = -0,652$; $p = 0,514$).

Der Wilcoxon Rangsummentest ergab für Caldesmon ebenfalls keinen signifikanten Unterschied der Expressionslevel in der PE und dem Median des Primärtumors ($Z = -0,283$; $p = 0,777$).

3.2.2 DPD

3.2.2.1 Intratumorale Heterogenität

Der Median der Expressionslevel für DPD in den oberflächlichen Tumorperipherien 3 und 6 betrug 56,41 (Range 33,63 - 117,90) bzw. 47,74 (Range 26,96 - 205,78) mit einem arithmetischen Mittelwert von 59,33 ($\pm 27,58$) bzw. 67,07 ($\pm 56,57$).

In den tiefen Tumorperipherien 4 und 5 wurde ein Median von 45,27 (Range 16,78 - 140,70) bzw. 47,65 (Range 25,32 - 138,91) mit einem arithmetischen Mittelwert von 58,22 ($\pm 37,76$) bzw. 67,51 ($\pm 41,10$) gefunden.

Das Tumorzentrum wies einen Median von 45,54 (Range 21,59 - 173,64) und einen arithmetischen Mittelwert von 58,22 ($\pm 46,85$) auf.

Im Normalgewebe zeigten sich mit einem Median von 79,08 (Range 29,40 - 160,18) bzw. Mittelwert von 83,94 höhere Expressionslevel von DPD.

Patient	Mittelwert	Median	Range (Minimum – Maximum)
A	52,66	56,27	29,61 – 68,78
B	38,49	38,92	24,31 – 46,69
C	82,96	78,75	73,71 – 100,32
D	40,31	40,94	33,63 – 45,54
E	41,44	34,86	21,59 – 85,08
F	43,08	34,25	25,32 – 64,40
G	155,38	140,70	117,90 – 205,78
H	69,96	58,11	53,92 – 130,75
I	34,36	39,53	16,78 – 47,65

Tab. 3.2: Expressionslevel DPD ($p = 0,840$ für Vorliegen einer intratumoralen Heterogenität)

Auch für die Expression von DPD konnte bei einer asymptotischen Signifikanz von $p = 0,840$ kein Nachweis einer intratumoralen Heterogenität in den 9 untersuchten Fällen erbracht werden.

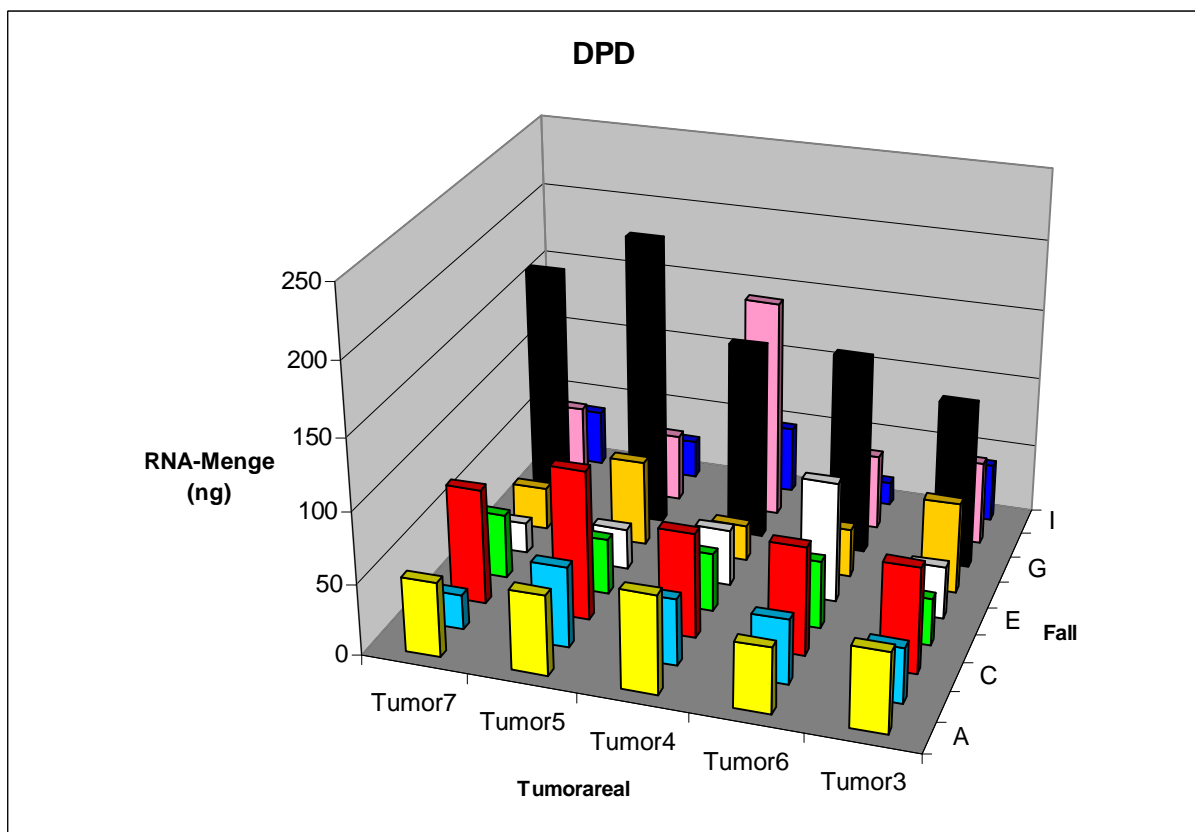


Abb. 3.2: 3-D-Säulendiagramm: Intratumorale Genexpressionslevel von DPD

(x-Achse: Tumor 3 + 6 = oberflächlich, Tumor 4 + 5 = tief, Tumor 7 = Zentrum; vgl. **Abb. 2.1**;
y-Achse: mRNA-Menge in ng; z-Achse: Fall A – I)

3.2.2.2 Intertumorale Heterogenität

Die Varianzanalyse (ANOVA) ergab für die Expressionslevel von DPD eine signifikante intertumorale Heterogenität der 9 untersuchten Fälle ($F = 17,128$; $p = 0,000$).

Signifikante Unterschiede der Expression von DPD zwischen den einzelnen Tumoren konnten in folgenden Fällen aufgezeigt werden: Fall A zu C und H, Fall B zu C, H und I, Fall C zu A-G und I, Fall D zu C, G und H, Fall E zu C, G und H, Fall F zu C, G und H, Fall G zu allen anderen Fällen, Fall H zu allen außer A und C, Fall I zu C und H.

3.2.2.3 Korrelation von Tumor und PE

In der PE lag die mittlere Expression von DPD bei 49,53 (12,34 - 91,96) und einem Median von 57,07. Demgegenüber wurde im Tumorgewebe der 9 untersuchten Fälle eine mittlere DPD-Genexpression von 62,07 (34,36 - 155,38) und ein Median von 40,94 vorgefunden.

Zwischen der PE und dem Tumorgewebe konnte mit einem Wert von 0,241 ($p = 0,110$) auf einem 2-seitigen Niveau von 0,05 keine signifikante Rangkorrelation nach Spearman aufgezeigt werden.

Lediglich in 3 Fällen (E, F, H) lagen mehrheitlich höhere Genexpressionslevel von DPD in den Probebiopsien als im Tumorgewebe vor. Die Tumoreareale der übrigen untersuchten Fälle wiesen zum Teil deutlich höhere Expressionslevel auf als die korrespondierende PE (**Kapitel 3.3**).

Der Wilcoxon Rangsummentest hingegen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genexpressionslevel von DPD zwischen der PE und dem Median des Tumorgewebes ($Z = -0,844$; $p = 0,398$).

3.2.3 ERCC4

3.2.3.1 Intratumorale Heterogenität

Die oberflächlichen Tumorperipherien 3 und 6 wiesen in der Untersuchung der Expressionslevel von ERCC4 einen Median von 1,19 (Range 0,37 - 2,30) bzw. 0,75 (Range 0,32 - 3,17) bei einem arithmetischen Mittelwert von 1,24 (\pm 0,62) bzw. 1,33 (\pm 1,15) auf. Für die tiefen Tumorperipherien 4 und 5 wurde ein Median von 0,94 (Range 0,44 - 2,07) bzw. 0,812 (Range 0,26 - 1,97) bei einem arithmetischen Mittelwert von 1,07 (\pm 0,61) bzw. 0,96 (\pm 0,56) ermittelt.

Im Tumorzentrum wurde ein Median von 0,83 (Range 0,31 - 2,59) und ein arithmetischer Mittelwert von 1,04 (\pm 0,81) vorgefunden.

Das Normalgewebe wies mit einem Median von 0,69 (Range 0,45 - 1,41) bzw. Mittelwert von 0,79 eine etwas niedrigere Genexpression von ERCC4 auf.

Patient	Mittelwert	Median	Range (Minimum – Maximum)
A	1,58	1,33	0,83 – 3,17
B	0,36	0,37	0,26 – 0,44
C	0,81	0,57	0,32 – 1,91
D	0,73	0,81	0,41 – 1,01
E	2,07	2,30	1,07 – 2,61
F	0,62	0,59	0,30 – 1,06
G	1,93	2,07	1,29 – 2,71
H	1,40	1,47	0,75 – 1,97
I	0,67	0,65	0,49 – 0,95

Tab. 3.3: Expressionslevel von ERCC4 ($p = 0,885$ für Vorliegen einer intratumoralen Heterogenität)

Mit einer asymptotischen Signifikanz von $p = 0,885$ konnte für ERCC4 bei nicht signifikant unterschiedlichen Genexpressionsmustern der einzelnen Tumorareale keine intratumorale Heterogenität aufgezeigt werden.

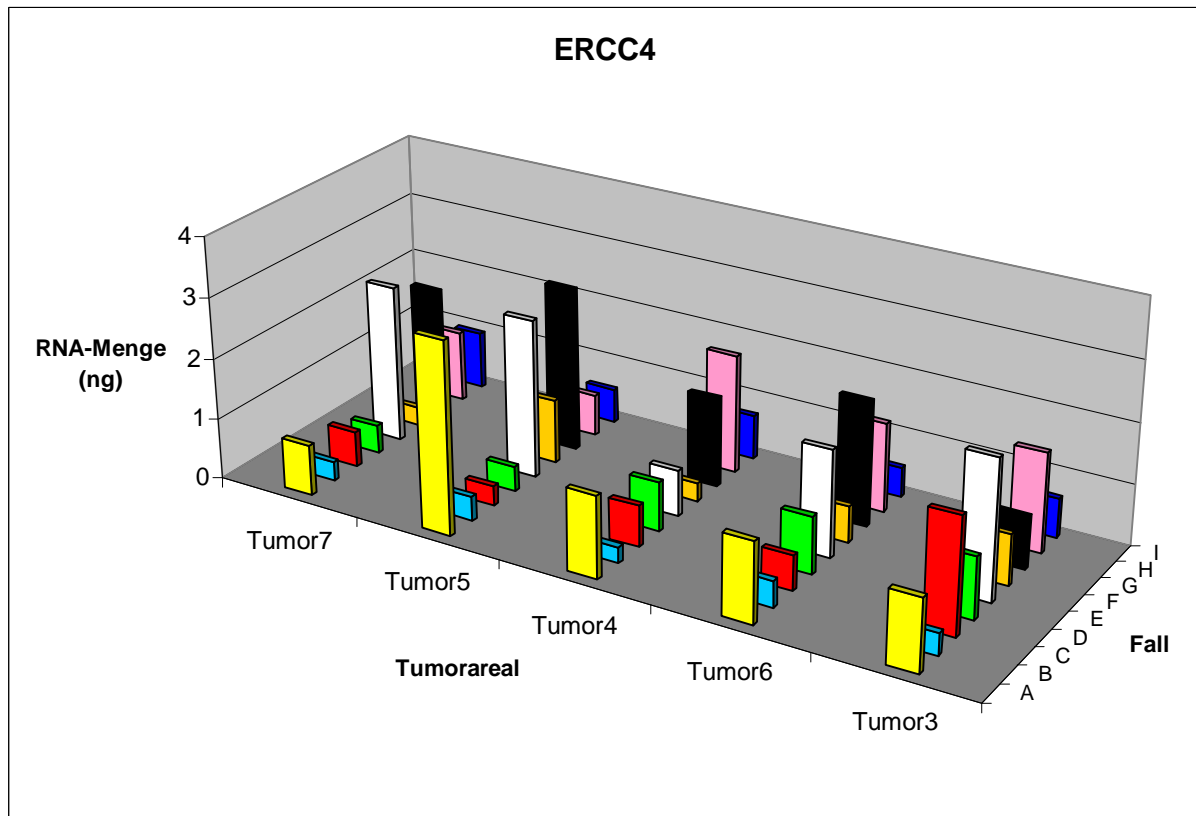


Abb. 3.3: 3-D-Säulendiagramm: Intratumorale Genexpressionslevel von ERCC4
 (x-Achse: Tumor 3 + 6 = oberflächlich, Tumor 4 + 5 = tief, Tumor 7 = Zentrum; vgl. **Abb. 2.1**;
 y-Achse: mRNA-Menge in ng; z-Achse: Fall A – I)

3.2.3.2 Intertumorale Heterogenität

Die Varianzanalyse der 9 untersuchten Fälle zeigte signifikant unterschiedliche Expressionslevel von ERCC4 ($F = 7,285$; $p = 0,000$).

Die Mehrfachvergleiche im LSD-Test der Post-Hoc Analyse zeigten folgende signifikante intertumorale Unterschiede auf: Fall A zu B, C, D, F, I, Fall B zu A, E, G, H, Fall C zu A, E, G, Fall D zu A, E, G, H, Fall E zu B, C, D, F, H, I, Fall F zu A, E, G, H, Fall G zu B, C, D, F, I, Fall H zu B, D, E, F, I und Fall I zu A, E, G, H.

3.2.3.3 Korrelation von Tumor und PE

ERCC4 wies in der PE eine mittlere Expression von 1,68 (0,55 - 2,55) und einen Median von 1,65 auf. Für das Tumorgewebe der 9 untersuchten Fälle wurde eine mittlere Genexpression von ERCC4 von 1,13 (0,36 - 2,07) und ein Median von 0,81 vorgefunden.

Der Rangkorrelationskoeffizient Spearman-Rho ergab auf einem 2-seitigen Niveau von 0,01 mit einem Wert von 0,558 ($p = 0,000$) eine statistisch hochsignifikante schwache positive Korrelation zwischen den Expressionslevel von ERCC4 in der PE und dem Tumorgewebe.

In der Mehrzahl sämtlicher untersuchter Fälle A - I lagen in den Probebiopsien höhere Genexpressionslevel von ERCC4 vor als in den einzelnen Tumorealen (**Kapitel 3.3**). Dies war im Wilcoxon Test statistisch signifikant ($Z = -2,547$; $p = 0,011$).

Der Wilcoxon Rangsummentest ergab allerdings keinen signifikanten Unterschied der Expressionslevel von ERCC4 zwischen der PE und dem Median des Primärtumors ($Z = -0,187$; $p = 0,852$).

3.2.4 Her2-/neu

3.2.4.1 Intratumorale Heterogenität

Der Median für die Genexpressionslevel von Her2-/neu in den oberflächlichen Tumorperipherien 3 und 6 betrug 3,74 (Range 0,40 - 110,88) bzw. 2,45 (Range 0,96 - 132,61) mit einem arithmetischen Mittelwert von 16,66 ($\pm 35,92$) bzw. 18,52 ($\pm 43,09$). Für die tiefen Tumorperipherien 4 und 5 wurde ein Median von 3,85 (Range 0,99 - 108,50) bzw. 3,20 (Range 0,31 - 128,71) bei einem arithmetischen Mittelwert von 16,86 ($\pm 35,10$) bzw. 17,17 ($\pm 41,89$) ermittelt.

Das Tumorzentrum wies einen Median von 2,70 (Range 1,40 - 86,56) und einen arithmetischen Mittelwert von 13,01 ($\pm 27,81$) auf.

Im Normalgewebe wurde ein Median von 4,68 (Range 2,45 – 8,23) bzw. Mittelwert von 4,64 vorgefunden.

Patient	Mittelwert	Median	Range (Minimum – Maximum)
A	113,45	110,88	86,56 – 132,61
B	1,41	1,45	1,02 – 1,65
C	2,18	2,39	1,65 – 2,73
D	3,78	4,13	1,83 – 4,63
E	3,83	3,91	2,70 – 4,57
F	16,87	17,57	8,54 – 23,88
G	4,20	4,37	3,20 – 5,30
H	1,45	1,40	0,96 – 1,87
I	0,87	0,99	0,31 – 1,49

Tab. 3.4: Expressionslevel von Her2-/neu ($p = 0,856$ für Vorliegen einer intratumoralen Heterogenität)

Mittels Rangvarianzanalyse konnte bei einer asymptotischen Signifikanz von $p = 0,856$ auch für die Genexpression des Tyrosinkinase-Rezeptors Her2-/neu kein signifikanter Nachweis für das Vorliegen einer intratumoralen Heterogenität anhand der untersuchten 5 topographisch fraktionierten Tumoreale der 9 Primärtumoren erbracht werden.

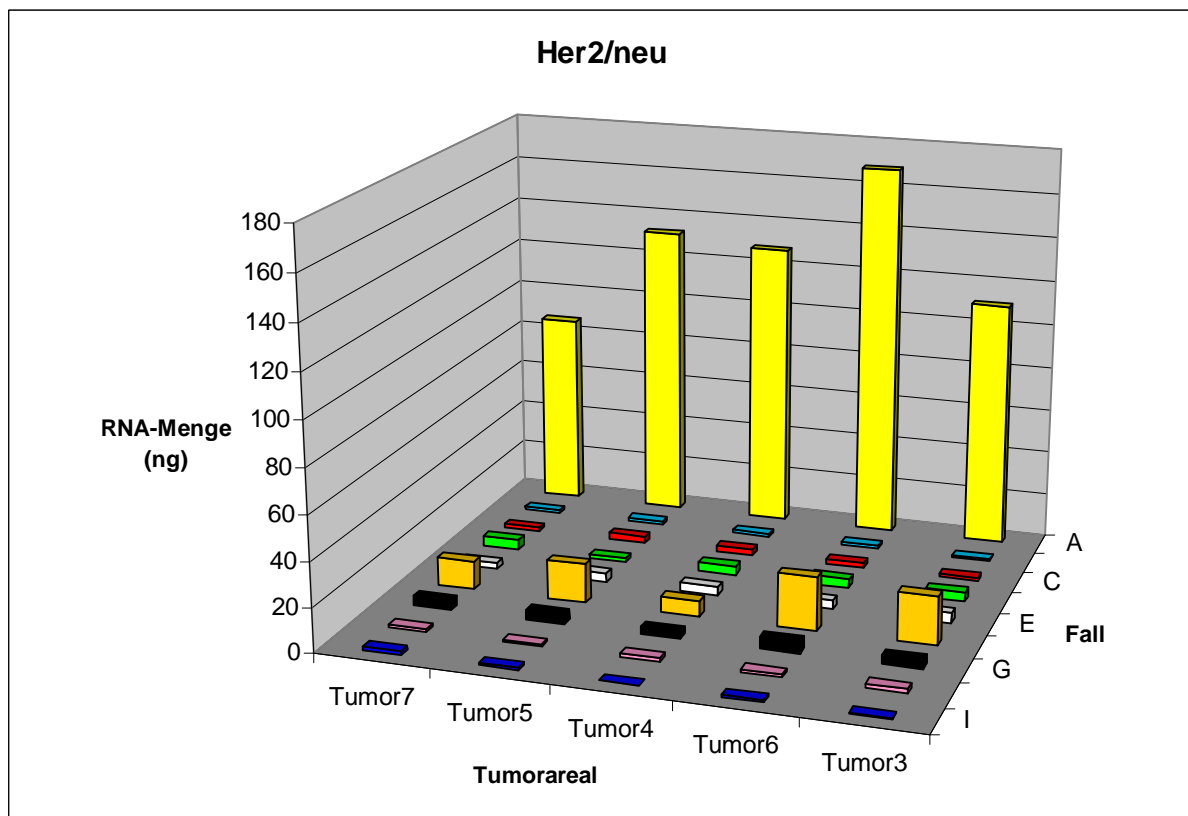


Abb. 3.4: 3-D-Säulendiagramm: Intratumorale Genexpressionslevel von Her2-/neu

(x-Achse: Tumor 3 + 6 = oberflächlich, Tumor 4 + 5 = tief, Tumor 7 = Zentrum; vgl. **Abb. 2.1**;
y-Achse: mRNA-Menge in ng; z-Achse: Fall A - I)

3.2.4.2 Intertumorale Heterogenität

In der Varianzanalyse (ANOVA) der 9 untersuchten Fälle zeigten sich für Her2-/neu signifikant unterschiedliche Expressionslevel ($F = 159,072$; $p = 0,000$).

Bei den untersuchten Fällen A und F waren aus immunhistochemischen Voruntersuchungen Überexpressionen von Her2-/neu bekannt.

Dies bestätigte sich auch anhand der mittels Real Time RT-PCR erhobenen Ergebnisse. So konnten in folgenden Mehrfachvergleichen signifikante Unterschiede der Expression von Her2-/neu zwischen den einzelnen Tumoren aufgezeigt werden: Fall A zu allen anderen, Fall B zu A und F, Fall C zu A und F, Fall D zu A und F, Fall E zu A und F, Fall F zu allen anderen, Fall G zu A und F, Fall H zu A und F sowie Fall I zu A und F. Die beiden Fälle A und F wiesen eine um ein Vielfaches höhere Expression von Her2-/neu auf, wobei allerdings darüber hinaus eine im Vergleich beider Fälle untereinander ebenfalls signifikante intertumorale Heterogenität vorlag, was anhand der vorbekannten immunhistochemischen Her2-/neu Positivität dieser beiden Fälle nicht ersichtlich war.

3.2.4.3 Korrelation von Tumor und PE

In der PE lag für Her2-/neu die mittlere Expression bei 33,92 (1,42 - 246,20) und einem Median von 3,49. Das Tumorgewebe der 9 untersuchten Fälle wies eine mittlere Genexpression von 16,45 (0,87 - 113,45) und einen Median von 3,91 auf.

Zwischen der PE und dem Tumorgewebe konnte mit einem Wert von 0,829 ($p = 0,000$) eine hochsignifikante sehr starke positive Rangkorrelation nach Spearman aufgezeigt werden.

Bis auf Fall G lagen in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle in den Probiopsien höhere Genexpressionslevel von Her2-/neu als in den 5 verschiedenen Tumorebenen der korrespondierenden Tumorgewebe vor (**Kapitel 3.3**). Im Wilcoxon Test wurde dies als statistisch signifikant befunden ($Z = -2,073$; $p = 0,038$).

Der Wilcoxon Rangsummentest ergab zwischen der PE und dem Median des Primärtumors für die Her2-/neu-Expression hingegen keinen signifikanten Unterschied ($Z = -0,431$; $p = 0,666$).

3.2.5 MRP1

3.2.5.1 Intratumorale Heterogenität

Die Expressionslevel von MRP1 wiesen in den 9 untersuchten Fällen in den oberflächlichen Tumorarealen 3 und 6 einen Median von 0,94 (Range 0,41 - 1,27) bzw. 0,90 (Range 0,44 - 2,61) und einen arithmetischen Mittelwert von 0,92 ($\pm 0,31$) bzw. 1,10 ($\pm 0,73$) auf. In den tiefen Tumorperipherien 4 und 5 lag der Median bei 0,64 (Range 0,38 - 3,12) bzw. 0,87 (Range 0,33 - 1,97) und der arithmetische Mittelwert bei 1,05 ($\pm 0,90$) bzw. 0,81 ($\pm 0,52$).

Das Tumorzentrum zeigte einen medianen Expressionslevel von 0,59 (Range 0,30 - 1,82) und einen arithmetischen Mittelwert von 0,71 ($\pm 0,45$).

Eine etwas höhere Expression von MRP1 wies das Normalgewebe mit einem Median von 1,19 (Range 0,95 - 1,80) bzw. einem Mittelwert von 1,29 auf.

Patient	Mittelwert	Median	Range (Minimum – Maximum)
A	1,18	1,18	0,67 - 1,94
B	0,52	0,54	0,30 - 0,76
C	0,97	1,01	0,63 - 1,27
D	0,72	0,58	0,44 - 1,17
E	1,05	1,04	0,33 - 1,84
F	0,65	0,73	0,34 - 0,91
G	2,09	1,97	0,94 - 3,12
H	0,65	0,64	0,50 - 0,87
I	0,45	0,41	0,34 - 0,56

Tab. 3.5: Expressionslevel von MRP1 ($p = 0,085$ für das Vorliegen einer intratumoralen Heterogenität)

Mit einer im Vergleich zu allen anderen Expressionslevel niedrigsten asymptotischen Signifikanz von $p = 0,085$ konnte für die Genexpression von MRP1 ebenfalls keine intratumorale Heterogenität in den 5 unterschiedlichen Tumorarealen nachgewiesen werden.

