

**Molekulargenetische Untersuchung von
Verlaufskontrollbiopsien beim
Barrett-Ösophagus: Einfluss einer nicht
standardisierten Probenentnahme auf
die molekulare Analytik**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Christoph Sebastian Saure
aus Hagen

Gießen 2008

Aus dem Institut für Pathologie und Zytologie
Überregionale Gemeinschaftspraxis Wetzlar

Leiter: Priv.-Doz. Dr. med. J. U. Alles

Gutachter: PD Dr. med. J. U. Alles

Gutachter: Prof. Dr. med. P. Hardt

Tag der Disputation: 27.04.2009

MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	6
1.1 DER BARRETT-ÖSOPHAGUS	6
1.1.1 Historisches zum Barrett-Ösophagus	6
1.1.2 Definition des Barrett-Ösophagus	7
1.1.3 Pathogenese des Barrett-Ösophagus	8
1.1.4 Pathologie des Barrett-Ösophagus	9
1.1.5 Klinik des Barrett-Ösophagus	14
1.1.6 Diagnostik des Barrett-Ösophagus	14
1.1.7 Therapie des Barrett-Ösophagus	15
1.1.8 Prognose des Barrett-Ösophagus	16
1.1.9 Das Barrettkarzinom	18
1.2 GENETISCHE GRUNDLAGEN DER KREBSENTSTEHUNG	22
1.2.1 Zellzyklus	24
1.2.2 Tumorsuppressorgene	26
1.2.2.1 Rb	29
1.2.2.2 p16	29
1.2.2.3 APC	30
1.2.2.4 p53	30
1.2.2.5 DPC4	30
1.2.2.6 DCC	31
2. ZIEL DIESER ARBEIT	32
3. MATERIAL UND METHODEN	32
3.1 MATERIAL	32
3.2 METHODEN	33
3.2.1 LASER-MIKRODISSEKTION	33
3.2.1.1 Vorbereitungen der Präparate für die Mikrodisektion	33

3.2.1.2	Durchführung der Laser-Mikrodissektion	33
3.2.2	DNA-Isolation	36
3.2.3	PCR	37
3.2.3.1	PEP-PCR	41
3.2.3.2	MSI-PCR	42
3.2.4	Gelelektrophorese	44
3.2.4.1	Polyacrylamidgel	44
3.2.4.2	Silbergel	45
4.	ERGEBNISSE	49
5.	DISKUSSION	57
6.	ZUSAMMENFASSUNG	66
7.	LITERATURVERZEICHNIS	68
8.	ANHANG	82
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	82
8.2	VERÖFFENTLICHUNGSVERZEICHNIS	83
8.3	DANKSAGUNG	83
8.4	ABSTRACT	84

1. EINLEITUNG

1.1 DER BARRETT-ÖSOPHAGUS

1.1.1 HISTORISCHES ZUM BARRETT-ÖSOPHAGUS

Der Barrett-Ösophagus hat seinen Namen von dem britischen Chirurgen Norman Barrett, der 1950 die Veränderungen als erster beschrieb. In der Veröffentlichung ‚Chronic peptic ulcer of the oesophagus and oesophagitis‘ untersuchte er Sektionspräparate von Patienten, die an einer Ulkusperforation oder Ulkusblutung gestorben waren. Zunächst war er der Ansicht, dass die von Zylinderepithel des Magens umgebenen Ulzera der Speiseröhre durch hochgezogene Magenanteile nur scheinbar im Ösophagus lokalisiert waren. So nannte er diese Veränderung auch zunächst ‚Endobrachyösophagus‘ unter der Vermutung, dass die Verlagerung von Magenanteilen in das Mediastinum eine Ulkusbildung fördert (Barrett NR, 1950).

In einer folgenden Veröffentlichung 1957 unter dem Namen ‚The lower esophagus lined by columnar epithelium