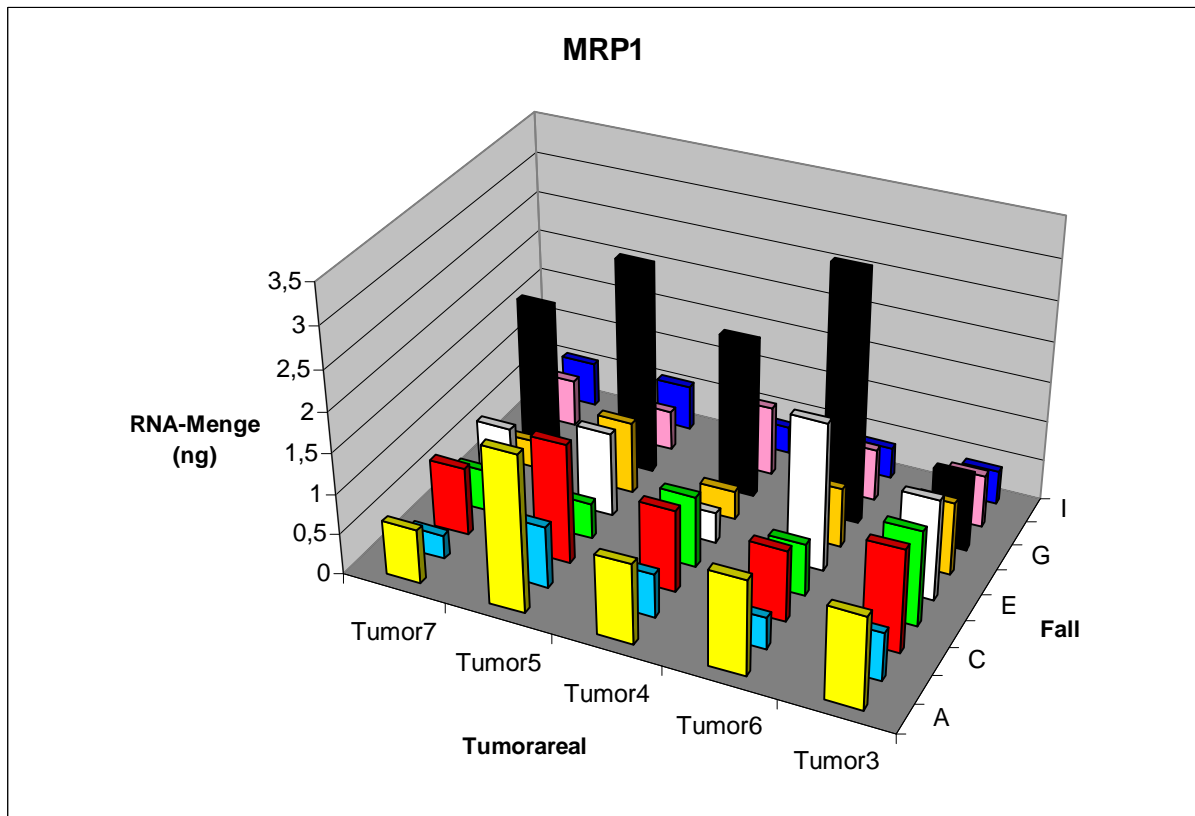


Abb. 3.5: 3-D-Säulendiagramm: Intratumorale Genexpressionslevel von MRP1
 (x-Achse: Tumor 3 + 6 = oberflächlich, Tumor 4 + 5 = tief, Tumor 7 = Zentrum; vgl. **Abb. 2.1**;
 y-Achse: mRNA-Menge in ng; z-Achse: Fall A – I)

3.2.5.2 Intertumorale Heterogenität

Die Varianzanalyse ergab für die Expression von MRP1 signifikante Unterschiede in den 9 untersuchten Fällen ($F = 7,523$; $p = 0,000$).

Folgende Mehrfachvergleiche in der Post-Hoc Analyse mittels LSD-Test ergaben signifikante Unterschiede der Expression von MRP1 zwischen den einzelnen Tumoren: Fall A zu B, F, G, H und I, Fall B zu A, D und G, Fall C und D jeweils zu G, Fall E zu B, G und I, Fall F zu A und G, Fall G zu allen anderen, Fall H zu A und G sowie Fall I zu A, E und G.

Der Fall G zeigte im Vergleich zu allen anderen untersuchten Fällen signifikant unterschiedliche Expressionslevel von MRP1, während für die übrigen bis auf die Fälle C und D mindestens 2 andere untersuchte Tumore signifikante Unterschiede aufwiesen.

3.2.5.3 Korrelation von Tumor und PE

Die PE wies für MRP1 eine mittlere Expression von 2,09 (1,21 - 3,75) und einen Median von 1,95 auf. Im Tumorgewebe der 9 Fälle lagen eine mittlere Genexpression von 0,92 (0,45 – 2,09) und ein Median von 0,73 vor.

Zwischen der PE und dem Tumorgewebe konnte mit einem Wert von 0,428 ($p = 0,003$) eine hochsignifikante schwache positive Rangkorrelation zwischen der PE und dem Primärtumor aufgezeigt werden.

Bis auf Fall G, hier lagen in 2 der 5 topographisch fraktionierten Tumorareale höhere Expressionswerte von MRP1 im Vergleich zu der korrespondierenden PE vor, zeigte sich in allen anderen 8 Fällen ein höheres Genexpressionsniveau von MRP1 in der PE als in den jeweils zugehörigen 5 verschiedenen Tumorarealen (**Kapitel 3.3**).

Dies war nach dem Wilcoxon Test auf einem 2-seitigen Niveau von 0,05 signifikant ($Z = -2,547$; $p = 0,011$).

Der Wilcoxon Rangsummentest ergab keinen signifikanten Unterschied der Genexpressionslevel von MRP1 zwischen PE und Primärtumor bei entsprechend gleich vielen positiven wie negativen Rängen ($Z = 0,000$; $p = 1,000$).

3.2.6 MTHFR

3.2.6.1 Intratumorale Heterogenität

Die Genexpressionslevel von MTHFR wiesen in den oberflächlichen Tumorperipherien 3 und 6 Mediane von 1,34 (Range 0,39 - 6,45) bzw. 1,13 (Range 0,12 - 3,13) und arithmetische Mittelwerte von 1,85 ($\pm 1,94$) bzw. 1,40 ($\pm 0,94$) auf.

Für die tiefen Tumorperipherien 4 und 5 ergaben sich Mediane von 1,31 (Range 0,38 - 3,96) bzw. 1,40 (Range 0,37 - 2,55) bei arithmetischen Mittelwerten von 1,34 ($\pm 1,15$) bzw. 1,37 ($\pm 0,66$). Das Tumorzentrum zeigte einen Median von 1,13 (Range 0,14 - 2,74) bei einem arithmetischen Mittelwert von 1,23 ($\pm 0,82$) auf.

Das Normalgewebe wies einen im Vergleich zu den einzelnen 5 fraktionierten Tumorarealen niedrigeren Median von 1,10 (Range 0,51 - 1,92) bzw. einen Mittelwert von 1,08 auf.

Patient	Mittelwert	Median	Range (Minimum – Maximum)
A	1,96	1,61	1,59 – 3,13
B	0,47	0,42	0,14 – 0,94
C	2,00	1,97	1,52 – 3,14
D	0,50	0,43	0,12 – 0,87
E	3,60	2,74	2,29 – 6,45
F	1,23	1,13	0,77 – 1,81
G	1,54	1,62	0,56 – 2,01
H	0,66	0,48	0,38 – 1,40
I	0,99	0,96	0,58 – 1,34

Tab. 3.6: Expressionslevel von MTHFR ($p = 0,318$ für Vorliegen einer intratumoralen Heterogenität)

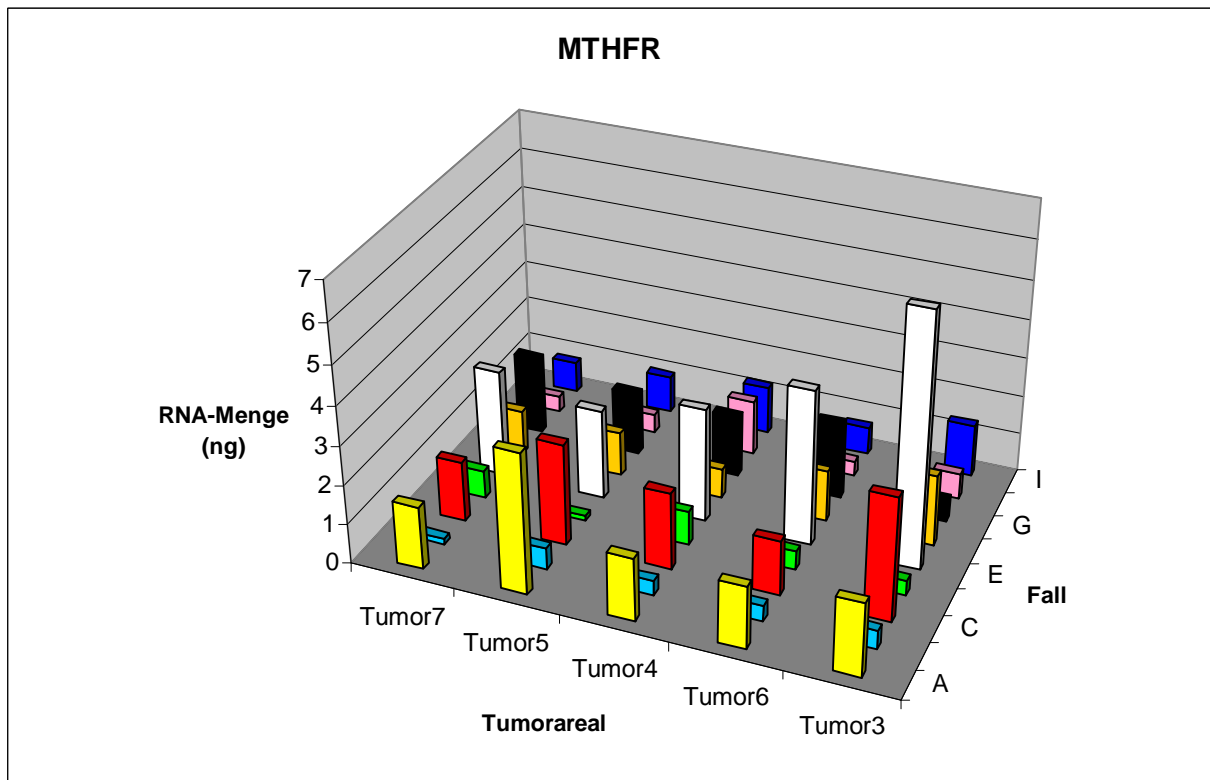


Abb. 3.6: 3-D-Säulendiagramm: Intratumorale Genexpressionslevel von MTHFR

(x-Achse: Tumor 3 + 6 = oberflächlich, Tumor 4 + 5 = tief, Tumor 7 = Zentrum; vgl. **Abb. 2.1**;
y-Achse: mRNA-Menge in ng; z-Achse: Fall A – I)

Die 5 topographisch fraktionierten Tumorareale der 9 Fälle wiesen keine signifikant unterschiedliche Expression von MTHFR auf und mittels Rangvarianzanalyse konnte bei einer asymptotischen Signifikanz von $p = 0,318$ kein signifikanter Nachweis für das Vorliegen einer intratumoralen Heterogenität erbracht werden.

3.2.6.2 Intertumorale Heterogenität

Die Varianzanalyse ANOVA wies eine signifikant unterschiedliche Expression von MTHFR in den 9 untersuchten Fällen auf ($F = 9,296$; $p = 0,000$).

Mehrfachvergleiche der Genexpression von MTHFR ergaben folgende signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tumoren: Fall A zu B, D, E, H und I, Fall B zu A, C, E und G, Fall C zu B, D, H und I, Fall D zu A, C, E und G, Fall E zu allen anderen, Fall F zu E, Fall G zu B, D und E, Fall H zu A, C und E sowie Fall I zu A, C und E.

3.2.6.3 Korrelation von Tumor und PE

MTHFR wies in der PE eine mittlere Expression von 2,34 (0,44 - 6,14) und einen Median von 1,61 auf. Für die einzelnen Areale der Primärtumoren der 9 untersuchten Fälle wurde eine mittlere MTHFR-Genexpression von 1,44 (0,47 - 3,60) und ein Median von 1,13 ermittelt. Der Rangkorrelationskoeffizient Spearman-Rho wies mit einem Wert von 0,478 ($p = 0,001$) eine hochsignifikante schwache positive Korrelation zwischen der PE und dem Tumorgewebe auf.

Die Genexpressionslevel von MTHFR waren in den Probebiopsien in der überwiegenden Mehrzahl der untersuchten Fälle höher als in den jeweils zugehörigen 5 fraktionierten Tumorarealen. Ausnahmen hiervon zeigten sich lediglich für die Fälle G und I, wobei hier allerdings in jedem einzelnen der 5 fraktionierten Tumorareale zum Teil deutlich höhere Genexpressionslevel als in der korrespondierenden PE vorlagen (**Kapitel 3.3**). Der Wilcoxon Test war jedoch statistisch nicht signifikant ($Z = -1,599$; $p = 0,110$).

Anhand des Wilcoxon Rangsummentests ließ sich für die Expression von MTHFR kein signifikanter Unterschied zwischen PE und Primärtumor aufzeigen ($Z = -0,211$; $p = 0,833$).

3.2.7 TP

3.2.7.1 Intratumorale Heterogenität

In den oberflächlichen Tumorarealen 3 und 6 wiesen die TP-Expressionslevel Mediane von 49,39 (Range 36,81 - 188,41) bzw. 56,11 (Range 15,26 - 106,85) und arithmetische Mittelwerte von 75,85 ($\pm 53,36$) bzw. 55,21 ($\pm 27,98$) auf.

Für die tiefen Tumorareale 4 und 5 zeigten sich Mediane von 42,27 (Range 21,33 - 94,35) bzw. 39,86 (Range 19,81 - 296,75) bei arithmetischen Mittelwerten von 53,04 ($\pm 22,21$) bzw. 69,53 ($\pm 86,97$).

Der Median des Tumorzentrums lag bei 53,88 (Range 16,27 - 81,27) mit einem arithmetischen Mittelwert von 45,47 ($\pm 23,86$).

Mit einem Median von 26,97 (Range 5,07 - 43,03) bzw. Mittelwert von 25,19 wurden im Normalgewebe deutlich niedrigere Expressionslevel vorgefunden.

Patient	Mittelwert	Median	Range (Minimum – Maximum)
A	35,02	21,89	19,21 - 63,22
B	45,67	48,48	23,20 - 66,20
C	62,98	62,61	46,45 - 81,27
D	31,07	29,02	19,81 - 47,90
E	65,73	57,45	15,26 - 145,31
F	61,61	56,68	39,86 - 106,85
G	49,45	53,88	27,05 - 66,93
H	139,80	82,29	62,01 - 296,75
I	47,13	40,73	34,18 - 67,66

Tab. 3.7: Expressionslevel von TP ($p = 0,679$ für das Vorliegen einer intratumoralen Heterogenität)

Die Rangvarianzanalyse der Expression von TP ergab bei einer asymptotischen Signifikanz von $p = 0,679$ keinen signifikanten Nachweis für das Vorliegen einer intratumoralen Heterogenität.

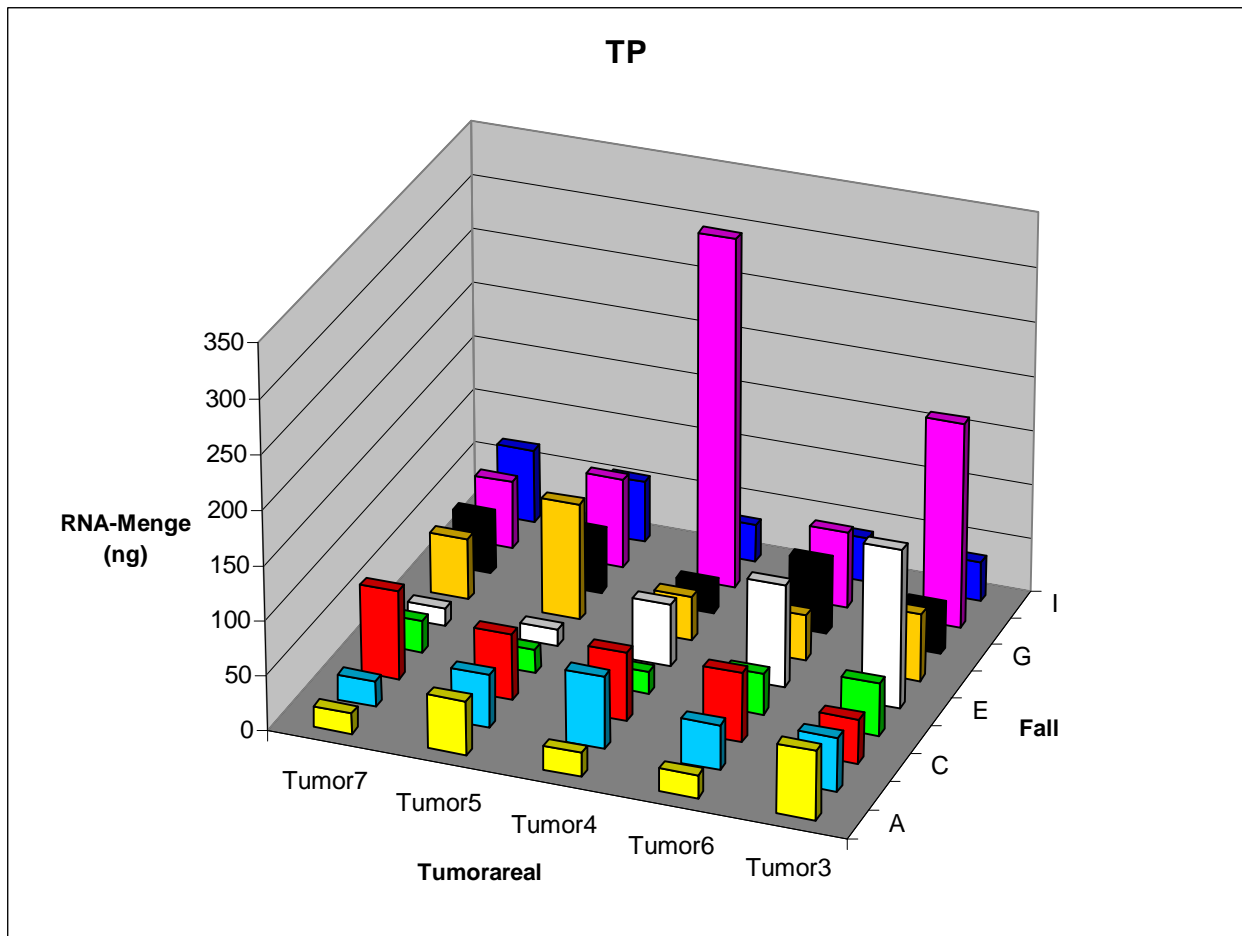


Abb. 3.7: 3-D-Säulendiagramm: Intratumorale Genexpressionslevel von TP (x-Achse: Tumor 3 + 6 = oberflächlich, Tumor 4 + 5 = tief, Tumor 7 = Zentrum; vgl. **Abb. 2.1**; y-Achse: mRNA-Menge in ng; z-Achse: Fall A – I)

3.2.7.2 Intertumorale Heterogenität

Für die Expressionslevel von TP zeigten sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA signifikante Unterschiede zwischen den 9 untersuchten Fällen ($F = 3,037$; $p = 0,010$).

Die untersuchten Fälle A - G sowie I wiesen im Vergleich zum Fall H eine signifikant unterschiedliche Genexpression für TP auf (A: $p = 0,000$; B: $p = 0,001$; C: $p = 0,006$; D: $p = 0,000$; E: $p = 0,008$; F: $p = 0,005$; G: $p = 0,001$; I: $p = 0,001$). In allen anderen Mehrfachvergleichen der Post-Hoc Analyse mittels LSD-Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Expressionslevel von TP in Bezug auf eine intertumoralen Heterogenität.

3.2.7.3 Korrelation von Tumor und PE

Die mittlere Expression von TP in der PE lag bei 71,02 (12,01 - 190,19) und einem Median von 40,90. Im Tumorgewebe der 9 untersuchten Fälle wurden eine mittlere TP-Genexpression von 59,83 (31,07 - 139,80) und ein Median von 53,88 vorgefunden.

Zwischen der PE und den insgesamt 45 einzelnen Tumorarealen konnte mit einem Rangkorrelationskoeffizienten von 0,400 ($p = 0,006$) auf einem 2-seitigen Niveau von 0,01 eine hochsignifikante schwache positive Korrelation nach Spearman aufgezeigt werden.

Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Genen zeigte sich mehrheitlich ein niedrigeres Expressionslevel von TP in den Probenbiopsien im Vergleich zu allen jeweils zugehörigen Tumorarealen (C, D, F, G, I). So wiesen lediglich die Fälle B und E durchweg und die Fälle A und H mehrheitlich höhere TP-Expressionswerte auf als das korrespondierende Tumorgewebe (**Kapitel 3.3**).

Der Wilcoxon Rangsummentest zeigte für die Expressionslevel von TP keine signifikanten Unterschiede zwischen PE und Primärtumor auf ($Z = -0,213$; $p = 0,831$).

3.3 Tabellen der Rohdaten

Genexpressionslevel der topographisch fraktionierten Tumorareale

Fall	MRP1	Caldesmon	DPD	ERCC4	Her2neu	MTHFR	TP
A3	1,130	1,599	56,415	1,193	110,879	1,867	63,222
A4	1,177	1,655	29,610	1,333	108,497	1,593	21,334
A5	0,989	2,442	68,779	1,352	128,707	1,613	21,892
A6	1,944	1,227	56,266	3,169	132,611	3,125	49,459
A7	0,669	2,353	52,234	0,833	86,555	1,605	19,206
B3	0,593	0,680	38,923	0,366	1,021	0,483	49,393
B4	0,384	0,585	45,269	0,437	1,349	0,417	41,088
B5	0,540	0,888	46,687	0,259	1,447	0,368	66,196
B6	0,764	0,897	37,274	0,398	1,646	0,940	48,476
B7	0,295	1,753	24,314	0,322	1,562	0,142	23,199
C3	1,267	1,983	85,707	1,909	1,652	3,137	46,446
C4	0,627	0,838	76,291	0,573	2,393	1,398	63,740
C5	1,014	0,796	73,714	0,683	2,733	1,972	62,611
C6	1,133	0,964	100,322	0,322	2,447	1,984	60,824
C7	0,822	1,011	78,751	0,570	1,650	1,524	81,273
D3	1,171	0,249	33,625	1,011	4,245	0,387	47,902
D4	0,576	0,351	42,119	0,939	4,126	0,426	37,404
D5	0,883	0,449	40,938	0,812	4,048	0,869	19,812
D6	0,444	0,251	39,303	0,409	1,834	0,116	21,226
D7	0,514	0,361	45,541	0,461	4,630	0,694	29,023
E3	1,242	15,192	36,847	2,298	4,570	6,453	145,306
E4	1,836	16,084	85,083	1,757	3,849	3,963	94,354
E5	0,331	6,121	34,856	1,074	3,914	2,545	57,447
E6	1,044	12,205	28,828	2,612	4,108	2,285	15,256
E7	0,779	15,569	21,590	2,586	2,697	2,740	16,268
F3	0,905	1,472	64,402	0,834	21,571	1,806	61,906
F4	0,732	1,038	34,247	0,592	23,879	1,309	42,270
F5	0,357	0,804	25,318	0,297	8,537	0,766	39,862
F6	0,905	1,397	61,129	1,058	17,565	1,133	106,854
F7	0,342	0,773	30,282	0,306	12,774	1,133	56,678
G3	0,935	0,810	117,895	1,286	3,736	0,560	43,259
G4	3,124	1,708	140,696	2,068	5,301	1,961	66,926
G5	1,968	1,772	138,905	1,480	3,196	1,568	27,053
G6	2,613	2,473	205,782	2,706	4,393	1,620	56,113
G7	1,823	1,295	173,635	2,113	4,368	2,005	53,879
H3	0,654	0,902	59,289	1,640	1,870	0,646	188,412
H4	0,642	0,711	53,916	1,472	1,338	0,377	69,550
H5	0,866	1,494	130,745	1,965	1,673	1,403	296,747
H6	0,498	0,518	47,737	0,754	0,961	0,477	82,289
H7	0,589	0,632	58,111	1,175	1,396	0,407	62,013
I3	0,414	3,010	40,873	0,647	0,401	1,343	36,807
I4	0,390	0,767	16,783	0,486	0,994	0,582	40,731
I5	0,340	2,457	47,651	0,728	0,307	1,231	34,118
I6	0,556	1,053	26,961	0,559	1,132	0,962	56,354
I7	0,553	1,278	39,530	0,952	1,494	0,810	67,660

Tab. 3.8: Relative Expressionslevel der 7 untersuchten Gene in den 5 topographisch fraktionierten Tumorarealen des Primärtumors

Genexpressionslevel der gepoolten Probiopsien

PE							
FALL	Caldesmon	DPD	ERCC4	Her2-/neu	MRP1	MTHFR	TP
A	0,65	27,55	1,47	246,20	2,43	1,78	36,46
B	2,04	26,57	0,55	1,69	1,27	1,38	107,61
C	2,85	57,07	2,14	3,49	1,90	4,09	61,98
D	0,54	12,34	1,00	9,37	1,69	1,61	12,01
E	6,64	70,66	2,55	6,57	3,75	6,14	190,19
F	2,20	91,96	1,58	31,04	2,57	3,99	40,90
G	0,99	67,44	2,14	2,65	2,07	0,44	34,39
H	0,72	75,86	2,01	2,88	1,95	1,15	131,29
I	1,00	16,35	1,65	1,42	1,21	0,46	24,37

Tab. 3.9: Relative Expressionslevel der 7 untersuchten Gene in den gepoolten Probiopsien**Genexpressionslevel der Normalgewebe (Plattenepithel)**

Normal							
FALL	Caldesmon	DPD	ERCC4	Her2-/neu	MRP1	MTHFR	TP
A	0,89	79,08	0,49	4,79	0,99	1,10	32,10
B	1,25	29,40	0,69	4,00	1,52	1,10	12,99
C	1,70	38,01	0,45	2,45	1,12	1,21	5,07
D	0,83	160,18	1,41	6,09	1,19	1,24	43,03
E	0,94	73,94	0,65	2,94	1,26	1,92	18,68
F	0,92	85,79	0,89	4,68	1,59	1,27	26,97
G	0,99	82,04	1,06	8,23	1,80	0,51	18,05
H	0,49	146,75	0,87	3,37	0,95	0,60	36,59
I	0,66	60,25	0,56	5,25	1,15	0,79	33,24

Tab. 3.10: Relative Expressionslevel der 7 untersuchten Gene im Normalgewebe (Plattenepithel)

4. DISKUSSION

4.1 Kurzpräsentation der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fragestellung nach dem Vorliegen einer in der Literatur beschriebenen intratumoralen molekulargenetischen Heterogenität in lokal fortgeschrittenen Adenokarzinomen des Ösophagus und der Korrelation zwischen Probebiopsie und Primärtumor nachgegangen. Der Klärung dieser Fragestellung kommt eine zentrale Bedeutung im Rahmen prädiktiver Responseuntersuchungen auf das Ansprechen einer neoadjuvanten Chemotherapie zu, da diese anhand von Probebiopsien, dem gewöhnlicherweise einzigen nativen bzw. unvorbehandelten Untersuchungsmaterial des originären Tumorgewebes multimodal therapierter Tumore, durchgeführt werden, die technisch bedingt nur oberflächliche Tumorareale abbilden können.

Hierfür wurden in 5 topographisch fraktionierten, manuell mikrodisssezierten Tumorarealen, bestehend aus jeweils 2 oberflächlichen und tiefen Tumorinvasionsfronten sowie einem Tumorzentrum die relativen Expressionslevel 7 potentieller Kandidatengene prädiktiver Responseuntersuchungen - Caldesmon, DPD, ERCC4, Her2-/neu, MRP1, MTHFR und TP - im Verhältnis zum Haushaltsgen GAPDH mittels Real Time RT-PCR quantitativ bestimmt.

In einigen Fällen zeigten sich teilweise deutlich unterschiedliche intratumorale Genexpressionslevel. Dies war jedoch für keines der untersuchten Gene statistisch signifikant. Eine intratumorale molekulargenetische Heterogenität, die in der Literatur neben zahlreichen anderen Tumorentitäten auch für das Adenokarzinom des Ösophagus beschrieben worden war (Owonikoko T et al., 2002), konnte auf mRNA-Expressionsebene der in dieser Arbeit untersuchten 7 verschiedenen Chemotherapie-assoziierten Gene in jeweils in 5 Tumorareale unterteilten Tumorgeweben von insgesamt 9 untersuchten Fällen nicht nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit konnte allerdings zeigen, dass eine Gruppe von 7 potentiellen Kandidatengenen prädiktiver Responseuntersuchungen in einem Patientenkollektiv lokal fortgeschrittener Adenokarzinome des Ösophagus individuell unterschiedlich exprimiert werden. So wurden für alle untersuchten Gene signifikante Unterschiede der Expressionslevel in mindestens einem der 9 untersuchten Fälle aufgezeigt, was eine intertumorale molekulargenetische Heterogenität der Genexpression aufzeigt.

In der Mehrzahl der untersuchten Fälle wurde ein höheres Expressionslevel in den Probebiopsien im Vergleich zum Median des jeweils korrespondierenden Primärtumors gefunden (71%, n=63). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Rangfolge der Genexpressionslevel in den Probebiopsien und den medianen Expressionslevel der Primärtumoren festgestellt werden. Fälle mit einem höheren Genexpressionslevel in der gepoolten PE wiesen auch in der Mehrzahl der Fälle einen höheren Median der Expressionslevel im gesamten Tumorkomplex auf und umgekehrt. Eine vergleichende Analyse der Genexpressionslevel zwischen den gepoolten Probebiopsien und den jeweils entsprechenden Primärtumoren konnte dies bestätigen. So wies der Rangkorrelationskoeffizient Spearman-Rho für die Expressionslevel von ERCC4 und MTHFR mit 0,558 bzw. 0,478 eine hochsignifikante mäßig starke positive Korrelation zwischen der PE und den einzelnen Tumorkomplexen auf.

Für die Gene Caldesmon und Her2-/neu konnten ebenfalls signifikante positive Rangkorrelationen zwischen gepoolter PE und den jeweils 5 einzelnen topographisch fraktionierten Tumorkomplexen aufgezeigt werden. Im Gegensatz zum stark positiven Rangkorrelationskoeffizienten von 0,829 für Her2-neu zeigte sich für Caldesmon jedoch lediglich ein schwach positiver Rangkorrelationskoeffizient von 0,426. Während der Rangkorrelationskoeffizient für TP (0,400) und für MRP1 (0,428) eine signifikante schwache positive Korrelation zwischen gepoolter PE und den einzelnen 5 Tumorkomplexen aufwies, konnte für die Expression von DPD mit einem Wert von 0,241 keine signifikante Korrelation beobachtet werden.

Die Normalgewebe der neun untersuchten Patienten zeigten im Vergleich zu den Expressionslevel in den fünf topographisch fraktionierten Tumorkomplexen der Primärtumoren für die Gene TP, MTHFR, ERCC4 und Caldesmon niedrigere, und für die Gene MRP1, Her2-/neu und DPD höhere Expressionslevel auf.

4.2 Hintergrund der Themenstellung

4.2.1 Biomarker prädiktiver Responseuntersuchungen

Adenokarzinome des Ösophagus weisen bei Diagnosestellung in der Mehrzahl der Fälle ein nicht mehr primär resektables, lokal fortgeschrittenes Tumorstadium (>T2) auf, weshalb neoadjuvanten Therapieansätzen im Rahmen multimodaler Behandlungskonzepte eine zentrale Bedeutung zukommt (Zacherl, J et al., 2003; Burak WE Jr 2003; Siewert JR et al., 2007; GebSKI V et al., 2007).

Da allerdings nur etwa 40-60% aller behandelten Patienten eine histologische komplette bzw. partielle Response aufweisen (Cunningham D et al., 2006; Lordick F et al., 2004; Fareed KR et al., 2009; Langer R et al., 2009), wurde in zahlreichen Studien nach prädiktiven bzw. prognostischen molekulargenetischen Markern gesucht, um durch Vermeidung einer ineffektiven, kostenintensiven und potentiell toxischen Therapie ohne relevanten Prognosegewinn mittels prätherapeutischer Identifizierung von Patienten mit positivem Ansprechen auf die applizierte Chemotherapie, sogenannten Respondern, die Effektivität der neoadjuvanten Therapie zu verbessern.

Die Erforschung prädiktiver, prognostischer Biomarker auf genetischer, epigenetischer, transkriptionaler sowie translationaler Ebene von Tumoren im Allgemeinen sowie dem Adenokarzinom des Ösophagus im Speziellen steht im Mittelpunkt wissenschaftlicher Bemühungen, onkologische Therapiemodalitäten zu verbessern.

Einzelne Biomarker zentraler Stoffwechselwege, die in der Zellantwort auf zytotoxische Therapien eine Schlüsselstellung einnehmen, wurden vielfach mit teilweise aussichtsreichen Ergebnissen untersucht.

Der Tumorphänotyp entspricht jedoch der Summe sämtlicher genetischer und epigenetischer Alterationen, die vielleicht mehrere tausende Gene umfassen, die in ihrer Gesamtheit Einfluss auf das Ansprechen einer zytotoxischen Therapie nehmen können (Fareed KR et al., 2009). Anhand von Genexpressionsanalysen des gesamten Tumorgenoms, sogenanntem gene expression profiling (GEP) wurden neue Untersuchungsmöglichkeiten etabliert, die diesen Aspekt berücksichtigen und möglicherweise eine patientenindividualisierte Therapie erlauben (van't Veer LJ et al., 2008).

Luthra et al. konnten in einer Studie mit 19 neoadjuvant radiochemotherapierten Ösophaguskarzinom-Patienten, wobei es sich hierbei um ein gemischtes Kollektiv aus überwiegend Adenokarzinomen handelte, anhand von Genexpressionsanalysen prätherapeutischer Probiopsien und deren Korrelation mit einer pathologischen Response mittels hierarchischer Clusteranalyse ein molekulares Profil erstellen, welches zwei molekulare Subtypen mit etwa 400 unterschiedlich exprimierten Genen unterscheidet. Hierbei waren im Vergleich zum Gesamtkollektiv mit 32 Prozent Respondern 80 Prozent des Subtyp I Responder. Darüber hinaus zeigte sich für Patienten mit dem molekularen Subtyp II ein schlechteres Überleben (Luthra R et al., 2006).

Responseuntersuchungen anhand der Erstellung einer Gensignatur mittels gene expression profiling basierend auf Microarray-Technologie könnten neben der prätherapeutischen Bestimmung einzelner relevanter Biomarker einen weiteren wichtigen Baustein als prädiktiver Marker multimodal therapierter Ösophaguskarzinome darstellen. Allerdings gibt es bislang nur sehr wenige Studien dieser Art z.B. bei Oropharyngealkarzinomen (Pramana J et al., 2007), Mammakarzinomen (van't Veer LJ et al., 2008) und Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Ashida A et al., 2006; Duong C et al., 2007; Luthra R et al., 2006) sowie Adenokarzinomen des Ösophagus (Duong C et al., 2007; Luthra R et al., 2006; Luthra MG et al., 2007). Die Fallzahlen sind jedoch zu gering, als dass ein routinemäßiger klinischer Einsatz gerechtfertigt wäre (Fareed KR et al., 2009).

Zahlreiche einzelne, vielversprechende potentielle Biomarker prädiktiver Responseuntersuchungen neoadjuvant therapierter Adenokarzinome des Ösophagus und weiterer anderer Karzinomentitäten konnten in retrospektiven Studien mittels Analyse auf DNA-, RNA- sowie Proteinebene ausfindig gemacht werden (Fareed KR et al., 2009). Für eine Etablierung prädiktiver Responseuntersuchungen neoadjuvant therapierter Tumorpatienten anhand von Biomarkern in die klinische Praxis ist jedoch darüber hinaus die Überprüfung der Validität geeigneter molekularbiologischer Marker anhand von prospektiven Studien in klinischen Trials mit hoher Fallzahl notwendig. Bislang gibt es für das Adenokarzinom des Ösophagus keinen etablierten validen prädiktiven bzw. prognostischen Biomarker wie z.B. für Mamma- (Her2/-neu, Hormonrezeptorstatus), Kolon- (K-ras) oder Lungenkarzinome (EGFR) (Fareed KR et al., 2009; van't Veer LJ et al., 2008; Jankowski JA et al., 2009), und in neueren

Studien auch für das Magenkarzinom (HDAC) (Weichert W et al., 2008), der ein prätherapeutisches patientenindividualisiertes Therapiemanagement ermöglicht.

Die meisten neoadjuvanten Chemotherapiekonzepte beinhalten starre, empirisch gewonnene Therapiemodalitäten, die gleichermaßen bei allen Patienten mit der entsprechenden Grunderkrankung stadiengerecht eingesetzt werden.

Neuere Forschungsarbeiten befassen sich mit der Suche nach Biomarkern, die nicht nur eine prätherapeutische Responseprädiktion gestatten, sondern darüber hinaus eine Auswahl des am besten geeigneten Chemotherapeutikums ermöglichen sollen, um eine patientenindividualisierte Therapieentscheidung z.B. anhand von seriellen Genexpressionsmustern und quantitativen Proteomics der Tumoren treffen zu können (van 't Veer LJ et al., 2008; Hermeking H, 2003; Sawyers CL, 2008; Smith MQ et al., 2009).

Molekularbiologische Marker müssen hohen Ansprüchen genügen. Ein idealer, diagnostisch routinemäßig einsetzbarer Marker sollte zuverlässig, leicht verfügbar und mithilfe einfacher, standardisierter und valider Untersuchungsmethoden zu bestimmen sein (Fareed KR et al., 2009).

Hierbei müssen geeignete Biomarker eine exakte Diskriminierung zwischen Tumor- und Normalgewebe (Amatori F et al., 2006) sowie zwischen einzelnen Patienten gestatten, um eine patientenindividualisierte Therapieentscheidung zu ermöglichen (van 't Veer LJ et al., 2008; Fareed KR et al., 2009).

Mithilfe molekularbiologischer Untersuchungen, hauptsächlich auf mRNA-Expressionsebene durch RT-PCR oder gene expression profiling (GEP) mittels cDNA-Microarray-Technologie, konnten in den letzten Jahren potentielle Kandidatengene bzw. Genexpressionsmuster für prädiktive Responseuntersuchungen neben verschiedenen anderen Tumorentitäten mit unterschiedlichen multimodalen Behandlungsregimen auch für neoadjuvant therapierte, lokal fortgeschrittene Ösophaguskarzinome durch Korrelation der Genexpression in den prätherapeutischen Probiopsien mit dem späteren Ansprechen auf die verabreichte (Radio-)Chemotherapie charakterisiert werden, wobei diese Daten allerdings zum Teil auf heterogenen Patientenkollektiven (Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom), unterschiedlichen neoadjuvanten Therapieregimen (Chemotherapie versus Radiochemotherapie), verschiedenen

Chemotherapieschemata und oft nicht standardisierter Chirurgie basieren (Harpole DH Jr et al., 2001; Langer R et al., 2005, 2008; Warnecke-Eberz U et al., 2004, 2005; Luthra R et al., 2006; Luthra MG et al., 2007; Fareed KR et al., 2009).

Im Rahmen des von der Deutschen Krebshilfe geförderten Verbundforschungsantrages mit dem Titel „Prädiktion des Ansprechens von Adenokarzinomen des Ösophagus auf neoadjuvante Chemotherapie: Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene durch quantitative RT-PCR und cDNA-Microarrays“ wurden in der vorliegenden Arbeit Genexpressionslevel sieben verschiedener potentieller Kandidatengene prädiktiver Responseuntersuchungen in primär resezierten, lokal fortgeschrittenen Adenokarzinomen des distalen Ösophagus untersucht, für die bereits ausreichende funktionelle Daten in Vorarbeiten für eine mögliche Responseprädiktion vorlagen (Langer R et al, 2005; Napieralski R et al., 2005). Für eine Reihe molekularer Marker, die eine Assoziation zum Metabolismus der verabreichten Chemotherapie zeigen, wie die 5-FU assoziierten Enzyme TP und MTHFR und die Cisplatin assoziierten Gene Caldesmon und GADD45 sowie allgemeine Detoxifikationsproteine wie MRP1, wurde hierbei ein Zusammenhang mit einer Responseprädiktion bei Adenokarzinomen des Ösophagus und Magens, und für die Gene TP und GADD45 auch mit der Gesamtüberlebenszeit bei Magenkarzinomen, von Forschungsgruppen des Instituts für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München in Zusammenarbeit mit dem GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit Neuherberg aufgezeigt (Langer R et al. 2005, 2007; Napieralski R et al., 2005). Für weitere Chemotherapie-relevante Schlüsselenzyme des 5-FU-Stoffwechsels (TS, DPD) wurde für das kolorektale Karzinom eine prognostische und prädiktive Relevanz nachgewiesen (Salonga D et al., 2000; Iqbal S et al., 2003). Darüber hinaus konnten Expressionslevel Apoptose- und DNA-Reparatur- vermittelnder Gene sowie von Protoonkogenen wie z.B. Her2-/neu mit einer Responseprädiktion auf Platin und Taxol basierenden Chemotherapieregimen bei Mammakarzinomen in Verbindung gebracht werden (Muss HB et al., 1994).

Da die meisten existierenden Chemotherapieschemata lokal fortgeschrittener Adenokarzinome des Ösophagus auf den Substanzen 5-FU und Cisplatin sowie gegebenenfalls noch Taxol basieren (Bader FG et al., 2008; Lordick F et al., 2004,

2007; Zacherl J et al., 2003; Fink U et al., 1998), wurden in der vorliegenden Arbeit mRNA-Expressionsprofile von Genen untersucht, die mit dem Metabolismus dieser Chemotherapeutika bzw. mit einer allgemeinen Chemotherapieresistenz assoziiert sind.

Im Einzelnen wurden die maßgeblichen katabolen und inaktivierenden Enzyme des 5-FU-Stoffwechsels Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD), welches mit der Responseprädiktion gastrointestinaler Karzinome in Verbindung gebracht wird, wobei hierbei eine negative Korrelation zwischen der Höhe der DPD-Expression und dem Ansprechen auf 5-FU bzw. dessen Toxizität sowie der Überlebenszeit bei verschiedenen Tumorentitäten vorzuliegen scheint (Fischel JL et al., 1995; Ishikawa Y et al., 1999, 2000; Kirihara Y et al., 1999; Salonga D et al., 2000; Scherf et al., 2000; Kornmann M et al., 2003; Ciaparrone M et al., 2006; Fukuda H et al., 2006, Oeda M et al., 2006; Yamada T et al., 2006; Matsubara J et al., 2008) und Thymidylat-Phosphorylase (TP), für das zusätzlich als angiogenetischem Faktor eine Responseprädiktion für mit verschiedenen Chemotherapeutika behandelten Kolonkarzinomen (Adlard JW et al., 2002; Ciaparrone M et al., 2006; Meropol NJ et al., 2006; Metzger R et al., 1998; Salonga D et al., 2000) und Magenkarzinomen (Kikuyama S et al., 2001; Koizumi W et al., 1999; Napieralski R et al., 2005) mit allerdings teilweise unterschiedlichen Ergebnissen aufgezeigt werden konnte und dem darüber hinaus als prognostischem Marker der Gesamtüberlebenszeit chemotherapierter Oropharyngealkarzinome klinische Relevanz zugeschrieben wird (Ijuin T et al., 2007), ausgewählt.

Weiterhin wurde das am Folsäuremetabolismus beteiligte Enzym 5,10-Methylen-tetra-hydrofolat-reduktase (MTHFR), von dem mehrere Polymorphismen bekannt sind und das als Katalysator der Reduktion von 5,10-Methylen-tetra-hydrofolat zu 5-Methyl-tetra-hydrofolat eine Inhibition der Thymidylat-Synthetase (TS), welcher ebenfalls eine große Bedeutung in der Responseprädiktion beigemessen wird (Metzger R et al., 1998; Joshi MB et al., 2005; Shirota Y et al., 2001; Theisen J et al., 2008), herbeiführt, untersucht. Neben einer möglichen Responseprädiktion chemotherapierter Adenokarzinome des oberen Gastrointestinaltraktes (Langer R et al., 2005) wurde für das Vorliegen eines bestimmten Haplotyps der MTHFR ein schlechtes Überleben neoadjuvant behandelter Rektumkarzinome (Terrazzino S et

al., 2006) und eine Responseprädiktion bei chemotherapierten Kolonkarzinomen (Cohen V et al., 2003) nachgewiesen.

Das ebenfalls in die Untersuchung aufgenommene, zur Familie der humanen DNA-excision-repair Gene (Andressoo JO et al., 2005) zugehörige Reparaturgen ERCC4, für dessen Familienmitglied ERCC1 nicht nur für Ösophaguskarzinome, wobei diese Daten allerdings zum Teil auf heterogenen Patientenkollektiven (Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom) und unterschiedlichen neoadjuvanten Therapieregimen (Chemotherapie versus Radiochemotherapie) basieren, eine Korrelation mit dem Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Cisplatin (Warnecke-Eberz U et al., 2004, 2009; Kim MK et al., 2008; Theisen J et al., 2008) und als Prognosefaktor für das Gesamtüberleben (Joshi MB et al., 2005) sondern auch für diverse andere Tumorentitäten wie z.B. Blasenkarzinome (Bellmunt J et al., 2007) oder Lungenkarzinome (Olaussen KA et al., 2006) und fortgeschrittene Magenkarzinome (Kwon HC et al., 2007; Metzger R et al., 1998) sowie Kolonkarzinome (Kim SH et al., 2009; Shirota Y et al., 2001) aufgezeigt werden konnte, und das darüber hinaus als prognostischer Marker der Überlebenszeit mit Cisplatin behandelter nichtkleinzelliger Lungenkarzinome (Ceppi P et al., 2006) und Magenkarzinome (Matsubara J et al., 2008) gilt, wird eine Responseprädiktion bei chemotherapierten Osteosarkomen zugeschrieben (Nathrath M et al., 2002).

Das Detoxifikationsprotein MRP1 (Multidrug Resistance associated Protein 1), das am besten charakterisierte Transportprotein der Familie der ABC-Transporter, eine der größten Genfamilien, die etwa 50 humane, strukturell verwandte Transmembranproteine umfasst, ist verantwortlich für Resistenzmechanismen gegen eine Vielzahl von chemotherapeutischen Substanzen (Chang XB, 2010). Eine Assoziation der Genexpression von MRP1 mit einer Chemotherapieresistenz wurde bereits bei einer Reihe anderer Tumoren und in Zellkulturexperimenten beschrieben (Kruh GD et al., 2001, 2003; Scotto KW, 2003; Kirihaara Y et al., 1999; Leonard GD et al., 2003). Neben einer möglichen Responseprädiktion beim Mammakarzinom (Park S et al., 2006; Filipits M et al., 2005) wurde für MRP1 ebenso wie für das in die Untersuchung eingeschlossene Zytoskelett-assoziierte Gen Caldesmon (Hayashi K et al., 1992) eine Assoziation mit Überleben bzw. Response beim Adenokarzinom des Ösophagus berichtet (Langer R et al., 2005). Präklinische Studien hatten bereits Hinweise auf einen Zusammenhang der Expression von Caldesmon mit einer Chemotherapieresponse aufgezeigt (Scherf U et al., 2000).

Das Protoonkogen Her-2/neu, dessen Transkriptionsprodukt ein transmembranöser Thyrosinkinase-Wachstumsfaktor-Rezeptor ist, welcher in Adenokarzinomen des Ösophagus gehäuft, in einigen Studien bis zu 35 Prozent, überexprimiert wird (Walch A et al., 2001), und bei Vorliegen einer Überexpression bei Mammakarzinomen eine Assoziation mit einer Response auf eine Anthrazyklin basierenden Chemotherapie (Pritchard KI et al. 2006) sowie bei Adenokarzinomen des Ösophagus eine schlechtere Prognose der Überlebenszeit aufweist (Walch A et al, 2000; Kyrgidis A et al., 2005) und als relevanter potentieller Biomarker in Adenokarzinomen des Ösophagus gilt (Rauser S et al., 2007), wurde ebenfalls untersucht. Für eine verminderte bzw. fehlende Expression von Her2-/neu konnte bei Plattenepithelkarzinomen der Speiseröhre ein besseres Ansprechen auf eine Radiochemotherapie (Miyazono F et al., 2004; Akamatsu M et al., 2003) sowie eine längere Gesamtüberlebenszeit nachgewiesen werden (Akamatsu M et al., 2003).

DNA-Polymorphismen, welche geringfügige Funktionsunterschiede der betreffenden Gene zur Folge haben und somit auch das Ansprechen einer Chemotherapie beeinflussen (Cohen V et al., 2003), wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Vielversprechende Marker einer Responseprädiktion auf Proteinebene wie z.B. hsp27 (Langer R et al., 2008) sowie auf chromosomaler Ebene (Gertler R et al., 2008) wurden ebenfalls nicht in die Untersuchungen einbezogen.

4.2.2 Intratumorale molekulargenetische Heterogenität

Für die Karzinogenese des Adenokarzinoms des Ösophagus wurde mit der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz ein lineares Modell der Tumorentstehung ähnlich der Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms mit schrittweiser Progression postuliert. Hierbei tritt während der Karzinogenese nach Transformation von Progenitorzellen, mutmaßlich Epithelzellen ösophagealer Drüsenausführungsgänge (Leedham SJ et al., 2008), auf Grund eines Selektionsvorteils gegenüber normalen ortsansässigen Zellen und auf Kosten kompetitiver Klone eine klonale Expansion eines einzelnen mutierten Klons auf. Dabei kommt es unter schrittweisem Erwerb einer Vielzahl an spezifischen chromosomalen Abberationen - sowohl Verluste oder Zugewinne ganzer Chromosomen als auch Deletionen oder Amplifikationen von Chromosomenabschnitten - und durch genetische Alterationen wie Basen-

Substitution, -Insertion und -Deletion einiger weniger Nukleotide, Mikrosatelliteninstabilität oder einer Promotor-Hypermethylierung auf DNA-Ebene, insbesondere von (Proto-)Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, durch Verlust der Regulation normaler Zellproliferation zu unkontrolliertem Tumorwachstum. Für eine maligne Transformation sind nach Hanahan und Weinberg sechs essentielle genotypische Veränderungen verantwortlich: die Unabhängigkeit von äußeren Wachstumssignalen, eine Resistenz gegenüber Wachstumsinhibitoren sowie ein Erwerb der Fähigkeit zu Apoptoseinhibition, Angiogenese, Gewebsinvasion und Metastasierung (Hanahan D et al., 2000).

Vor dem Hintergrund, dass diese Eigenschaften nicht innerhalb eines strengen zeitlichen Ablaufs erworben werden, durch Alterationen einer bislang unbekanntem Anzahl verschiedener Gene bedingt werden können und es in Folge einer ansteigenden Aneuploidie-Rate zu einer zunehmenden genomischen Instabilität kommt, scheint hingegen eine komplexere Tumorgenese vorzuliegen, der die linearen Karzinogenesemodelle nicht gerecht werden (Walch A et al., 2000).

So konnte in zahlreichen Untersuchungen aufgezeigt werden, dass Tumore aus heterogenen Zellpopulationen bestehen und eine Tumorprogression, zumindest in einem Teil der soliden Tumore, eher durch einen Prozess klonaler Vielfältigkeit entsteht, als aus einem einzigen, durch Wachstumsvorteile selektierten, expandierenden Klon. Dies impliziert, dass Tumore aus unterschiedlichen Tumorzellklonen bestehen, die, neben gemeinsamen genetischen Abberationen auf Grund kollektiver Herkunft aus gleichen Progenitorzellen, auch einige Subklonspezifische unterschiedliche genetische Anomalien aufweisen.

Je weiter fortgeschritten die Tumorentwicklung ist, desto wahrscheinlicher erscheint, dass durch progrediente Anhäufung genetischer und chromosomaler Abberationen auf Grund einer zunehmenden genomischen Instabilität koexistente Subklone mit unterschiedlichem Entartungsgrad im Primärtumor existieren, die weiter unkontrolliert proliferieren und in Ihren Eigenschaften wie z. B. Enzymausstattung und Zelloberflächenstruktur divergieren. Möglicherweise mag dies ein Grund größerer Chemotherapieresistenz und aggressiveren Tumorwachstums fortgeschrittener Tumore sein (Lyng H et al., 2004).

Sogar bereits in der Entwicklung einer intestinalen Metaplasie scheinen mehrere, aus einer gemeinsamen Progenitorzelle hervorgegangene, koexistente und voneinander unabhängige Klone für eine nachgewiesene Heterogenität des Barrett-Ösophagus

verantwortlich zu sein (Leedham SJ et al., 2008). Dieser genetischen Vielfaltigkeit wird in der Karzinogenese des Adenokarzinoms des Ösophagus eine wichtige Rolle zugeschrieben, wobei die genauen Mechanismen noch unklar sind (Graham TA et al., 2010).

Für zahlreiche solide Tumoren wie z.B. Mamma- (Aubele M et al., 1999; Lichy JH et al., 2000; Pertschuk LP et al., 2002; Hanna W et al., 2007), Harnblasen- (Diaz-Cano SJ et al., 2000), Kolon- (Baisse B et al., 2001), Prostata- (Macintosh CA et al., 1998; Zitzelsberger H et al., 1998), Ovarial- (Jochumsen KM et al., 2007), Cervix- (Lyng H et al., 2004) sowie Oropharyngealkarzinome (Pramana J et al., 2007) und auch Neuroblastome (Albino D et al., 2008) wurden mit unterschiedlichen Untersuchungsmethoden wie Durchflusszytometrie, chromosomalen und genomischen Analysen als auch molekulargenetischen Untersuchungen wie komparativer genomischer Hybridisierung (CGH), „degenerated oligonucleotide-primed“ PCR (DOP-PCR), Immunhistochemie, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), DNA-Microarray-Technologie sowie RT-PCR eine intratumorale molekulargenetische Heterogenität nachgewiesen.

So wurden von Baisse et al. in sporadischen lokal fortgeschrittenen Kolonkarzinomen in 2/3 der untersuchten Tumoren heterogene Expressionsmuster in mindestens einer für das Kolonkarzinom typischen genetischen Alteration mit 2 bis 6 genotypisch unterschiedlichen, topographisch deutlich differenzierbaren Klonen pro Tumor gefunden, und auf Grund der aufgezeigten signifikanten intratumoralen Heterogenität der klinische Einsatz prädiktiver und prognostischer Biomarker kritisch hinterfragt (Baisse B et al., 2001).

Pertschuk et al. wiesen mit immunhistochemischen Untersuchungen anhand von Her2-/neu-Amplifikationen bzw. Überexpressionen eine signifikante intratumorale Heterogenität größeren Ausmaßes auf, als sie in anderen Publikationen (Hanna W et al., 2007) beschrieben wurde, und stellten ebenfalls die prognostische Validität der Untersuchung einer einzelnen Probenbiopsie im Hinblick auf die Aussagefähigkeit über den Gesamttumor in Frage (Pertschuk LP et al., 2002). Diese sowie weitere Publikationen über intratumorale heterogene Expressionsmuster immunhistochemischer Untersuchungen von Her2-/neu veranlassten amerikanische

Pathologen zu Diskussionen und Festlegung neuer Richtlinien in der immunhistochemischen Befundung von Mammakarzinomen (Vance GH et al., 2009).

Auch für Ösophaguskarzinome konnte in einigen wenigen publizierten Arbeiten eine intratumorale Heterogenität nachgewiesen werden. Hierbei wurden mittels der relativ unspezifischen Methode einer Durchflusszytometrie die DNA-Gehalte unterschiedlicher Tumorareale von Plattenepithelkarzinomen untersucht (Haraguchi Y et al., 1995; Sasaki K et al., 1991).

Über die Untersuchung einer intratumoralen molekulargenetischen Heterogenität beim Adenokarzinom des Ösophagus liegen bislang ebenfalls nur sehr wenige Studien vor (Robaszkiewicz M et al., 1992; Owonikoko T et al., 2002; Walch A et al., 2000).

In den Arbeiten wurden verschiedene Tumorregionen mittels Durchflusszytometrie (Robaszkiewicz M et al., 1992), Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von Her2/-neu und c-erB-2 (Walch A et al., 2000) sowie differentiellen PCR-Untersuchungen relevanter Protoonkogenloci und Nachweis von Allelverlusten (LOH) relevanter Tumorsuppressorgenloci (Owonikoko T et al., 2002) auf DNA-Ebene bzw. Proteinebene anhand kleiner Fallzahlen in retrospektiven Studien analysiert.

Owonikoko et al. konnten in ihrer Arbeit keine signifikanten Unterschiede bezüglich der topographischen Verteilung genetischer Abberationen zwischen Tumorzentrum und -peripherie bzw. zwischen Tumoroberfläche und Invasionsfront aufzeigen, wiesen aber eindrucksvoll das Vorliegen einer intratumoralen Heterogenität in 94 Prozent der untersuchten Fälle auf und postulierten, dass eine intratumorale Heterogenität beim Adenokarzinom des Ösophagus ein häufig anzutreffendes Tumorcharakteristikum sei (Owonikoko T et al., 2002).

Quantitative Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene über das Vorliegen einer intratumoralen molekulargenetischen Heterogenität, insbesondere anhand von Chemotherapie-assoziierten potentiellen Markergenen therapieentscheidender Responseuntersuchungen, fehlten bislang.

4.3 Diskussion der Methodik

Die RNA-Extraktion aus archiviertem, formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Biopsiematerial, Normalgewebe und Primärtumorgewebe erfolgte nach etablierten Protokollen (Specht K et al., 2000, 2001, 2002; Walch A et al., 2000, 2001), welche relative quantitative Expressionsanalysen auf RNA-Ebene nicht nur an frischem oder tiefgefrorenem Tumorgewebe, sondern auch an routinemäßig formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe ermöglichen und in mehreren vorangehenden Arbeiten valide und reproduzierbare Ergebnisse auch im Vergleich zu anderen Untersuchungsmethoden geliefert hatten (Walch A et al., 2000, 2001, 2004; von Rahden BH et al., 2005).

So konnten durch die Verbindung von Mikrodissektion und TaqMan-Technologie Korrelationen prätherapeutischer Expressionen Chemotherapie-relevanter Gene, bestimmt an Paraffin-eingebetteten und in Formalin fixierten Biopsien, mit dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie bei Adenokarzinomen des Ösophagus und Magenkarzinomen aufgezeigt (Langer R et al., 2005; Napieralski R et al., 2005) und chemotherapiebedingte Änderungen der Genexpressionslevel nachgewiesen werden (Langer R et al., 2007).

Die Separation der untersuchten Zellareale erfolgte in der vorliegenden Dissertation durch manuelle Mikrodissektion. Die molekulargenetische Untersuchung kleinster, durch Mikrodissektion isolierter Zellmengen auf DNA- und RNA- Ebene stellt ein praktikables und valides Verfahren dar (Walch A et al., 2001).

Die manuelle Mikrodissektion der Tumoreale und die RNA-Extraktion sowie cDNA-Synthese erfolgten im Wesentlichen nach der von Specht et al. beschriebenen und etablierten Methode anhand evaluierter Versuchsprotokolle am Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München (Specht K et al., 2001) nach Einübung der sicheren praktischen Handhabung der angewandten Methoden im Vorfeld der Durchführung des praktischen Teils.

Die Methode der cDNA-Synthese sowie die quantitative Real Time RT-PCR Analyse unter Verwendung kommerziell erhältlicher, standardisierter und etablierter designer Taqman-Gene-expression-Assay-Sets ist ein einfaches, differenziertes und außerordentlich sensitives ebenso wie praktikables Verfahren, um die

Genexpression quantitativ zu untersuchen (Gibson UE et al., 1996; Heid CA et al., 1996).

In einem Vergleich unterschiedlicher Bestimmungsmethoden wie FISH-Analyse, RT-PCR und immunhistochemischer Färbung konnte in einigen Arbeiten anhand der Bestimmung des Tyrosinkinase-abhängigen Wachstumsfaktorrezeptors Her2/-neu gezeigt werden, dass eine Genüberexpression auf mRNA-Ebene zuverlässig mit dem Vorhandensein derartiger Amplifikationen auf DNA- und Protein- Ebene korreliert (Specht K et al., 2001; Walch A et al., 2001, 2004).

Die zur Auswertung der durch die Real Time RT-PCR erhobenen Ergebnisse verwendete relative Standardkurven-Methode stellt eine etablierte Berechnungsweise der relativen Genexpression unbekannter Proben im Verhältnis zu einem Haushaltsgen, in der vorliegenden Arbeit GAPDH, dar (Perkin-Elmer Corporation, 1997; Vandesompele J et al., 2002).

Da die zu isolierende RNA während der Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte leicht zu Degradation neigt, wurden vom Tumorgewebe jeweils 2 Schnittpräparate der Paraffinblöcke verwendet sowie auf Grund eines deutlich niedrigeren Gehalts an Tumorzellgewebe bei den Probenbiopsien 3 verschiedene Probenbiopsien in jeweils 4 Schnittstufen pro untersuchtem Fall in ein gemeinsames Gefäß gepoolt. Außerdem wurde eine lagerungsbedingte Beeinflussung der Nukleinsäurequalität durch eine rasche Weiterverarbeitung innerhalb von maximal 5 Tagen minimiert.

Neben dem methodenbedingten Mitführen des Haushaltsgens GAPDH wurden die Genexpressionslevel auch in der als Kalibrator dienenden Zelllinie HT 29 bei allen Genexpressionsanalysen mitbestimmt. Über die C_T -Werte konnten Rückschlüsse auf die vorhandene Menge und Qualität der in der RT-PCR eingesetzten cDNA gezogen werden konnten.

Um den Standardmessfehler zu minimieren, wurden alle Genexpressionsanalysen in Doppelansätzen untersucht. Eine Abweichung der C_T -Werte der Doppelbestimmungen untereinander von bis zu 0,5 (+/- 0,1) wurde toleriert, so dass die Maximalabweichung der Expressionslevel deutlich unter 25% blieb.

Bei höheren Abweichungen der einzelnen C_T -Werte oder Hinweisen für eine Degradation der RNA anhand von sehr hohen C_T -Werten des Haushaltsgens GAPDH erfolgte eine erneute Real Time RT-PCR der jeweiligen Patientenprobe.

Die Obergrenze der C_T -Werte für GAPDH von 32, unterhalb derer die Qualität und Menge der in die RT-PCR eingesetzten cDNA-Menge als optimal befunden wurde, konnte in allen untersuchten Gewebeproben eingehalten werden.

Im Vergleich zu sämtlichen anderen untersuchten Fällen zeigten sich für die Probiopsie des Falls I jedoch deutlich spätere Anstiege des Reportersignals, die jedoch unterhalb der Obergrenze von 32 lagen, weshalb die Ergebnisse in die Auswertung eingeschlossen wurden. Die hohen C_T -Werte der Probiopsie des Falls I sind auf eine geringere RNA-Menge oder auf eine schlechtere Nukleinsäurequalität der Gewebeprobe zurückzuführen. Eine Fremdkonamination durch RNA degradierende RNasen während der Versuchsdurchführung ist hierbei nicht mit Sicherheit auszuschließen. Unwahrscheinlicher hingegen sind zufällige Fehler wie beispielsweise Pipettierfehler oder eine mangelnde Auflösung der RNA durch die Proteinase K in den Ansätzen, da auch die C_T -Werte der untersuchten Zielsequenzen überwiegend höhere Werte aufweisen. Da die Expressionswerte der untersuchten Gene bei der relativen Quantifizierung im Verhältnis zum Haushaltsgen GAPDH interpretiert werden bleiben diese Ergebnisse verwertbar. Dennoch sind diese Daten kritisch zu betrachten.

Möglicherweise mag in diesem einzelnen Fall eine RNA-Degradation durch eine verzögerte Formalinfixation ursächlich gewesen sein.

Obwohl der Fall I neben Fall H mit 8 Jahren das älteste Archivmaterial des untersuchten Patientenkollektivs darstellt, kann das Alter des archivierten Gewebematerials hingegen nicht als Fehlerquelle angeschuldigt werden, da die erhobenen Ergebnisse des zugehörigen Tumorgewebes des Falls I und des Falls H auf qualitativ intakte und quantitativ ausreichende RNA schliessen lassen und zahlreiche Publikationen valide Ergebnisse aus noch erheblich älteren in Paraffin eingebetteten, Formalin-fixierten Gewebeproben ergeben haben (Specht K et al., 2001, Mizuno T et al., 1998).

Bei den untersuchten Fällen A und F war aus immunhistochemischen Voruntersuchungen eine gleichermaßen ausgeprägte Her2/-neu Überexpression bekannt. So konnten auch auf mRNA-Ebene im Vergleich zu allen anderen Fällen deutlich höhere Expressionslevel beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte sich jedoch auch zwischen den Fällen A und F eine signifikante intertumorale Heterogenität, was die Genauigkeit der verwendeten Methodik der Real Time RT-PCR auf mRNA-

Ebene im Vergleich zu der immunhistochemischen Methode auf Proteinebene, die der subjektiven Beurteilung des Betrachters und variabler Fixierungs- und Färbungskonditionen ausgesetzt ist (Specht K et al., 2002), unterstreicht.

Die nach Durchführung der mathematischen Auswertung erhaltenen Mittelwertverhältnisse der in Relation zu den Expressionslevel des Haushaltsgens GAPDH untersuchten Gene in den Tumorarealen und Probebiopsien sowie in den Normalgeweben stellen Durchschnittsmengen an mRNA dar, und konnten somit untereinander verglichen sowie auf Unterschiede bzw. eine Korrelation hin untersucht werden.

Um einen direkten Vergleich der Genexpressionslevel in PE und Tumorgewebe zu ermöglichen wurden ausschließlich primär chirurgisch therapierte Adenokarzinome des Ösophagus eingeschlossen, um einem veränderten Genexpressionsmuster durch eine vorausgegangene neoadjuvante Chemotherapie vorzubeugen (Langer R et al., 2007). So zeigten sich in verschiedenen Arbeiten insbesondere für die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Gene MRP1 (Langer R et al., 2007; Nishiyama M et al., 1999), TP (Langer R et al., 2007), DPD und Her2-/neu (Schneider S et al., 2005) sowie darüber hinaus auch für andere Gene wie ERCC1 (Schneider S et al., 2005) und COX-2 (Xi H et al., 2005) veränderte Genexpressionslevel nach erfolgter neoadjuvanter (Radio-)Chemotherapie.

4.4 Diskussion der Ergebnisse

Neben zahlreichen soliden Tumoren wie z.B. Mamma- (Aubele M et al., 1999; Lichy JH et al., 2000; Pertschuk LP et al., 2002; Hanna W et al., 2007), Harnblasen- (Diaz-Cano SJ et al., 2000), Kolon- (Baisse B et al., 2001), Prostata- (Macintosh CA et al., 1998; Zitzelsberger H et al., 1998), Ovarial- (Jochumsen KM et al., 2007) sowie Cervixkarzinomen (Lyng H et al., 2004), Oropharyngealkarzinomen (Pramana J et al., 2007) und auch Neuroblastomen (Albino D et al., 2008) wurde mit unterschiedlichen Untersuchungsmethoden wie Durchflusszytometrie (Robaszkiewicz M et al., 1992), Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von Her2-/neu und c-erbB-2 (Walch A et al., 2000) sowie differentiellen PCR-Untersuchungen relevanter Protoonkogenloci und Nachweis von Allelverlusten (LOH) relevanter Tumorsuppressorgenloci (Owonikoko T et al., 2002)

auf DNA-Ebene bzw. Proteinebene anhand kleiner Fallzahlen in wenigen retrospektiven Studien auch für das Adenokarzinom des Ösophagus eine intratumorale Heterogenität nachgewiesen. Signifikante Unterschiede bezüglich der topographischen Verteilung genetischer Abberationen zwischen Tumorzentrum und Tumorperipherie bzw. zwischen Tumoroberfläche und Invasionsfront konnten dabei nicht aufgezeigt werden (Owonikoko T et al., 2002).

Bei Vorliegen einer hochgradigen intratumoralen molekulargenetischen Heterogenität sind prädiktive prognostische Responseuntersuchungen in ihrer Aussagefähigkeit bezüglich des Ansprechens des gesamten Tumors auf eine neoadjuvante (Radio-) Chemotherapie kritisch zu hinterfragen (Baisse B et al., 2001; Pertschuk LP et al., 2002), da Responseuntersuchungen anhand potentieller Markergene üblicherweise an diagnostischen Probebiopsien vorgenommen werden, die, technisch bedingt, lediglich oberflächliche, endoluminale Anteile des Gesamttumors erfassen. Ein korrektes Abbild der biologischen Charakteristika des gesamten Primärtumors könnte unter dieser Gegebenheit nicht dargestellt werden, so dass durch prätherapeutische Responseuntersuchungen an einzelnen oder wenigen Probebiopsien auch keine validen Aussagen über das Ansprechen des Gesamttumors auf eine neoadjuvante Therapie möglich wären.

Vor diesem Hintergrund sind Untersuchungen der Praktikabilität prädiktiver Analysen anhand von Biomarkern bzw. Genexpressionsmustern in Probebiopsien, dem einzigen nativen, unvorbehandeltem Tumorgewebe, notwendig.

Die vorliegende Dissertation ist die bislang einzige veröffentlichte Arbeit (Langer R et al., 2005), in der eine für das Adenokarzinom des Ösophagus in der Literatur beschriebene intratumorale molekulargenetische Heterogenität anhand potentieller Biomarker prädiktiver Responseuntersuchungen auf mRNA-Ebene mittels Real Time RT-PCR untersucht wurde.

Hierfür wurden die Genexpressionslevel von 7 ausgewählten Genen, deren Expression mit dem Ansprechen auf eine 5-FU und Cisplatin basierten Chemotherapie assoziiert ist, in jeweils fünf topographisch unterschiedlichen Tumorarealen von primär resezierten, lokal fortgeschrittenen Adenokarzinomen des Ösophagus mittels quantitativer Real Time RT-PCR nach mRNA-Extraktion aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe auf das Vorliegen

einer intratumoralen molekulargenetischen Heterogenität hin untersucht und die in den Tumorresektaten gemessenen Genexpressionslevel mit denen der korrespondierenden diagnostischen Probebiopsien korreliert.

In der Mehrzahl der untersuchten Fälle lag ein höheres Expressionslevel in den Probebiopsien im Vergleich zum Median des jeweils korrespondierenden Primärtumors vor (71%). Für die Gene ERCC4, MRP1 und Her2-/neu war dieser Unterschied signifikant ($p = 0,011$; $p = 0,038$; Mann-Whitney-U Test). Diese Tatsache mag zum einen an einer unterschiedlichen Archivierung wie z.B. unterschiedlichen Einwirkzeiten der Formalinfixation und einer verzögerten Formalinfixation der Operationspräparate im Gegensatz zu den zeitnah in Formalin fixierten Probebiopsien liegen (Godfrey TE et al., 2000). Zum anderen muss auch ein weiterer möglicher systematischer Fehler in Betracht gezogen werden, da die Probebiopsien auf Grund der einzeln betrachtet geringeren Tumormasse aus 3 verschiedenen Probebiopsien in 4 Schnittstufen pro Patient gepoolt wurden, was letztlich zu einer höheren Tumorzellmenge geführt haben mag als in den einzelnen untersuchten Tumorarealen.

Es konnte jedoch für alle untersuchten Gene bei Patienten mit hohem Expressionslevel in der PE auch ein im Vergleich zu den anderen Patienten höheres Expressionslevel des Medians des gesamten Tumors aufzeigt werden und umgekehrt, so dass davon auszugehen ist, dass das Genexpressionsprofil einer gepoolten PE zumindest anhand der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene für das Adenokarzinom des Ösophagus ein repräsentatives Abbild des Genexpressionsprofils des gesamten Tumors darstellt.

Die überwiegend signifikanten positiven Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman zwischen den Probebiopsien und den zugehörigen Tumoren bestätigen diese Beobachtung.

Unter Verwendung des Friedman Tests (Rangvarianzanalyse) konnte keine signifikante intratumorale molekulargenetische Heterogenität auf mRNA-Ebene aufzeigt werden, obwohl für einzelne Gene wie Caldesmon, ERCC4 und Her2-/neu in jeweils einem Fall, für MTHFR in 2 Fällen, und für TP in 3 Fällen Hinweise hierfür vorlagen.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Gruppe von 7 potentiellen Kandidatengenen prädiktiver Responseuntersuchungen in einem Patientenkollektiv lokal fortgeschrittener Adenokarzinom des Ösophagus signifikant individuell unterschiedlich exprimiert werden. Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) ergab für die Expression der 7 untersuchten Gene signifikante Unterschiede in den 9 untersuchten Fällen. Mehrfachvergleiche in der Post-Hoc Analyse mittels LSD-Test ergaben signifikante Unterschiede der Expressionen in mindestens einem Fall pro untersuchtem Gen.

Die in der vorliegenden Dissertation erhobenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine möglicherweise vorhandene intratumorale molekulargenetische Heterogenität beim Adenokarzinom des Ösophagus, die in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen wurde, keinen relevanten Einfluss auf prädiktive Responseuntersuchungen auf RNA-Ebene anhand gepoolter Probiopsien hat. Daher ist anzunehmen, dass ein determiniertes Genexpressionsprofil einer Probiopsie - in der vorliegenden Dissertation allerdings gepoolten PE - durchaus die Expressionsverhältnisse des gesamten Tumors widerspiegeln kann.

Diese Ergebnisse korrelieren mit zahlreichen anderen Publikationen, die anhand unterschiedlicher Untersuchungsmethoden eine signifikant höhere intertumorale, also unterschiedliche Genexpression zwischen Tumoren verschiedener Patienten, als intratumorale Heterogenität für verschiedene Tumorentitäten nachweisen konnten (Jochumsen KM et al., 2007; Pramana J et al., 2007; Motoori M et al., 2009).

Darüber hinaus wurde in zahlreichen Studien überwiegend lediglich eine leichtgradige intratumorale Heterogenität beschrieben, z.B. beim Ovarialkarzinom (Jochumsen KM et al., 2008), Oropharyngealkarzinom (Pramana J et al., 2007) und Neuroblastomen (Albino D et al., 2008).

So wurde beispielsweise von Motoori et al. bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus anhand einer hierarchischen Clusteranalyse von Genexpressionsprofilen basierend auf Mikroarray-Technologie aufgezeigt, dass einerseits Normalgewebe gegenüber Probiopsien des Primärtumors und dem Primärtumor selbst klar voneinander abgrenzbare Genexpressionsprofile aufweisen und darüber hinaus zwei aus unterschiedlichen Tumorarealen desselben Primärtumors entnommene Probiopsien eine signifikant höhere Übereinstimmung

der Gensignatur aufweisen als Probebiopsien unterschiedlicher Tumoren (Motoori M et al., 2009).

Auf Grund der Beobachtung einer signifikant höheren intertumoralen als intratumoralen Heterogenität wurde in mehreren Publikationen bei verschiedenen Tumorentitäten die Hypothese aufgestellt, dass prädiktive Responseuntersuchungen anhand einer einzelnen bzw. einiger weniger diagnostisch gewonnener Probebiopsien zuverlässige Aussagen über den Gesamttumor zulassen und eine patientenindividualisierte Therapie ermöglichen (Pramana J et al. 2007, Motoori M et al., 2009; Barry WT et al., 2009).

4.5 Schlussfolgerung und Fazit

Potentielle Kandidatengene (Langer R et al., 2005) und Genexpressionsmuster (Luthra R et al., 2006; Luthra MG et al., 2007; Duong C et al., 2007; Ashida A et al., 2007) prädiktiver Responseuntersuchungen beim Adenokarzinom des Ösophagus wurden in vorangegangenen Arbeiten überwiegend auf transkriptionaler Ebene identifiziert. Untersuchungen einer intratumoralen molekulargenetischen Heterogenität auf RNA-Ebene mittels quantitativer Real Time RT-PCR Chemotherapie-assoziiierter Gene, und somit Überprüfung der Validität und Praktikabilität von prädiktiven Responseuntersuchungen anhand einzelner prognostischer Biomarker, die möglicher Weise eine prätherapeutische Aussage über das Ansprechen des Tumors auf eine (Radio-)Chemotherapie zulassen, fehlten bislang.

Für das Adenokarzinom des Ösophagus steht bis dato kein etablierter valider prädiktiver bzw. prognostischer Biomarker wie z.B. für Mamma- (Her2/-neu, Hormonrezeptorstatus), Kolon- (K-ras) oder Lungenkarzinome (EGFR) (Fareed KR et al., 2009; van 't Veer LJ et al., 2008; Jankowski JA et al., 2009) zur Verfügung, der ein prätherapeutisches patientenindividualisiertes Therapiemanagement ermöglicht.

Eine zielgerichtete patientenindividualisierte Therapie mit Histon-Deacetylasen-Inhibitoren (HDI) konnte für Patienten mit Magenkarzinomen, die eine immunhistochemische Expression in der Zellregulation bedeutender Histon-Deacetylasen (HDAC) aufweisen, etabliert werden. So kann Magenkarzinompatienten anhand von prätherapeutischen immunhistochemischen Untersuchungen im Falle einer gesteigerten HDAC-Expression der Isomeren-Klasse

I eine spezifische Therapieoption in Form von Histon-Deacetylasen-Inhibitoren angeboten werden (Weichert W et al., 2008). Darüber hinaus konnte für diverse lokal fortgeschrittene solide Tumoren mit starker Proliferation eine gesteigerte HDAC-Expression aufgezeigt werden (Weichert W, 2009), so dass auch für lokal fortgeschrittene Adenokarzinome des Ösophagus die Hoffnung auf eine spezifische, patientenindividualisierte Therapie durch eine prätherapeutische Diskriminierung der hiervon profitierenden Responder mittels immunhistochemischer Responseprädiktion anhand der HDAC-Expression aussichtsreich erscheint.

In der vorliegenden Dissertation an 9 primär resezierten lokal fortgeschrittenen Adenokarzinomen des Ösophagus konnte trotz Hinweisen für das Vorliegen einer in der Literatur beschriebenen intratumoralen Heterogenität kein signifikanter Nachweis hierfür erbracht werden.

Beobachtete intratumoral molekulargenetisch heterogene Genexpressionen scheinen in den meisten Fällen unterschiedlicher solider Tumorentitäten in aktuellen, auf Microarray-Technologie basierenden Studien, zumindest im Vergleich zu intertumoralen Genexpressionsmustern, nur gering ausgeprägt zu sein (Barry WT et al., 2010; Jochumsen KM et al., 2007; Pramana J et al., 2007; Motoori M et al., 2009).

Auf Grund einer darüber hinaus mehrheitlich signifikanten Korrelation der Expressionslevel der 7 analysierten Gene in den gepoolten Probebiopsien mit denen des Primärtumors und einer nachgewiesenen signifikanten intertumoralen Heterogenität, die auch in zahlreichen aktuellen Publikationen anhand genomweiter Expressionsanalysen für verschiedene Tumorentitäten aufgezeigt wurde (Barry WT et al., 2010; Jochumsen KM et al., 2007; Pramana J et al., 2007; Motoori M et al., 2009), kann anhand der gefundenen Ergebnisse postuliert werden, dass Genexpressionsanalysen potentieller Kandidatengene im Rahmen prädiktiver Responseuntersuchungen - zumindest an gepoolten - prätherapeutisch entnommenen Probebiopsien prinzipiell möglich sind und valide Ergebnisse erwarten lassen.

Pramana et al. stellten weiterhin anhand von auf Microarray-Technologie basierenden Genexpressionsanalysen bei Oropharyngealkarzinomen die Hypothese auf, dass auf Grund signifikant höherer intertumoraler als intratumoraler molekulargenetisch heterogener Expressionsmuster eine einzelne PE im Rahmen

prädiktiver Responseuntersuchungen ein korrektes Abbild der biologischen Charakteristika des gesamten Primärtumors darstellen kann (Pramana J et al., 2007).

Bei Vorliegen einer hochgradigen intratumoralen molekulargenetischen Heterogenität, insbesondere wenn diese im Bereich tiefer Tumorinvasionsfronten anzutreffen wäre, sind prädiktive prognostische Responseuntersuchungen in ihrer Aussagefähigkeit bezüglich des Ansprechens des gesamten Tumors auf eine neoadjuvante (Radio-)Chemotherapie jedoch weiterhin kritisch zu sehen (Baisse B et al., 2001; Pertschuk LP et al., 2002), da Responseuntersuchungen anhand potentieller Markergene üblicher Weise an diagnostischen Probebiopsien vorgenommen werden, die, technisch bedingt, lediglich oberflächliche, endoluminale Anteile des Gesamttumors erfassen. Ein korrektes Abbild der biologischen Charakteristika des gesamten Primärtumors könnte unter dieser Gegebenheit unter Umständen nicht dargestellt werden, so dass durch prätherapeutische Responseuntersuchungen an einzelnen oder wenigen Probebiopsien auch keine validen Aussagen über das Ansprechen des Gesamttumors auf eine neoadjuvante Therapie möglich wären.

Weitere genomweite Expressionsanalysen auf Basis der Microarray-Technologie zwecks Etablierung eines validen Markerpanels, mit dem das individuelle Ansprechen von Patienten auf eine spezifische Chemotherapie an prätherapeutischen, formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Biopsien aus der Routinediagnostik vorhergesagt werden kann sowie eine Validierung einzelner Chemotherapie-assoziiertes, potentieller Kandidatengene einer Responseprädiktion sind ebenso notwendig wie die weitere Erforschung der molekularen Karzinogenese und intratumoralen molekulargenetischen Heterogenität des Adenokarzinoms des Ösophagus.

Aus diesem Grund sollten weitere prospektive und insbesondere auch randomisierte klinische Untersuchungen mit hohen Fallzahlen folgen und der bedeutsame Aspekt einer intratumoralen molekulargenetischen Heterogenität anhand von Expressionsanalysen relevanter Gene bzw. Genexpressionsmustern untersucht werden, um die hier und in anderen retrospektiven Arbeiten (Barry WT et al., 2010; Jochumsen KM et al., 2007; Pramana J et al., 2007; Motoori M et al., 2009) gefundenen Ergebnisse zu validieren.

Eine Kombination mit anderen Frühevaluationsmethoden- und parametern wie z.B. dem FDG-PET (Ott K et al., 2006, Lordick F et al., 2007), welches allerdings keine wirklichen prätherapeutischen Aussagen, sondern lediglich eine Evaluation in der Frühphase einer Behandlung über das Ansprechen der Tumore auf eine neoadjuvante Chemotherapie ermöglicht, sind jedoch auf dem Weg zur Etablierung eines auch in der Praxis einsetzbaren prätherapeutischen Tests hoher Sensitivität und Spezifität für die Selektion potentieller Responder und Nonresponder weiterhin notwendig.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Adenokarzinom des Ösophagus weist eine enorme Zunahme der Inzidenz und Prävalenz in den westlichen Industrienationen auf. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt in der Mehrzahl der Fälle bereits ein lokal fortgeschrittenes Tumorstadium vor, weshalb eine alleinige kurative chirurgische Therapie häufig nicht mehr möglich ist. Multimodalen Therapiekonzepten kommt daher eine zentrale Bedeutung zu. Patienten, deren Tumoren auf eine neoadjuvante Chemotherapie ansprechen, zeigen einen signifikanten Überlebensvorteil. Die Hälfte der chemotherapeutisch behandelten Patienten weist allerdings kein objektivierbares Ansprechen im Sinne einer histopathologischen Tumorregression auf und die Prognose dieser Patienten ist schlechter als bei primär chirurgisch behandelten Patienten. Hieraus begründet sich eine dringliche Notwendigkeit diagnostische Methoden zu etablieren, welche eine prätherapeutische Diskriminierung von Respondern und Nonrespondern ermöglichen. Prätherapeutische klinisch-pathologische Untersuchungen können molekularbiologische Tumorcharakteristika, die das maligne Potential und eine Chemotherapiesensibilität ausmachen, nicht erfassen.

Eine objektivierbare, zuverlässige patientenindividualisierte Responseprädiktion scheint vor allem durch die Analyse potentiell prädiktiver molekularer Biomarker im prätherapeutischen, nativen Tumorgewebe, und die Korrelation der Expression mit dem späteren Ansprechen auf die Chemotherapie, möglich zu sein.

Für eine valide molekulare Diagnostik sollte hierbei allerdings sichergestellt sein, dass die in einer Probebiopsie gemessene Expression molekulargenetischer Marker ein repräsentatives Abbild der Genexpression des gesamten Tumors darstellt. Eine starke intratumorale Heterogenität der Expression würde diesem entgegenstehen.

Dieser Fragestellung wurde in der vorliegenden Dissertation anhand einer quantitativen Expressionsanalyse von ausgewählten Genen, deren Expression mit dem Ansprechen auf eine 5-FU und Cisplatin basierten Chemotherapie assoziiert ist, nachgegangen. Hierfür wurden die Genexpressionslevel von Caldesmon (Strukturprotein), DPD (Pyrimidin-Metabolismus), ERCC4 (Reparaturgen), MRP1 (Transportprotein), MTHFR (Pyrimidin-Metabolismus), Her2-/neu (Rezeptor-Tyrosinkinase) und TP (Pyrimidin-Metabolismus) in jeweils fünf topographisch unterschiedlichen Tumorarealen von primär resezierten, lokal fortgeschrittenen Adenokarzinomen des Ösophagus mittels quantitativer Real Time RT-PCR nach

mRNA-Extraktion aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe auf das Vorliegen einer intratumoralen und intertumoralen molekulargenetischen Heterogenität hin untersucht. Zudem wurden die in den Tumorresektaten gemessenen Genexpressionslevel mit denen der korrespondierenden diagnostischen Probebiopsien korreliert.

Das Vorliegen einer signifikanten molekulargenetischen intratumoralen Heterogenität konnte für keines der untersuchten Gene aufgezeigt werden. Alle untersuchten Gene wiesen jedoch zwischen den einzelnen Fällen signifikante Unterschiede auf, und somit eine stärkere inter- als intratumorale Heterogenität. Zudem zeigte sich für nahezu alle untersuchten Gene eine signifikante Korrelation zwischen den Expressionen in den Biopsien und in den korrespondierenden Tumorresektaten.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass beim Adenokarzinom des Ösophagus das Genexpressionsprofil in der Biopsie, zumindest für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene, ein repräsentatives Abbild des Genexpressionsprofils des gesamten Tumors darstellt, und dass prädiktive Responseuntersuchungen an gepoolten Probebiopsien mittels Genexpressionsanalysen möglich und praktikabel zu sein scheinen. Eine Überprüfung einer vorliegenden intratumoralen molekulargenetischen Heterogenität bei der Analyse von möglicherweise prädiktiven Biomarkern scheint allerdings für jeden einzelnen, und insbesondere für potentiell diagnostisch einsetzbare Biomarker dennoch sinnvoll und gerechtfertigt.

Abstract

Adenocarcinomas of the Esophagus are rising in incidence and prevalence in the western countries. At the point of diagnosis most of the carcinomas are locally advanced and cannot be treated by surgery only, which indicates the necessity of a multimodal therapy consisting of preoperative chemotherapy based upon 5-fluorouracil and cisplatin and additive taxol followed by surgery. A significant overall survival has been shown for completely resected patients that responded to neoadjuvant therapy whereas nonresponders, the majority of patients treated by chemotherapy, appear to have a worse outcome. Therefore there is need for discovering and establishing diagnostic methods which may discriminate between responders and nonresponders before neoadjuvant therapy begins.

In this study levels of gene expression from 7 different chemotherapy related genes (Caldesmon, DPD, ERCC4, Her2-/neu, MRP1, MTHFR and TP), which were supposed to play a part in predictive response analysis, were analysed by real time RT-PCR of microdissected specimens from pooled PE, normal tissue of squamous epithelium and five distinctive areas of formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues from 9 cases of untreated locally advanced adenocarcinomas of the esophagus and eliminated for the existence of intratumoral moleculargenetic heterogeneity. Furthermore the gene expression levels from resection specimen were compared with corresponding pooled PE from each case. There could not be shown a significant intratumoral moleculargenetic heterogeneity in all 9 cases but significant intertumoral moleculargenetic heterogeneity between all cases for every single one investigated gene.

The comparison of tumor tissue and PE showed that majority of patients had higher gene expression levels in biopsies than in tumor tissue. There could be revealed an association between altitudes of gene expression levels for most of the cases between biopsy and tumor tissue. Cases with higher gene expression levels in biopsies also had higher gene expression levels in tumor tissue and vice a versa.

A correlation between gene expression levels between tumor tissue and corresponding biopsy was found in most cases. Correlation coefficient Spearman's rho showed significant very strong positive correlation for Her2-/neu and significant positive correlation for ERCC4 and MTHFR. For Caldesmon, MRP1 and TP there could be found significant weak positive correlation.

These findings implicate that pretherapeutic predictive analysis by gene expression levels of some appropriate candidate genes might be a practical and valid diagnostic tool for pretherapeutic discrimination of responders and nonresponders. Pooled biopsies, even though giving information just from the endoluminal part of tumor tissue, seem to represent complete tumor tissue.

In spite of awareness of intratumoral molecular heterogeneity which could not be shown in this study but in some others, including different methods and investigated genes, the evidence of intratumoral molecular heterogeneity should be further eliminated when investigating biomarkers for response prediction or other therapeutic relevant settings.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Adlard, J.W., Richman, S.D., Seymour, M.T., Quirke, P. Prediction of the response of colorectal cancer to systemic therapy. *Lancet Oncol.* 3 (2002) 75 - 82

Ajani, J.A. Current status of new drugs and multidisciplinary approaches in patients with carcinoma of the esophagus. *Chest.* 113 (1998) 112S - 119S

Akamatsu, M., Matsumoto, T., Oka, K., Yamasaki, S., Sonoue, H., Kajiyama, Y., Tsurumaru, M., Sasai, K. c-erbB2-2 oncoprotein expression related to chemoradioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 57 (2003) 1323 – 1327

Albino, D., Scaruffi, P., Moretti, S., Coco, S., Truini, M., Di Cristofano, C., Cavazzana, A., Stigliani, S., Bonassi, S., Tonini, G.P. Identification of low intratumoral gene expression heterogeneity in neuroblastic tumors by genome-wide expression analysis and game theory. *Cancer* 113 (2008) 1412- 1422

Altorki, N.K., Oliveria, S., Schrupp, D.S. Epidemiology and molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Semin. Surg. Oncol.* 13 (1997) 270 - 280

Amatori, F., Di Paolo, A., Del Tacca, M., Fontanini, G., Vannozzi, F., Boldrini, L., Bocci, G., Lastella, M., Danesi, R. Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer and normal mucosa in patients. *Pharmacogenet. Genomics.* 16 (2006) 809 - 816

Ancona, E., Ruol, A., Santi, S., Merigliano, S., Sileni, V.C., Koussis, H., Zaninotto, G., Bonavina, L., Peracchia, A. Only pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy improves significantly the long term survival of patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma: final report of a randomized, controlled trial of preoperative chemotherapy versus surgery alone. *Cancer.* 91 (2001) 2165 - 2174

Andressoo, J.O., Hoeijmakers, J.H., de Waard, H. Nucleotide excision repair and its connection with cancer and ageing. *Adv. Exp. Med. Biol.* 570 (2005) 45 – 83

Ashida, A., Boku, N., Aoyagi, K., Sato, H., Tsubosa, Y., Minashi, K., Muto, M., Ohtsu, A., Ochiai, A., Yoshida, T., Yoshida, S., Sasaki, H. Expression profiling of esophageal squamous cell carcinoma patients treated with definitive chemoradiotherapy: clinical implications. *Int. J. Oncol.* 28 (2006) 1345 - 1352

Atherfold, P.A., Jankowski, J.A. Molecular biology of Barrett's cancer. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 20 (2006) 813 - 827

Aubele, M., Mattis, A., Zitzelsberger, H., Walch, A., Kremer, M., Hutzler, P., Höfler, H., Werner, M. Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer. Genet. Cytogenet.* 110 (1999) 94 - 102

Avidan, B., Sonnenberg, A., Schnell, T.G., Chejfec, G., Metz, A., Sontag, S.J. Hiatal hernia size, Barrett's length, and severity of acid reflux are all risk factors for esophageal adenocarcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* 97 (2002) 1930 - 1936

Bader, F.G., Lordick, F., Fink, U., Becker, K., Höfler, H., Busch, R., Siewert, J.R., Ott, K. Paclitaxel in the neoadjuvant treatment for adeno carcinoma of the distal esophagus (AEG I). A comparison of two phase II trials with long-term follow-up. *Onkologie.* 31 (2008) 366 – 372

Baisse, B., Bouzourene, H., Saraga, E.P., Bosman, F.T., Benhattar, J. Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer.* 93 (2001) 346 – 352

Barry, W.T., Kernagis, D.N., Dressman, H.K., Griffis, R.J., Hunter, J.D., Olson, J.A., Marks, J.R., Ginsburg, G.S., Marcom, P.K., Nevins, J.R., Geradts, J., Datto, M.B. Intratumor heterogeneity and precision of microarray-based predictors of breast cancer biology and clinical outcome. *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 2198 - 2206

Bartels, H., Stein, H.J., Siewert, J.R. Risk analysis in esophageal surgery. *Recent Results Cancer Res.* 155 (2000) 89 - 96

Basu, K.K., de Caestecker, J.S. Surveillance in Barrett's oesophagus: a personal view. *Postgrad. Med. J.* 78 (2002) 263 - 268

Becker, K., Mueller, J.D., Schulmacher, C., Ott, K., Fink, U., Busch, R., Böttcher, K., Siewert, J.R., Höfler, H. Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer.* 98 (2003) 1521 - 1530

Bellmunt, J., Paz-Ares, L., Cuello, M., Cecere, F., Albiol, S., Guillem, V., Gallardo, E., Carles, J., Mendez, P., de la Cruz, J.J., Taron, M., Rosell, R., Baselga, J.; Spanish Oncology Genitourinary Group. Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann. Oncol.* 18 (2007) 522 - 528

Berger, A.C., Farma, J., Scott, W.J., Freedman, G., Weiner, L., Cheng, J.D., Wang, H., Goldberg, M. Complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal carcinoma is associated with significantly improved survival. *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 4330 - 4337

Bollschweiler, E., Wolfgarten, E., Gutschow, C., Hölscher, A.H. Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males. *Cancer.* 92 (2001) 549 - 555

Burak, W.E. Jr. Is neoadjuvant therapy the answer to adenocarcinoma of the esophagus? *Am. J. Surg.* 186 (2003) 296 - 300.

Burian, M., Stein, H.J., Sandler, A., Piert, M., Nährig, J., Feith, M., Siewert, J.R. Sentinel node detection in Barrett's and cardia cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 11 (2004) 255S - 258S

Campos, G.M., DeMeester, S.R., Peters, H.J., Oberg, S., Crookes, P.F., Hagen, J.A., Bremner, C.G., Sillin, L.F. 3rd, Mason, R.J., DeMeester, T.R. Predictive factors of Barrett esophagus: multivariate analysis of 502 patients with gastroesophageal reflux disease. *Arch. Surg.* 136 (2001) 1267 - 1273

Canto, M.I., Yoshida, T., Gossner, L. Chromoscopy of intestinal metaplasia in Barrett's esophagus. *Endoscopy.* 34 (2002) 330 - 336

Carneiro, F., Chaves, P. Pathologic risk factors of adenocarcinoma of the gastric cardia and gastroesophageal junction. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 15 (2006) 697-714

Ceppi, P., Volante, M., Novello, S., Rapa, I., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V., Cambieri, A., Selvaggi, G., Saviozzi, S., Calogero, R., Papotti, M., Scagliotti, G.V. ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann. Oncol.* 17 (2006) 1818 - 1825

Chandrasoma, P., Wickramasinghe, K., Ma, Y., DeMeester, T. Is intestinal metaplasia a necessary precursor lesion for adenocarcinomas of the distal esophagus, gastroesophageal junction and gastric cardia? *Dis. Esophagus.* 20 (2007) 36 - 41

Chang, X.B. Molecular mechanism of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein 1. *Methods Mol. Biol.* 596 (2010) 223 - 249

Chen, X., Ding, Y.W., Yang, G., Bondoc, F., Lee, M.J., Yang, C.S. Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. *Carcinogenesis.* 21 (2000) 257 - 263

Ciaparrone, M., Quirino, M., Schinzari, G., Zannoni, G., Corsi, D.C., Vecchio, F.M., Cassano, A., La Torre, G., Barone, C. Predictive role of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Oncology.* 70 (2006) 36-77

Cohen, V., Panet-Raymond, V., Sabbaghian, N., Morin, I., Batist, G., Rozen, R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 1611 - 1615

Collins, M.L., Zayati, C., Detmer, J.J., Daly, B., Kolberg, J.A., Cha, T.A., Irvine, B.D., Tucker, J., Urdea, M.S. Preparation and characterization of RNA standards for use in quantitative branched DNA hybridization assays. *Anal. Biochem.* 226 (1995) 120 - 129

Corley, D.A., Kubo, A., Levin, T.R., Block, G., Habel, L., Zhao, W., Leighton, P., Quesenberry, C., Rumore, G.J., Buffler, P.A. Abdominal obesity and body mass index as risk factors for Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 133 (2007) 34 - 41

Corley, D.A., Kubo, A., Zhao, W. (2008) Abdominal obesity and the risk of esophageal and gastric cardia carcinomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17 (2008) 352 - 358

Corley, D.A., Kubo, A., Levin, T.R., Block, G., Habel, L., Zhao, W., Leighton, P., Rumore, G., Quesenberry, C., Buffler, P., Parsonnet, J. Helicobacter pylori infection and the risk of Barrett's oesophagus: a community-based study. *Gut.* 57 (2008) 727 - 733

Cunningham, D., Allum, W.H., Stenning, S.P., Thompson, J.N., Van de Velde, C.J., Nicolson, M., Scarffe, J.H., Lofts, F.J., Falk, S.J., Iveson, T.J., Smith, D.B., Langley, R.E., Verma, M., Weeden, S., Chua, Y.J., MAGIC Trial Participants. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N. Engl. J. Med.* 355 (2006) 11 - 20

Deeks, E.D., Scott, L.J. Docetaxel: in gastric cancer. *Drugs.* 67 (2007) 1893 – 1901

DeMeester, T.R. Clinical biology of the Barrett's metaplasia, dysplasia to carcinoma sequence. *Surg. Oncol.* 10 (2001) 91 - 102

DeMeester, S.R. Adenocarcinoma of the esophagus and cardia: a review of the disease and its treatment. *Ann. Surg. Oncol.* 13 (2006) 12 - 30

Demeester, S.R. (2009) Epidemiology and biology of esophageal cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 3 (2009) S2 -S5

Dent, J. Gastro-oesophageal reflux disease. *Digestion.* 59 (1998) 433 - 445

Dong, L.M., Kristal, A.R., Peters, U., Schenk, J.M., Sanchez, C.A., Rabinovitch, P.S., Blount, P.L., Odze, R.D., Ayub, K., Reid, B.J., Vaughan, T.L. Dietary supplement use and risk of neoplastic progression in esophageal adenocarcinoma: a prospective study. *Nutr. Cancer.* 60 (2008) 39 - 48

Duong, C., Greenawalt, D.M., Kowalczyk, A., Ciavarella, M.L., Raskutti, G., Murray, W.K., Philips, W.A., Thomas, R.J. Pretreatment gene expression profiles can be used to predict response to neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 14 (2007) 3602 - 3609

Edelstein, Z.R., Farrow, D.C., Bronner, M.P., Rosen, S.N., Vaughan, T.L. Central adiposity and risk of Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 133 (2007) 403 - 411

Ell, C., May, A., Gossner, L., Pech, O., Günter, E., Mayer, G., Henrich, R., Vieth, M., Müller, H., Seitz, G., Stolte, M. Endoscopic mucosal resection of early cancer and high- grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 118 (2000) 670 - 677

Faller, G., Borchard, F., Ell, C., Seitz, G., Stolte, M., Walch, A., Rüschoff, J.; Working group for Gastroenterological Pathology of the German Society for Pathology Histopathological diagnosis of Barrett's mucosa and associated neoplasias: results of a consensus conference of the Working Group for Gastroenterological Pathology of the German Society for Pathology on 22 September 2001 in Erlangen. *Virchows Arch*. 443 (2003) 597-601

Fareed, K.R., Kaye, P., Soomro, I.N., Ilyas, M., Martin, S., Parsons, S.L., Madhusudan, S. Biomarkers of response to therapy in oesophago-gastric cancer. *Gut*. 58 (2009) 127 - 143

Feagins, L.A., Souza, R.F. Molecular targets for treatment of Barrett's esophagus. *Dis. Esophagus*. 18 (2005) 75 - 86

Filipits, M., Pohl, G., Rudas, M., Dietze, O., Lax, S., Grill, R., Pirker, R., Zielinski, C.C., Hausmaninger, H., Kubista, E., Samonigg, H., Jakesz, R. Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. *Clin. Oncol*. 23 (2005) 1161 - 1168

Fink, U., Stein, H.J., Siewert, J.R. [Multimodal therapy of tumors of the upper gastrointestinal tract]. *Chirurg*. 69 (1998) 349 - 59

Fischel, J.L., Etienne, M.C., Spector, T., Formento, P., Renée, N., Milano, G. Dihydropyrimidine dehydrogenase: a tumoral target for fluorouracil modulation. *Clin. Cancer Res*. 1 (1995) 991 - 996.

Fléjou, J.F. Barrett's oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut*. 54 (2005) i6 - i12

Förster, T. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys. (Leipzig)* 2 (1948) 55 - 75

Fountoulakis, A., Martin, I.G., White, K.L., Dixon, M.F., Cade, J.E., Sue-Ling, H.M., Wild, C.P. Plasma and esophageal mucosal levels of vitamin C: role in the pathogenesis and neoplastic progression of Barrett's esophagus. *Dig. Dis. Sci*. 49 (2004) 914 - 919

Fukuda, H., Takiguchi, N., Koda, K., Oda, K., Seike, K., Miyazaki, M. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase are related to histological effects of 5-fluorouracil and cisplatin neoadjuvant chemotherapy for primary gastric cancer patients. *Cancer Invest*. 24 (2006) 235 - 241

GebSKI, V., Burmeister, B., Smithers, B.M., Foo, K., Zalberg, J., Simes, J.; Australasian Gastro-Intestinal Trials Group. Survival benefits from neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy in oesophageal carcinoma: a meta-analysis. *Lancet Oncol.* 8 (2007) 226 - 234

Geh, J.I., Glynne-Jones, R., Kwok, Q.S., Banerji, U., Livingstone, J.I., Townsend, E.R., Harrison, R.A., Mitchell, I.C. Preoperative ECF chemotherapy in gastro-oesophageal adenocarcinoma. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* 12 (2000) 182 - 187

Gertler, R., Doll, D., Maak, M., Feith, M., Rosenberg, R. Telomere length and telomerase subunits as diagnostic and prognostic biomarkers in Barrett carcinoma. *Cancer.* 112 (2008) 2173 – 2180

Gibson, U.E.M., Heid, C.A., Williams, P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6 (1996) 995 - 1001

Godfrey, T.E., Kim, S.H., Chavira, M., Ruff, D.W., Warren, R.S., Gray, J.W., Jensen, R.H. Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Mol. Diagn.* 2 (2000) 84 - 91

Goldblum, J.R. Barrett's esophagus and Barrett's-related dysplasia. *Mod. Pathol.* 16 (2003) 316 - 324

Gossner, L., Jung, M. [Chromoendoscopy, magnification endoscopy, optic biopsy: showmanship or actual improvement?] *Internist. (Berl)* 42 (2001) 484 - 490, 492 – 3

Graham, T.A., McDonald, S.A. Genetic diversity during the development of Barrett's oesophagus-associated adenocarcinoma: how, when and why? *Biochem. Soc. Trans.* 38 (2010) 374 - 379

Groves, C., Jankowski, J., Barker, F., Holdstock, G. A family history of Barrett's oesophagus: another risk factor? *Scand. J. Gastroenterol.* 40 (2005) 1127 - 1128

Gutschow, C.A., Schröder, W., Hölscher, A.H. Barrett's esophagus: what is the poison - alkaline, biliary or acidic reflux? *Dis. Esophagus.* 15 (2002) 5 - 9

Haigh, C.R., Attwood, S.E., Thompson, D.G., Jankowski, J.A., Kirton, C.M., Pritchard, D.M., Varro, A., Dimaline, R. Gastrin induces proliferation in Barrett's metaplasia through activation of the CCK2 receptor. *Gastroenterology.* 124 (2003) 615 - 625

Hampel, H., Abraham, N.S., El-Serag, H.B. Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann. Intern. Med.* 143 (2005) 199 - 211

Hanna, W., Nofech-Mozes, S., Kahn, H.J. Intratumoral heterogeneity of Her2/neu in breast cancer--a rare event. *Breast J.* 13 (2007) 122 - 129

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. 100 (2000) 57 – 70

Haraguchi, Y., Baba, M., Takao, S., Yoshinaka, H., Hase, S., Aikou, T. Flow cytometric analysis of DNA heterogeneity in superficial carcinoma of the esophagus. *Cancer*. 75 (1995) 914 - 919

Harpole, D.H. Jr., Moore, M.B., Herndon, J.E. 2nd, Aloia, T., D'Amico, T.A., Sporn, T., Parr, A., Linoila, I., Allegra, C. The prognostic value of molecular marker analysis in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 562 - 569

Hayashi, K., Yano, H., Hashida, T., Takeuchi, R., Takeda, O., Asada, K., Takahashi, E., Kato, I., Sobue, K. Genomic structure of the human caldesmon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89 (1992) 12122 - 12126

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M.: Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6 (1996) 986 - 994

Helm, J., Enkemann, S.A., Coppola, D., Barthel, J.S., Kelley, S.T., Yeatman, T.J. Dedifferentiation preceds invasion in the progression from Barrett's metaplasia to esophageal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 2478 – 2485

Hennig, E.E., Mikula, M., Orłowska, J., Jarosz, D., Bielasik, A., Regula, J., Ostrowski, J. Large intra- and inter-individual variability of genes expression levels limits potential predictive value of molecular diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *J. Mol. Med.* 86 (2008) 233 - 242

Hermeking, H. Serial analysis of gene expression and cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 15 (2003) 44 – 49

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology. (N Y)* 10 (1992) 413 - 417

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11(1993) 1026 - 1030

Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 7276 – 7280

Holloway, R.H., Penagini, R., Ireland, A.C. Criteria for objective definition of transient lower esophageal sphincter relaxation. *Am. J. Physiol.* 268 (1995) G128 - G133

Holmes, R.S., Vaughan, T.L. Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* 17 (2007) 2 - 9

Hong, M.K., Laskin, W.B., Herman, B.E., Johnston, M.H., Vargo, J.J., Steinberg, S.M., Allegra, C.J., Johnston, P.G. Expansion of the Ki-67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus. *Cancer*. 75 (1995) 423 - 429

Hulscher, J.B., van Sandick, J.W., de Boer, A.G., Wijnhoven, B.P., Tijssen, J.G., Fockens, P., Stalmeier, P.F., ten Kate, F.J., van Dekken, H., Obertop, H., Tilanus, H.W., van Lanschot, J.J. Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the esophagus. *N. Engl. J. Med.* 347 (2002) 1662 - 1669

Ijuin, T., Nibu, K., Doi, K., Inoue, H., Saitoh, M., Ohtsuki, N., Makino, K., Amatsu, M. Thymidine phosphorylase mRNA level predicts survival of patients with advanced oropharyngeal cancer. *Acta. Otolaryngol.* 127 (2007) 305 – 311

Iqbal, S., Lenz, H.J. Molecular predictors of treatment and outcome in colorectal cancer. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 5 (2003) 399 - 405

Ishikawa, Y., Kubota, T., Otani, Y., Watanabe, M., Teramoto, T., Kumai, K., Kitajima, M., Takechi, T., Okabe, H., Fukushima, M. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and messenger RNA level may be related to the antitumor effect of 5-fluorouracil on human tumor xenografts in nude mice. *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 883 - 9

Ishikawa, Y., Kubota, T., Otani, Y., Watanabe, M., Teramoto, T., Kumai, K., Takechi, T., Okabe, H., Fukushima, M., Kitajima, M. Dihydropyrimidine dehydrogenase and messenger RNA levels in gastric cancer: possible predictor for sensitivity to 5-fluorouracil. *Jpn. J. Cancer Res.* 91 (2000) 105 - 112

Jankowski, J.A., Wright, N.A., Meltzer, S.J., Triadafilopoulos, G., Geboes, K., Casson, A.G., Kerr, D., Young, L.S. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am. J. Pathol.* 154 (1999) 965 - 973

Jankowski, J.A., Harrison, R.F., Perry, I., Balkwill, F., Tselepis, C. Barrett's metaplasia. *Lancet.* 356 (2000) 2079 - 2085

Jankowski, J.A., Odze, R.D. Biomarkers in gastroenterology: between hope and hype comes histopathology. *Am. J. Gastroenterol.* 104 (2009) 1093 - 1096

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.* 59 (2009) 225 – 249

Jochumsen, K.M., Tan, Q., Hølund, B., Kruse, T.A., Mogensen, O. Gene expression in epithelial ovarian cancer: a study of intratumor heterogeneity. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 17 (2007) 979 - 985

Joshi, M.B., Shirota, Y., Danenberg, K.D., Conlon, D.H., Salonga, D.S., Herndon, J.E. 2nd, Danenberg, P.V., Harpole, D.H. Jr. High gene expression of TS1, GSTP1, and ERCC1 are risk factors for survival in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 2215 - 2221

Kaur, B.S., Ouatu-Lascar, R., Omary, M.B., Triadafilopoulos, G. Bile salts induce or blunt cell proliferation in Barrett's esophagus in an acid-dependent fashion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278 (2000) G1000 – G1009

Kikuyama, S., Inada, T., Shimizu, K., Miyakita, M., Ogata, Y. p53, bcl-2 and thymidine phosphorylase as predictive markers of chemotherapy in patients with advanced and recurrent gastric cancer. *Anticancer Res.* 21 (2001) 2149 - 2153

Kim, M.K., Cho, K.J., Kwon, G.Y., Park, S.I., Kim, Y.H., Kim, J.H., Song, H.Y., Shin, J.H., Jung, H.Y., Lee, G.H., Choi, K.D., Kim, S.B. ERCC1 predicting chemoradiation resistance and poor outcome in oesophageal cancer. *Eur. J. Cancer.* 44 (2008) 54 - 60

Kim, S.H., Kwon, H.C., Oh, S.Y., Lee, S., Lee, J.H., Roh, M.S., Kim, D.C., Park, K.J., Choi, H.J., Kim, H.J. Prognostic value of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase pi for 5-FU/oxaliplatin chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* 32 (2009) 38 – 43

Kimchi, E.T., Posner, M.C., Park, J.O., Darga, T.E., Kocherginsky, M., Karrison, T., Hart, J., Smith, K.D., Mezhir, J.J., Weichselbaum, R.R., Khodarev, N.N. Progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma is associated with the suppression of the transcriptional programs of epidermal differentiation. *Cancer Res.* 65 (2005) 3146 - 3154

Kirihara, Y., Yamamoto, W., Toge, T., Nishiyama, M. Dihydropyrimidine dehydrogenase, multidrug resistance-associated protein, and thymidylate synthase gene expression levels can predict 5-fluorouracil resistance in human gastrointestinal cancer cells. *Int. J. Oncol.* 14 (1999) 551 – 556

Koizumi, W., Saigenji, K., Nakamaru, N., Okayasu, I., Kurihara, M. Prediction of response to 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) in patients with inoperable advanced gastric cancer by immunostaining of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor. *Oncology.* 56 (1999) 215 - 222

Kornmann, M., Schwabe, W., Sander, S., Kron, M., Sträter, J., Polat, S., Kettner, E., Weiser, H.F., Baumann, W., Schramm, H., Häusler, P., Ott, K., Behnke, D., Staib, L., Beger, H.G., Link, K.H. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 4116 - 4124

Kruh, G.D., Zeng, H., Rea, P.A., Liu, G., Chen, Z.S., Lee, K., Belinsky, M.G. MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33 (2001) 493 - 501

Kruh, G.D., Belinsky, M.G. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*. 22 (2003) 7537 - 7552

Kubo, A., Block, G., Quesenberry, C.P. Jr., Buffler, P., Corley, D.A. Effects of dietary fiber, fats, and meat intakes on the risk of Barrett's esophagus. *Nutr. Cancer* 61 (2009) 607 – 616

Kwon, H.C., Roh, M.S., Oh, S.Y., Kim, S.H., Kim, M., Kim, J.S., Kim, H.J. Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer. *Ann. Oncol.* 18 (2007) 504 - 509

Kyrgidis, A., Kountouras, J., Zavos, C., Chatzopoulos, D. New molecular concepts of Barrett's esophagus: clinical implications and biomarkers. *J. Surg. Res.* 125 (2005) 189 - 212

Lagergren, J., Bergstrom, R., Lindgren, A., Nyrén, O. (1999) Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 825 - 831

Lagergren, J. Adenocarcinoma of oesophagus: what exactly is the size of the problem and who is at risk? *Gut.* 54 (2005) i1 - i5

Lamb, P.J., Griffin, S.M., Burt, A.D., Lloyd, J., Karat, D., Hayes, N. Sentinel node biopsy to evaluate the metastatic dissemination of oesophageal adenocarcinoma. *Br. J. Surg.* 92 (2005) 60 - 67

Langer, R., Specht, K., Becker, K., Ewald, P., Bekesch, M., Sarbia, M., Busch, R., Feith, M., Stein, H.J., Siewert, J.R., Höfler, H. Association of pretherapeutic expression of chemotherapy-related genes with response to neoadjuvant chemotherapy in Barrett carcinoma. *Clin Cancer Res.* 11 (2005) 7462 - 7469

Langer, R., Specht, K., Becker, K., Ewald, P., Ott, K., Lordick, F., Siewert, J.R., Höfler, H. Comparison of pretherapeutic and posttherapeutic expression levels of chemotherapy-associated genes in adenocarcinomas of the esophagus treated by 5-fluorouracil- and cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. *Am. J. Clin. Pathol.* 128 (2007) 191 - 197

Langer, R., Ott, K., Specht, K., Becker, K., Lordick, F., Burian, M., Herrmann, K., Schrattenholz, A., Cahill, M.A., Schwaiger, M., Hofler, H., Wester, H.J. Protein expression profiling in esophageal adenocarcinoma patients indicates association of heat-shock protein 27 expression and chemotherapy response. *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 8279 - 8287

Langer, R., Ott, K., Feith, M., Lordick, F., Siewert, J.R., Becker, K. Prognostic significance of histopathological tumor regression after neoadjuvant chemotherapy in esophageal adenocarcinomas. *Mod. Pathol.* 22 (2009) 1555 - 1563

Lakowicz, J.R. Chapter 10. Energy Transfer. In: "Principles of Fluorescent Spectroscopy", Plenum Press, N.Y., (1983) pp. 303 – 339

Lakowicz, J.R. Chapter 21. DNA Technology. In: "Principles of Fluorescent Spectroscopy", Springer Science + Business Media, LLC, 3rd edition (2006) pp. 705 - 740

Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K.B., Drummond, R., Gelfand, D.H. (1989) "Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from the extreme thermophile, *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 6427 - 6437

Lee, L.G., Connell, C.R., Bloch, W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3761 - 3766

Leedham, S.J., Preston, S.L., McDonald, S.A., Elia, G., Bhandari, P., Poller, D., Harrison, R., Novelli, M.R., Jankowski, J.A., Wright, N.A. Individual crypt genetic heterogeneity and the origin of metaplastic glandular epithelium in human Barrett's oesophagus. *Gut.* 57 (2008) 1041 - 1048

Leonard, G.D., Fojo, T., Bates, S.E. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist.* 8 (2003) 411 - 424

Lerut, T., Flamen, P., Ectors, N., Van Cutsem, E., Peeters, M., Hiele, M., De Wever, W., Coosemans, W., Decker, G., De Leyn, P., Deneffe, G., Van Raemdonck, D., Mortelmans, L. Histopathologic validation of lymph node staging with FDG-PET scan in cancer of the esophagus and gastroesophageal junction: A prospective study based on primary surgery with extensive lymphadenectomy. *Ann. Surg.* 232 (2000) 743 - 752

Lerut, T., Coosemans, W., Decker, G., De Leyn, P., Moons, J., Naftoux, P., Van Raemdonck, D. Surgical techniques. *J. Surg. Oncol.* 92 (2005) 218 - 229

Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 4 (1995) 357 - 362

Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer.* 3 (2003) 330 - 338

Lordick, F., Stein, H.J., Peschel, C., Siewert, J.R. Neoadjuvant therapy for oesophagogastric cancer. *Br. J. Surg.* 91 (2004) 540 - 551

Lordick, F., Ott, K., Krause, B.J., Weber, W.A., Becker, K., Stein, H.J., Lorenzen, S., Schuster, T., Wieder, H., Herrmann, K., Bredenkamp, R., Höfler, H., Fink, U., Peschel, C., Schwaiger, M., Siewert, J.R. PET to assess early metabolic response and to guide treatment of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction: the MUNICON phase II trial. *Lancet Oncol.* 8 (2007) 797 - 805

Luthra, M.G., Ajani, J.A., Izzo, J., Ensor, J., Wu, T.T., Rashid, A., Zhang, L., Phan, A., Fukami, N., Luthra, R. Decreased expression of gene cluster at chromosome 1q21 defines molecular subgroups of chemoradiotherapy response in esophageal cancers. *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 912 - 919

Luthra, R., Luthra, M.G., Izzo, J., Wu, T.T., Lopez-Alvarez, E., Malhotra, U., Choi, I.S., Zhang, L., Ajani, J.A. Biomarkers of response to preoperative chemoradiation in esophageal cancers. *Semin. Oncol.* 33 (2006) S2 - S5

Luthra, R., Wu, T.T., Luthra, M.G., Izzo, J., Lopez-Alvarez, E., Zhang, L., Bailey, J., Lee, J.H., Bresalier, R., Rashid, A., Swisher, S.G., Ajani, J.A. Gene expression profiling of localized esophageal carcinomas: association with pathologic response to preoperative chemoradiation. *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 259 – 267

Luu, T.D., Gaur, P., Force, S.D., Staley, C.A., Mansour, K.A., Miller, J.I. Jr., Miller, D.L. Neoadjuvant chemoradiation versus chemotherapy for patients undergoing esophagectomy for esophageal cancer. *Ann. Thorac. Surg.* 85 (2008) 1217 – 1223; discussion 1223- 1224

Lyng, H., Beigi, M., Svendsrud, D.H., Brustugun, O.T., Stokke, T., Kristensen, G.B., Sundfør, K., Skjøsberg, A., De Angelis, P.M. Intratumor chromosomal heterogeneity in advanced carcinomas of the uterine cervix. *Int. J. Cancer.* 111 (2004) 358 - 366

Manner, H., May, A., Pech, O., Gossner, L., Rabenstein, T., Günter, E., Vieth, M., Stolte, M., Ell, C. Early Barrett's carcinoma with "low-risk" submucosal invasion: long-term results of endoscopic resection with a curative intent. *Am. J. Gastroenterol.* 103 (2008) 2589 - 2597

Mayne, S.T., Risch, H.A., Dubrow, R., Chow, W.H., Gammon, M.D., Vaughan, T.L., Farrow, D.C., Schoenberg, J.G., Stanford, J.L., Ahsan, H., West, A.B., Rotterdam, H., Blot, W.J., Fraumeni, J.F. Jr. Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10 (2001) 1055 - 1062

Masuda, H., Tanaka, T., Takahama, U. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203 (1994) 175 - 180

Matsubara, J., Nishina, T., Yamada, Y., Moriwaki, T., Shimoda, T., Kajiwara, T., Nakajima, T.E., Kato, H., Hamaguchi, T., Shimada, Y., Okayama, Y., Oka, T., Shirao, K. Impacts of excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1), dihydropyrimidine dehydrogenase, and epidermal growth factor receptor on the outcomes of patients with advanced gastric cancer. *Br. J. Cancer.* 98 (2008) 832 - 839

Meropol, N.J., Gold, P.J., Diasio, R.B., Andria, M., Godfrey, T., Kovatich, A.J., Lund, K.A., Mitchell, E., Schwarting, R. Thymidine phosphorylase expression is associated with response to capecitabine plus

irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 24 (2006) 4069 - 4077. Comment in: *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 4051 - 4053

Metzger, R., Leichman, C.G., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V., Lenz, H.J., Hayashi, K., Groshen, S., Salonga, D., Cohen, H., Laine, L., Crookes, P., Silberman, H., Baranda, J., Konda, B., Leichman, L. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 16 (1998) 309 - 316

Metzger, R., Danenberg, K., Leichman, C.G., Salonga, D., Schwartz, E.L., Wadler, S., Lenz, H.J., Groshen, S., Leichman, L., Danenberg, P.V. High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 2371 - 2376

Miyazono, F., Metzger, R., Warnecke-Eberz, U., Baldus, S.E., Brabender, J., Bollschweiler, E., Doerfler, W., Mueller, R.P., Dienes, H.P., Aikou, T., Hoelscher, A.H., Schneider, P.M. Quantitative c-erbB-2 but not c-erbB-1 mRNA expression is a promising marker to predict minor histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in oesophageal cancer. *Br. J. Cancer.* 91 (2004) 666 – 672

Mizuno, T., Nagamura, H., Iwamoto, K.S., Ito, T., Fukuhara, T., Tokunaga, M., Tokuoka, S., Mabuchi, K., Seyama, T. RNA from decades-old archival tissue blocks for retrospective studies. *Diagn. Mol. Pathol.* 7 (1998) 202 - 208

Motoori, M., Takemasa, I., Yamasaki, M., Komori, T., Takeno, A., Miyata, H., Takiguchi, S., Fujiwara, Y., Yasuda, T., Yano, M., Matsuura, N., Matsubara, K., Monden, M., Mori, M., Doki, Y. The feasibility of using biopsy samples from esophageal cancer for comprehensive gene expression profiling. *Int. J. Oncol.* 35 (2009) 265 - 271

MRC Oesophageal Cancer Working Group. Surgical resection with or without preoperative chemotherapy in oesophageal cancer: a randomised controlled trial. *Lancet.* 359 (2002) 1727 - 1733

Mullis, K.B., Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155 (1987) 335 - 350

Muss, H.B., Thor, A.D., Berry, D.A., Kute, T., Liu, E.T., Koerner, F., Cirrincione, C.T., Budman, D.R., Wood, W.C., Barcos, M., Henderson, I.C. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *New Engl. J. Med.* 330 (1994) 1260 - 1266. Erratum in: *N. Engl. J. Med.* 331 (1994) 211

Napieralski, R., Ott, K., Kremer, M., Specht, K., Vogelsang, H., Becker, K., Müller, M., Lordick, F., Fink, U., Siewert J.R., Höfler, H., Keller, G. Combined GADD45A and thymidine phosphorylase expression levels predict response and survival of neoadjuvant-treated gastric cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 3025 - 3031

Nathrath, M., Kremer, M., Letzel, H., Remberger, K., Höfler, H., Ulle, T. Expression of genes of potential importance in the response to chemotherapy in osteosarcoma patients. *Klin. Padiatr.* 214 (2002) 230 - 235

Nishiyama, M., Yamamoto, W., Park, J.S., Okamoto, R., Hanaoka, H., Takano, H., Saito, N., Matsukawa, M., Shirasaka, T., Kurihara, M. Low-dose cisplatin and 5-fluorouracil in combination can repress increased gene expression of cellular resistance determinants to themselves. *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 2620 – 2628

Oberg, S., Peters, J.H., DeMeester, T.R., Lord, R.V., Johansson, J., DeMeester, S.R., Hagen, J.A. Determinants of intestinal metaplasia within the columnar-lined esophagus. *Arch. Surg.* 135 (2000) 651 - 655; discussion 655 - 656

Oberg, S., Wenner, J., Johansson, J., Walther, B., Willén, R. Barrett esophagus: risk factors for progression to dysplasia and adenocarcinoma. *Ann. Surg.* 242 (2005) 49 - 54

Oeda, M., Yoshida, K., Sanada, Y., Wada, Y., Suzuki, T., Mizuiri, H., Konishi, K., Shigematsu, H., Tanabe, K., Fukushima, M. The expression profiles of orotate phosphoribosyltransferase and dihydropyrimidine dehydrogenase in gastric cancer and their clinical significance. *Oncol. Rep.* 16 (2006) 1165 - 1172

Olaussen, K.A., Dunant, A., Fouret, P., Brambilla, E., André, F., Haddad, V., Taranchon, E., Filipits, M., Pirker, R., Popper, H.H., Stahel, R., Sabatier, L., Pignon, J.P., Tursz, T., Le Chevalier, T., Soria, J.C.; IALT Bio Investigators. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 355 (2006) 983 – 991

Ott, K., Weber, W.A., Lordick, F., Becker, K., Busch, R., Herrmann, K., Wieder, H., Fink, U., Schwaiger, M., Siewert, J.R. Metabolic imaging predicts response, survival, and recurrence in adenocarcinomas of the esophagogastric junction. *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 4692 - 4698

Ott, K., Bader, F.G., Lordick, F., Feith, M., Bartels, H., Siewert, J.R. Surgical factors influence the outcome after Ivor-Lewis esophagectomy with intrathoracic anastomosis for adenocarcinoma of the esophagogastric junction: a consecutive series of 240 patients at an experienced center. *Ann. Surg. Oncol.* 16 (2009) 1017 - 1025

Owonikoko, T., Rees, M., Gabbert, H.E., Sarbia, M. Intratumoral genetic heterogeneity in Barrett adenocarcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 117 (2002) 558 - 566

Park, S., Shimizu, C., Shimoyama, T., Takeda, M., Ando, M., Kohno, T., Katsumata, N., Kang, Y.K., Nishio, K., Fujiwara, Y. Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 99 (2006) 9 - 17

Pathirana, A., Poston, G.J. Lessons from Japan--endoscopic management of early gastric and oesophageal cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 27 (2001) 9 – 16

PCR Technical Information (1996), in: Perkin-Elmer Systems, Reagents & Consumables, 1996-1997, Foster City, CA

Pech, O., May, A., Günter, E., Gossner, L., Ell, C. The impact of endoscopic ultrasound and computed tomography on the TNM staging of early cancer in Barrett's esophagus. *Am. J. Gastroenterol.* 101 (2006) 2223 - 2229

Pera, M. Epidemiology of esophageal cancer, especially adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Recent Results Cancer Res.* 155 (2000) 1 - 14

Pera, M., Manterola, C., Vidal, O., Grande, L. Epidemiology of esophageal adenocarcinoma. *J. Surg. Oncol.* 92 (2005) 151 – 159

Perkin-Elmer Cooperation (1998). *Abi Prism 7700 Sequence Detection System: Relative quantitation of gene expression. User Bulletin #2.* Norwalk, CT: Perkin-Elmer Corporation

Pertschuk, L.P., Axiotis, C.A., Feldman, J.G., Kim, Y.-D., Karavattayhayil, S.J., Braithwaite, L. Marked Intratumoral Heterogeneity of the Proto-Oncogene *Her2-neu* Determined by Three Different Detection Systems. *Breast J.* 5 (2002) 369 - 374

Powell, J., McConkey, C.C., Gillison, E.W., Spychal, R.T. (2002) Continuing rising trend in oesophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 102 (2002) 422 - 427. Erratum in: *Int. J. Cancer.* 104 (2003) 798

Pramana, J., Pimentel, N., Hofland, I., Wessels, L.F.A., van Velthuysen, M.-L. F., Atsma, D., Rasch, C.R.N., van den Brekel, M.W.M., Begg, A.C. Heterogeneity of gene expression profiles in head and neck cancer. *Head & Neck* 29 (2007) 1083 - 1089

Pritchard, K.I., Shepherd, L.E., O'Malley, F.P., Andrulis, I.L., Tu, D., Bramwell, V.H., Levine, M.N.; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 354 (2006) 2103 – 2111

Rabinovitch, P.S., Longton, G., Blount, P.L., Levine, D.S., Reid, B.J. Predictors of progression in Barrett's esophagus III: baseline flow cytometric variables. *Am. J. Gastroenterol.* 96 (2001) 3071 - 3083

Rabik, C.A., Dolan, M.E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat. Rev.* 33 (2007) 9 - 23

Rausser, S., Weis, R., Braselmann, H., Feith, M., Stein, H.J., Langer, R., Hutzler, P., Hausmann, M., Lassmann, S., Siewert, J.R., Höfler, H., Werner, M., Walch, A. Significance of HER2 low-level copy gain in Barrett's cancer: implications for fluorescence in situ hybridization testing in tissues. *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 5115 - 23

Rizk, N.P., Venkatraman, E., Bains, M.S., Park, B., Flores, R., Tang, L., Ilson, D.H., Minsky, B.D., Rusch, V.W. ; American Joint Committee on Cancer. American Joint Committee on Cancer staging system does not accurately predict survival in patients receiving multimodality therapy for esophageal adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 507 - 512

Robaszekiewicz, M., Volant, A., Hardy, E., Noursbaum, J.B., Calament, G., Cauvin, J.M., Bail, J.P., Lozach, P., Gouerou, H. Demonstration of clonal heterogeneity in adenocarcinomas on Barrett's esophagus by flow cytometric study of cellular DNA content. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 16 (1992) 540 – 546

Robert Koch-Institut (2008) Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008

Salonga, D., Danenberg, K.D., Johnson, M., Metzger, R., Groshen, S., Tsao-Wei, D.D., Lenz, H.J., Leichman, C.G., Leichman, L., Diasio, R.B., Danenberg, P.V. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 1322 - 7

Sasaki, K., Murakami, T., Murakami, T., Nakamura, M. Intratumoral heterogeneity in DNA ploidy of esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer.* 68 (1991) 2403 - 2406

Sawyers, C.L. The cancer biomarker problem. *Nature.* 452 (2008) 548 - 552

Scherf, U., Ross, D.T., Waltham, M., Smith, L.H., Lee, J.K., Tanabe, L., Kohn, K.W., Reinhold, W.C., Myers, T.G., Andrews, D.T., Scudiero, D.A., Eisen, M.B., Sausville, E.A., Pommier, Y., Botstein, D., Brown, P.O., Weinstein, J.N. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat. Genet.* 24 (2000) 236 - 244

Scotto, K.W. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene.* 22 (2003) 7496 - 7511

Schneider, S., Uchida, K., Brabender, J., Baldus, S.E., Yochim, J., Danenberg, K.D., Salonga, D., Chen, P., Tsao-Wei, D., Groshen, S., Hoelscher, A.H., Schneider, P.M., Danenberg, P.V. Downregulation of TS,

DPD, ERCC1, GST-Pi, EGFR, and HER2 gene expression after neoadjuvant three-modality treatment in patients with esophageal cancer. *J. Am. Coll. Surg.* 200 (2005) 336 - 344

Schneider, P.M., Baldus, S.E., Metzger, R., Kocher, M., Bongartz, R., Bollschweiler, E., Schaefer, H., Thiele, J., Dienes, H.P., Mueller, R.P., Hoelscher, A.H. Histomorphologic tumor regression and lymph node metastasis determine prognosis following neoadjuvant radiochemotherapy for esophageal cancer: implications for response classification. *Ann. Surg.* 242 (2005) 684 - 692

Sharma, P., Falk, G.W., Weston, A.P., Reker, D., Johnston, M., Sampliner, R.E. Dysplasia and cancer in a large multicenter cohort of patients with Barrett's esophagus. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4 (2006) 566 - 572

Shimizu, D., Vallböhmer, D., Kuramochi, H., Uchida, K., Schneider, S., Chandrasoma, P.T., Shimada, H., DeMeester, T.R., Danenberg, K.D., Peters, J.H., DeMeester, S.R., Danenberg, P.V. Increasing cyclooxygenase-2 (cox-2) gene expression in the progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma correlates with that of Bcl-2. *Int. J. Cancer.* 119 (2006) 765 - 770

Shirota, Y., Stoehlmacher, J., Brabender, J., Xiong, Y.P., Uetake, H., Danenberg, K.D., Groshen, S., Tsao-Wei, D.D., Danenberg, P.V., Lenz, H.J. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 19 (2001) 4298 - 4304

Shirvani, V.N., Ouatu-Lascar, R., Kaur, B.S., Omary, M.B., Triadafilopoulos, G. Cyclooxygenase 2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma: Ex vivo induction by bile salts and acid exposure. *Gastroenterology.* 118 (2000) 487 - 496

Siewert, J.R., Stein, H.J., Feith, M. Surgical approach to invasive adenocarcinoma of the distal esophagus (Barrett's cancer). *World J. Surg.* 27 (2003) 1058 - 1061

Siewert, J.R., Feith, M., Stein, H.J. Biologic and clinical variations of adenocarcinoma at the esophago-gastric junction: relevance of a topographic-anatomic subclassification. *J. Surg. Oncol.* 90 (2005) 139 - 146; discussion 146

Siewert, J.R., Stein, H.J., Feith, M. Adenocarcinoma of the esophago-gastric junction. *Scand. J. Surg.* 95 (2006) 260 - 269

Siewert, J.R., Lordick, F., Ott, K., Stein, H.J., Weber, W.A., Becker, K., Peschel, C., Fink, U., Schwaiger, M. Induction chemotherapy in Barrett's cancer: influence on surgical risk and outcome. *Ann. Surg.* 246 (2007) 624 - 628; discussion 628 - 631

Skinner, D.B., Walther, B.C., Riddell, R.H., Schmidt, H., Iacone, C., DeMeester, T.R. Barrett's esophagus. Comparison of benign and malignant cases. *Ann. Surgery.* 198 (1983) 554 - 565

Smith, M.Q., Staley, C.A., Kooby, D.A., Styblo, T., Wood, W.C., Yang, L. Multiplexed fluorescence imaging of tumor biomarkers in gene expression and protein levels for personalized and predictive medicine. *Curr. Mol. Med.* 9 (2009) 1017 - 1023

Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C. (Hrsg.) UICC TNM Classification of Malignant Tumours. 7th edition. Wiley-Blackwell, New York, 2010

Specht, K., Richter, T., Müller, U., Walch, A., Werner, M., Höfler, H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am. J. Pathol.* 158 (2001) 419 – 429

Specht, K., Richter, T., Müller, U., Walch, A., Höfler, H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival tissue by real-time RT-PCR. *J. Mol. Med.* 78 (2000) B27

Specht, K., Kremer, M., Müller, U., Dirnhofer, S., Rosemann, M., Höfler, H., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F. Identification of cyclin D1 mRNA overexpression in B-cell neoplasias by real-time reverse transcription-PCR of microdissected paraffin sections. *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 2902 – 2911

Stein, H.J., Siewert, J.R. Improved prognosis of resected esophageal cancer. *World J. Surg.* 28 (2004) 520 - 525

Stein, H.J., von Rahden, B.H., Siewert, J.R. Survival after oesophagectomy for cancer of the oesophagus. *Langenbecks Arch. Surg.* 390 (2005) 280 - 285

Stein, H.J., Feith, M., Bruecher, B.L., Naehrig, J., Sarbia, M., Siewert, J.R. Early esophageal cancer: pattern of lymphatic spread and prognostic factors for long-term survival after surgical resection. *Ann. Surg.* 242 (2005) 566 - 573; discussion 573 - 575

Stein, H., Sarbia, M. Adenokarzinome des distalen Ösophagus und ösophago-gastralen Übergangs (so genannte AEG-Tumoren). In: "Manual Gastrointestinale Tumoren 2006" Sendler, A. (Hrsg.) Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München, 2006, 7. Auflage, 19 - 25

Swisher, S.G., Hofstetter, W., Wu, T.T., Correa, A.M., Ajani, J.A., Komaki, R.R., Chirieac, L., Hunt, K.K., Liao, Z., Phan, A., Rice, D.C., Vaporciyan, A.A., Walsh, G.L., Roth, J.A. Proposed revision of the esophageal cancer staging system to accommodate pathologic response (pP) following preoperative chemoradiation (CRT). *Ann. Surg.* 241 (2005) 810 - 817; discussion 817 - 820

Takeuchi, H., Fujii, H., Ando, N., Ozawa, S., Saikawa, Y., Suda, K., Oyama, T., Mukai, M., Nakahara, T., Kubo, A., Kitajima, M., Kitagawa, Y. Validation study of radio-guided sentinel lymph node navigation in esophageal cancer. *Ann. Surg.* 249 (2009) 757 – 763

Terrazzino, S., Agostini, M., Pucciarelli, S., Pasetto, L.M., Friso, M.L., Ambrosi, A., Lisi, V., Leon, A., Lise, M., Nitti, D. A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene predicts poor tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiation. *Pharmacogenet. Genomics.* 16 (2006) 817 - 824

Theisen, J., Peters, J.H., Fein, M., Hughes, M., Hagen, J.A., Demeester, S.R., Demeester, T.R., Laird, P.W. The mutagenic potential of duodeno-esophageal reflux. *Ann. Surg.* 241 (2005) 63 - 68

Theisen, J., Stein, H.J., Feith, M., Kauer, W.K., Dittler, H.J., Pirchi, D., Siewert, J.R. Preferred location for the development of esophageal adenocarcinoma within a segment of intestinal metaplasia. *Surg. Endosc.* 20 (2006) 235 – 238

Theisen, J., Feith, M., Stein, H.J., Siewert, J.R. Management of early esophageal cancer. *Adv. Surg.* 41 (2007) 229 - 239

Theisen, J., Danenberg, K., Ott, K., Becker, K., Danenberg, D., Stein, H.J., Siewert, J.R. Predictors of response and survival for neoadjuvant treated patients with esophageal adenocarcinoma. *Dis. Esophagus.* 21 (2008) 601 - 606

Thomas, T., Abrams, K.R., De Caestecker, J.S., Robinson, R.J. Meta analysis: Cancer risk in Barrett's oesophagus. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 26 (2007) 1465 - 1477

Tobey, N.A., Hosseini, S.S., Caymaz-Bor, C., Wyatt, H.R., Orlando, G.S., Orlando, R.C. The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. *Am. J. Gastroenterol.* 96 (2001) 3062 - 3070

Vallböhmer, D., Peters, J.H., Oh, D., Kuramochi, H., Shimizu, D., Demeester, S.R., Hagen, J.A., Chandrasoma, P.T., Danenberg, K.D., DeMeester, T.R., Danenberg, P. Survivin, a potential biomarker in the development of Barrett's adenocarcinoma. *Surgery.* 138 (2005) 701 - 706; discussion 706 – 707

Vance, G.H., Barry, T.S., Bloom, K.J., Fitzgibbons, P.L., Hicks, D.G., Jenkins, R.B., Persons, D.L., Tubbs, R.R., Hammond, M.E.; College of American Pathologists. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 133 (2009) 611 - 612

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3 (2002) RESEARCH0034

van Westreenen, H.L., Westerterp, M., Bossuyt, P.M., Pruijm, J., Sloof, G.W., van Lanschot, J.J., Groen, H., Plukker, J.T. Systematic review of the staging performance of 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in esophageal cancer. *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 3805 - 3812

van't Veer, L.J., Bernards, R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature.* 452 (2008) 564 – 570

Vizcaino, A.P., Moreno, V., Lambert, R., Parkin, D.M. Time trends incidence of both major histologic types of esophageal carcinomas in selected countries, 1973-1995. *Int. J. Cancer.* 99 (2002) 860 - 868. Erratum in: *Int. J. Cancer* 101 (2002) 599

von Rahden, B.H., Stein, H.J., Pühringer, F., Koch, I., Langer, R., Piontek, G., Siewert, J.R., Höfler, H., Sarbia, M. Coexpression of cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and vascular endothelial growth factors (VEGF-A, VEGF-C) in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 65 (2005) 5038 - 5044

von Rahden, B.H., Stein, H.J., Feith, M., Becker, K., Siewert, J.R. Lymphatic vessel invasion as a prognostic factor in patients with primary resected adenocarcinomas of the esophagogastric junction. *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 874 – 879

von Rahden, B.H., Stein, H.J., Siewert, J.R. Surgical management of esophageogastric junction tumors. *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 6608 – 6613

Walch, A., Komminoth, P., Hutzler, P., Aubele, M., Höfler, H., Werner, M. Microdissection of tissue sections: application to the molecular genetic characterisation of premalignant lesions. *Pathobiology.* 68 (2000) 9 - 17

Walch, A., Specht, K., Smida, J., Aubele, M., Zitzelsberger, H., Höfler, H., Werner, M. Tissue microdissection techniques in quantitative genome and gene expression analyses. *Histochem. Cell. Biol.* 115 (2001) 269 - 276

Walch, A., Bink, K., Hutzler, P., Höfler, H., Werner, M. HER-2/neu gene amplification by FISH predicts poor survival in Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* 31 (2000) 1332 - 1334

Walch, A., Zitzelsberger, H.F., Bruch, J., Keller, G., Angermeier, D., Aubele, M., Mueller, J., Stein, H., Braselmann, H., Siewert, J.R., Höfler, H., Werner, M. Chromosomal imbalances in Barrett's adenocarcinoma and the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 555 - 566

Walch, A., Specht, K., Bink, K., Zitzelsberger, H., Braselmann, H., Bauer, M., Aubele, M., Stein, H., Siewert, J.R., Höfler, H., Werner, M. Her-2/neu gene amplification, elevated mRNA expression, and protein overexpression in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Lab. Invest.* 81 (2001) 791 - 801

Walch, A., Bink, K., Gais, P., Stangl, S., Hutzler, P., Aubele, M., Mueller, J., Höfler, H., Werner, M. Evaluation of c-erbB-2 overexpression and Her-2/neu gene copy number heterogeneity in Barrett's adenocarcinoma. *Anal. Cell. Pathol.* 20 (2000) 25 – 32

Walch, A., Specht, K., Braselmann, H., Stein, H., Siewert, J.R., Hopt, U., Höfler, H., Werner, M. Coamplification and coexpression of GRB7 and ERBB2 is found in high grade intraepithelial neoplasia and in invasive Barrett's carcinoma. *Int. J. Cancer.* 112 (2004) 747 - 753

Warnecke-Eberz, U., Metzger, R., Miyazono, F., Baldus, S.E., Neiss, S., Brabender, J., Schaefer, H., Doerfler, W., Bollschweiler, E., Dienes, H.P., Mueller, R.P., Danenberg, P.V., Hoelscher, A.H., Schneider, P.M. High specificity of quantitative excision repair cross-complementing 1 messenger RNA expression for prediction of minor histopathological response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 3794 - 3799

Warnecke-Eberz, U., Hokita, S., Xi, H., Higashi, H., Baldus, S.E., Metzger, R., Brabender, J., Bollschweiler, E., Mueller, R.P., Dienes, H.P., Hoelscher, A.H. Overexpression of survivin mRNA is associated with a favorable prognosis following neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *Oncol. Rep.* 13 (2005) 1241 – 1246

Warnecke-Eberz, U., Vallböhmer, D., Alakus, H., Kütting, F., Lurje, G., Bollschweiler, E., Wienand-Dorweiler, A., Drebber, U., Hölscher, A.H., Metzger, R. ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms predict response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *J. Gastrointest. Surg.* 13 (2009) 1411 – 1421

Weichert, W., Röske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Ebert, M.P., Pross, M., Dietel, M., Denkert, C., Röcken, C. Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 9 (2008) 139 – 148

Weichert, W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett.* 280 (2009) 168 - 176

Weston, A.P., Krmpotich, P.T., Cherian, R., Dixon, A., Topalovski, M. Prospective long-term endoscopic and histological follow-up of short segment Barrett's esophagus: comparison with traditional long segment Barrett's esophagus. *Am. J. Gastroenterol.* 92 (1997) 407 - 413

Weston, A.P., Badr, A.S., Topalovski, M., Cherian, R., Dixon, A., Hassanein, R.S. Prospective evaluation of the prevalence of gastric *Helicobacter pylori* infection in patients with GERD, Barrett's esophagus, Barrett's dysplasia, and Barrett's adenocarcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* 95 (2000) 387 - 394

Whittles, C.E., Biddlestone, L.R., Burton, A., Barr, H., Jankowski, J.A., Warner, P.J., Shepherd, N.A. Apoptotic and proliferative activity in the neoplastic progression of Barrett's oesophagus: a comparative study. *J. Pathol.* 187 (1999) 535 - 540

Yamada, T., Tanaka, N., Yokoi, K., Ishikawa, N., Seva, T., Horiba, K., Kanazawa, Y., Shirakawa, T., Ohkawa, K., Kudoh, H., Koizumi, M., Yoshioka, M., Shinji, S., Yamashita, K., Tajiri, T. [Prediction of sensitivity to 5-fluorouracil (5-fu) by metabolic and target enzyme activities in colon cancer.] *Gan. To. Kagaku. Ryoho.* 33 (2006) 1603 - 1609

Ye, W., Held, M., Lagergren, J., Engstrand, L., Blot, W.J., McLaughlin, J.K., Nyrén, O. Helicobacter pylori infection and gastric atrophy: Risk of adenocarcinoma and squamous-cell carcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *J. Natl. Cancer Inst.* 96 (2004) 388 - 396

Zacherl, J., Sendler, A., Stein, H.J., Ott, K., Feith, M., Jakesz, R., Siewert, J.R., Fink, U. Current status of neoadjuvant therapy for adenocarcinoma of the distal esophagus. *World J. Surg.* 27 (2003) 1067 - 1074

Zimmermann, F., Meining, A., Lordick, F., Sarbia, M., Brücher, B. Ösophagus-Plattenepithelkarzinom. In: "Manual Gastrointestinale Tumoren 2006", Sendler, A. (Hrsg.) Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München, 2006, 7. Auflage, 1 - 18

Zitzelsberger, H., Kulka, U., Lehmann, L., Walch, A., Smida, J., Aubele, M., Lörch, T., Höfler, H., Bauchinger, M., Werner, M. Genetic heterogeneity in a prostatic carcinoma and associated poststatic intraepithelial neoplasia as demonstrated by combined use of laser-microdissection, degenerate oligonucleotide primed PCR and comparative genomic hybridization. *Virchows Arch.* 433 (1998) 297 - 304

Xi, H., Baldus, S.E., Warnecke-Eberz, U., Brabender, J., Neiss, S., Metzger, R., Ling, F.C., Dienes, H.P., Bollschweiler, E., Moenig, S., Mueller, R.P., Hoelscher, A.H., Schneider, P.M. High cyclooxygenase-2 expression following neoadjuvant radiochemotherapy is associated with minor histopathologic response and poor prognosis in esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 8341 - 8347

7. ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-fluorouracil
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
18-FDG-PET	18-Fluordesoxyglukose-Positronenemissionstomographie
Abb.	Abbildung
ABCC1	ATP-binding cassette (ABC)C1= MRP1
AEG	Adenokarzinom des ösophagogastralen Übergangs
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Computertomographie
C _T -Wert	Threshold-Zyklus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERCC4	Excision Repair Cross-Complementing (Group) 4
FP	Forwardprimer
GEP	Gene expression profiling
GERD	Gastro-Esophageal-Reflux-Disease
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HDAC	Histon-Deacetylase
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin Färbung
Her2-/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HGIN	High Grade Intraepitheliale Neoplasie
LGIN	Low Grade Intraepitheliale Neoplasie
LOH	Loss of heterozygosity
LSBE	Long Segment Barrett Esophagus
MRP1	Multidrug Resistance associated Protein 1
MTHFR	Methylen-tetra-hydrofolat-Reduktase
NTC	No template control
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Probebiopsie

pTNM	pathologische Tumorklassifikation (T = Primärtumor; N = Nodalstatus; M = Fernmetastasierung)
RB	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reverseprimer
RT	Reverse Transkription
RT- PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase Chain Reaction
rpm	rounds per minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSBE	Short Segment Barrett Esophagus
Tab.	Tabelle
TP	Thymidylat-Phosphorylase
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
Vgl.	Vergleich

7.2 Materialien

7.2.1 Allgemeine Gebrauchsgegenstände

eppendorf Centrifuge 5417 R;	Eppendorf AG, Hamburg
eppendorf Thermomixer comfort (1,5 ml);	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlschrank (4°C);	Siemens AG, Berlin/München
Kühlschrank-Eisfach (-20°C);	Siemens AG, Berlin/München
Gefrierschrank (-70°C);	Siemens AG, Berlin/München
Pipetman®, Precision microliter pipette;	GILSON, Frankreich
Aerosol Resistant Tips;	Molecular BioProducts Inc., San Diego, CA, USA
Corning (50 ml) Centrifuge Tubes;	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Original eppendorf, Save-lock Tubes 1,5 ml;	Eppendorf AG, Hamburg

Mikrodissektion

Superfrost®Plus;	MENZEL-GLÄSER, Braunschweig
Microtomb HM 335 E;	MICROM GmbH, Walldorf
Kühlplatte;	Pool of Scientific Instruments, Lauenbach

WILD Photomakroskop M 400; HEERBRUGG, Leica, Wetzlar
Skalpellklingen Steril; Gebrüder Martin, Tuttlingen

RT-PCR

96-well Optical Reaction Plate; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Optical Caps; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

7.2.2 Lösungen und Reagenzien

RNase ERASE; ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
DEPC, DIETHYL PYROCARBONATE; SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Ampuwa-H₂O; Boehringer, Ingelheim
Instant Haematoxylin A/B (53,6 g/46,8 g); Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA

Entparaffinierung

Xylol Pharm. Helv. VI (Isomerengemisch); Aug. Hedinger GmbH & Co., Stuttgart
Ethanol absolut 99.8%; Apotheke Klinikum Rechts der Isar, TU München

Mikrodissektion

Sodium dodecyl sulfate (SDS); SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Tris-HCL 1 M; SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis, Mo, USA
EDTA Disodium Salt, 0,5 M; SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim

PK-Puffer (Lyse-Puffer): 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
0,5 mM EDTA (pH 8,0)
10% SDS

H₂O-DEPC: 1000 µl DEPC ad 1 Liter Aqua dest.
(24 Stunden Autoklavierung unter dem Abzug)

RNA-Extraktion

Natriumacetat-trihydrat (2M, gelöst in Essigsäure, pH 4,0-4,5);	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Phenol (pH 4,5-5,5; Phenol:Wasser=3,75:1, v/v);	Gibco, Karlsruhe
Chloroform 99%+;	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Glykogen (20 mg/ml);	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Isopropanol 99%+;	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Proteinase K (50 mg/ml);	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

cDNA-Synthese und RT-PCR

Random Primer = Hexanucleotide Mix(10x conc. Reaction buffer (0,5 M Tris-HCl, 0,1 M MgCl ₂ , 1 mM dithioerythritol (DTE), mg/ml BSA, hexanucleotides, 62,5 A260 units/ml, pH 7,2 at 20°C);	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
First-Strand-Buffer;	Gibco, Karlsruhe
DTT 0,1 M (RT-Kit);	Gibco, Karlsruhe

GeneAmp® dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 3,2 µm à 320µl, 10 mM);	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNasin, Protector RNase Inhibitor 10000 U (5 vials of 2000 U) (Vol.-Act.: 40 U/ml, 5 vials of 50 µl);	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Superscript™ II RNase H- Reverse Transcriptase 10000 U (200 U/µl), (Reverse Transcriptase in Storage Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl : 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,01% NP- 40; 50% Glycerol; First- Strand- Buffer (250 mM Tris-HCl (pH: 8,3); 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂);	Gibco, Karlsruhe
---	------------------

TaqMan®Universal PCR Master Mix;	Applied Biosystems, Roche, Branchburg, NY, USA
----------------------------------	---

Primer-Probe-Set, Assays-on-demand

(Probe, Forward amplification primer, Reverse amplification primer)

MTHFR: Mat.Nr.: Hs00195560_m1; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Caldesmon: Mat.Nr.: Hs00263998_m1; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

MRP1: Mat.Nr.: Hs 00219905_m1; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Einzelne Primer (FP, RP) und Probes (GSF-National Research Center for Environment and Health, Neuherberg in Zusammenarbeit mit Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

TP: FP: TPNM1953mRNA736F (CAG AGA TGT GAC AGC CAC CGT)

RP: TPNM1953mRNA831R (TCC ACC ACC AGA GCG GACA)

Probe: (CTG CCA CTC ATC ACA GCC TCC ATT CTC)

DPD: FP: (TGG TCT TCA GTT TCT CCA TAG TGG)

RP: (CTT CGA TCA CAG TGA AAT CCT GAT)

Probe: (CCG TCC TCC AGG TAT GCA GTG CCAT)

ERCC4: FP: ERCC4F1956-1982 (AAA CTT AGA CCT AGT AAG AGG CAC AGC)

RP: ERCC4R2027-2012 (TCC TGG CCA CCG GCTT)

Probe: (TGC AGA TGT TTC CAC TGA CAC TCG GAA)

Her2-/neu: FP: HuHER2mRNA2612F (ACC TGC TGA ACT GGT GTA TGCA)

RP: HuHER2mRNA2679R (GTG TAC GAG CCG CAC ATC CT)

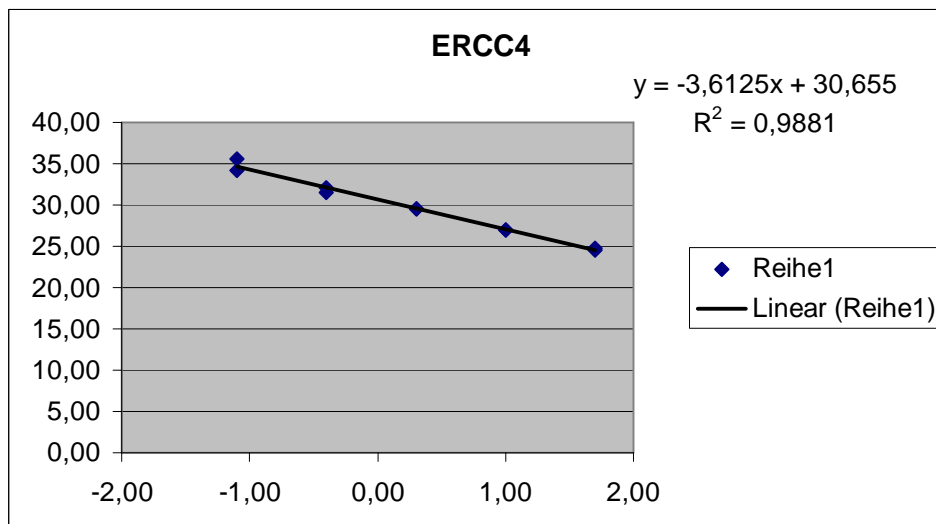
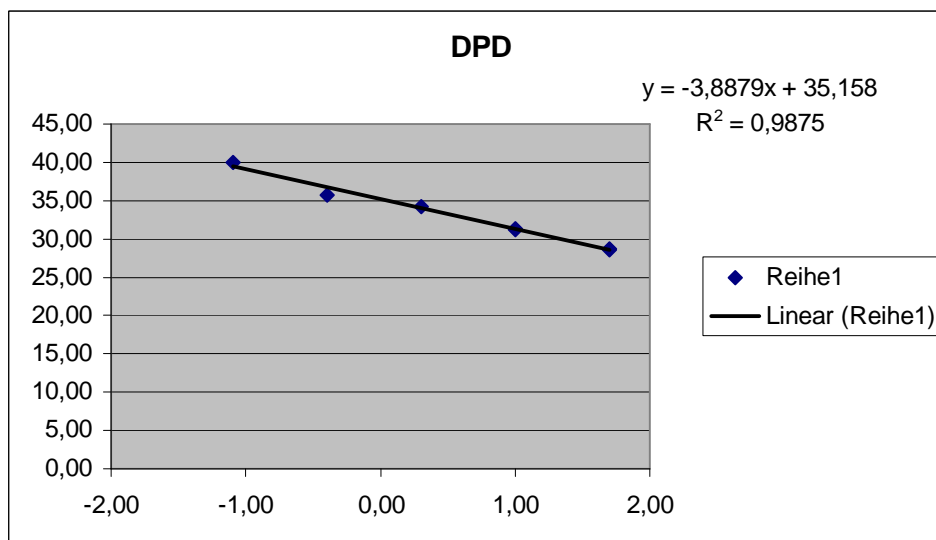
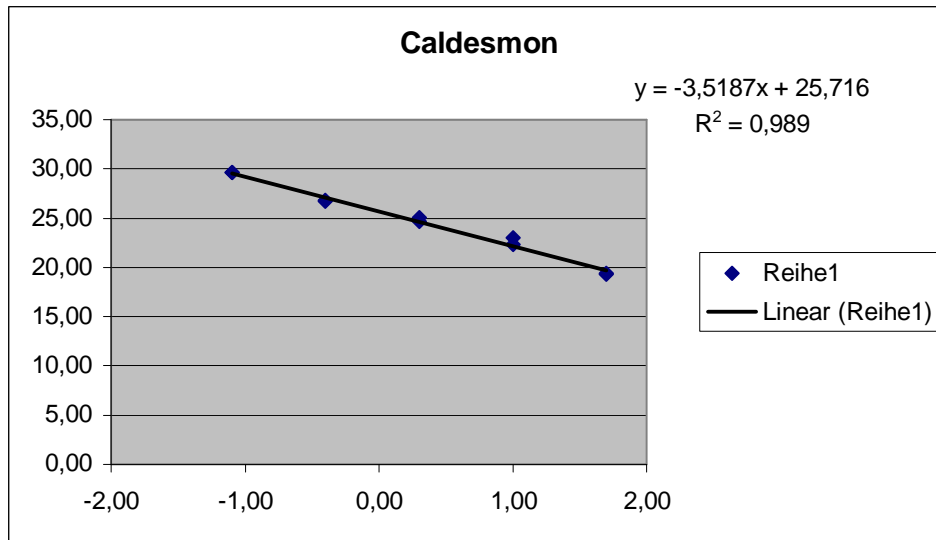
Probe: (TCC AGG TAG CTC ATC CCC TTG GCA AT)

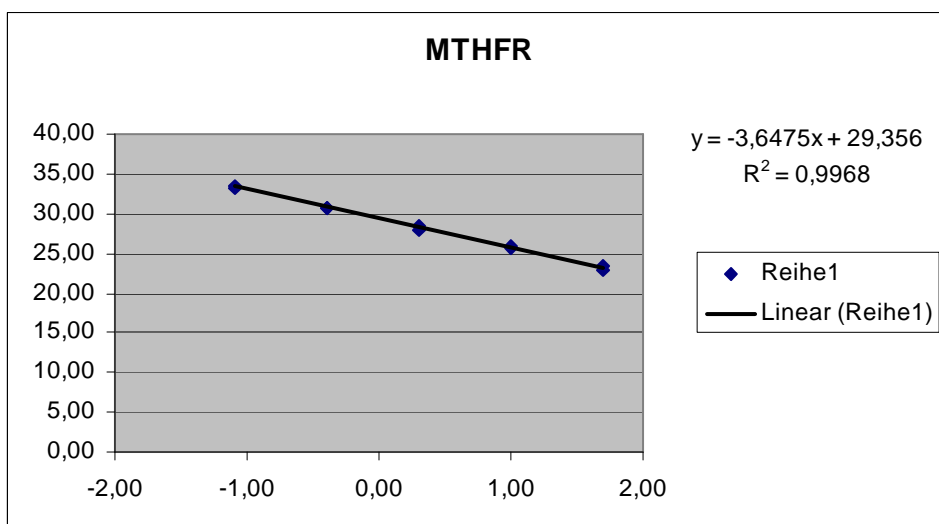
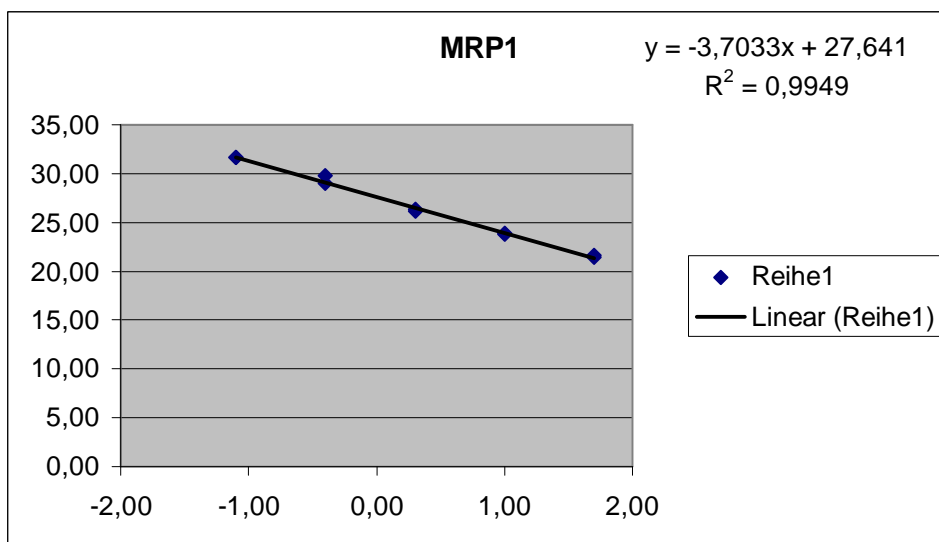
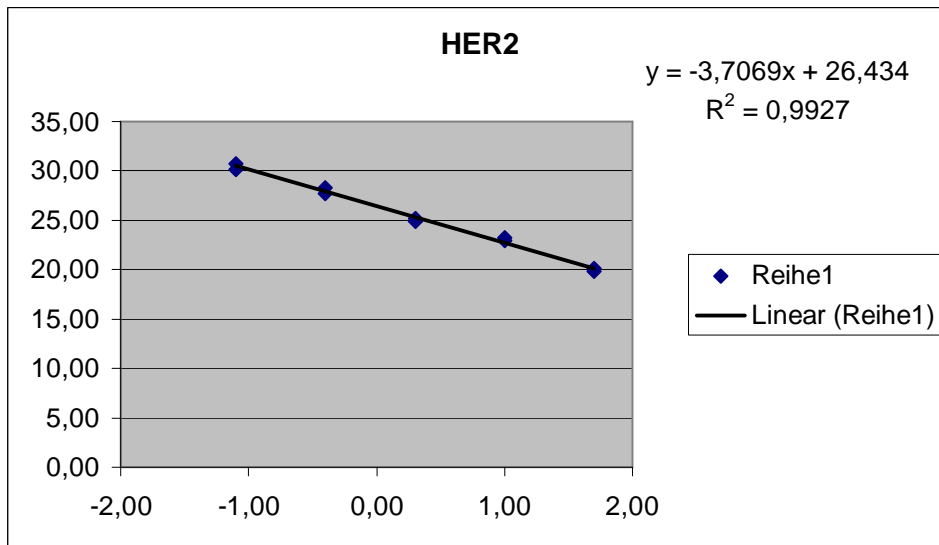
GAPDH: FP: GAPDH-FP548F (CGT GGA AGG ACT CAT GAC CA)

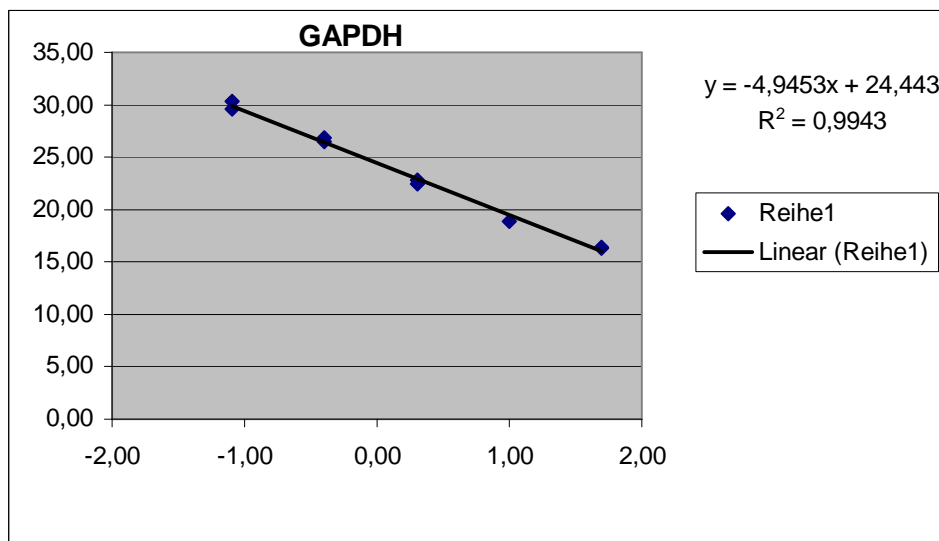
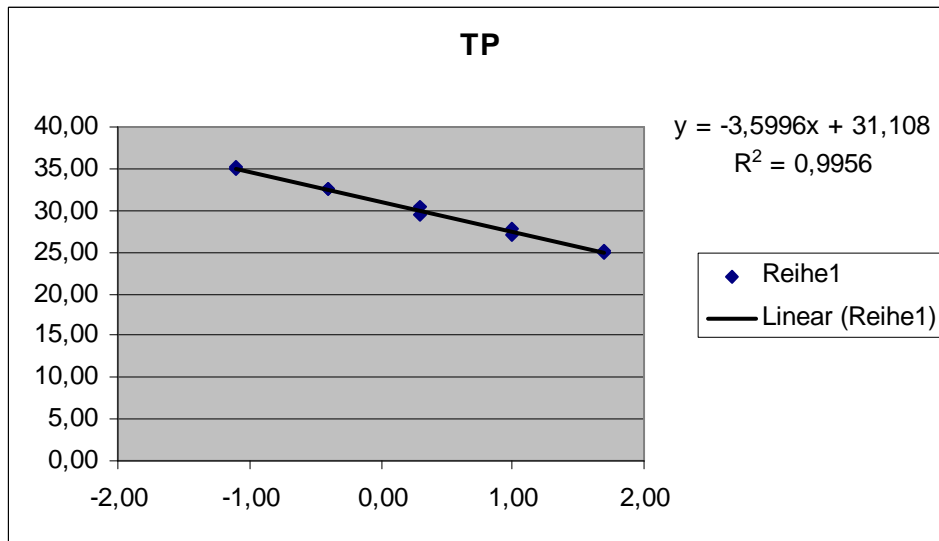
RP: GAPDH-RP635R (GCC ATC ACG CCA CAG TTTC)

Probe: (CAG AAG ACT GTG GAT GGC CCC TCC)

7.3 Standardkurven der 7 Gene und des Haushaltsgens GAPDH







7.4 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Philipp Sebastian Ewald
Geburtsdatum: 11.07.1979
Geburtsort: Geesthacht
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Religionszugehörigkeit: Evang.-lutherisch

Schulische Ausbildung

1985 - 1989 Grund- und Hauptschule Müssen
1989 - 1998 Europaschule Gymnasium Schwarzenbek
8/1995 - 1/1996 Schüleraustausch, Cleveland, Ohio, USA
6/1998 Allgemeine Hochschulreife (Abiturnote: 1,7)

Fremdsprachen: Englisch, Latein, Französisch

Universitäre Ausbildung

1999 - 2002 Studium der Medizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
9/2001 Ärztliche Vorprüfung (Physikumsnote: 2,0)
8/2002 1. Staatsexamen (Note: 2,0)
10/2002- 2005 Studium der Medizin an der Universität Hamburg (UKE)
9/2004 2. Staatsexamen (Note: 2,0)
11/2005 3. Staatsexamen (Note: 1,0); Gesamtnote: 1,6
12/2005 Approbation als Arzt

Praktisches Jahr

10/2004 - 2/2005 PJ-Tertial Innere Medizin
(Klinik für Radio-Onkologie, Kantonsspital St. Gallen, Schweiz)

2/2005 - 6/2005 PJ-Tertial Chirurgie (AK Altona, Hamburg)

6/2005 - 9/2005 PJ-Wahltertial Anästhesie (Universitätsklinikum Eppendorf)

Weiterbildung

12/2005 - aktuell Assistenzarzt für Innere Medizin (St. Adolf-Stift, Reinbek)
2/2009 Fachkunde Rettungsmedizin

Sonstiges

8/1998 - 8/1999 Zivildienst, Septische Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
(BG Unfallkrankenhaus Hamburg)
2000 - 2005 Studentische Aushilfskraft im Krankenpflagedienst
(BG Unfallkrankenhaus Hamburg)
2000/2001 Studentische Aushilfskraft im Molekularbiologischen Labor
(Gemeinschaftspraxis Dr. Kramer und Kollegen, Geesthacht)

8. DANKSAGUNG

Herrn Univ. Prof. Dr. med. H. Höfler gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung in allen Arbeitsphasen des experimentellen Teils als auch bei der Zusammenstellung und Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit sowie für die Nutzung des Labors, der technischen Gerätschaften und der zu untersuchenden Paraffinblöcke.

Frau Dr. med. K. Specht danke ich ganz herzlich für die Einführung in die Thematik und in die Grundlagen der Laborarbeit sowie für ihre hilfsbereite Art und den kompetenten Beistand während der gesamten praktischen Durchführung der Arbeit.

Bei Frau Dipl. Math. Raymonde Busch vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie (IMSE) des Klinikum Rechts der Isar (Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Neiss) möchte ich mich ausdrücklich für die tatkräftige Unterstützung bei der Ausführung des statistischen Teils der Arbeit bedanken.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Frau Melitta Winkler für das Heranführen an die praktische Laborarbeit und die tatkräftige Unterstützung in sämtlichen praktischen Arbeitsschritten bedanken.

Zuletzt und ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. R. Langer, der mir durch persönlichen Einsatz die Durchführung der vorliegenden Arbeit unter den besten Rahmenbedingungen erst ermöglicht hat und für die hervorragende Betreuung während aller Arbeitsphasen sowie für die Gastfreundschaft und über die fortwährende Freundschaft.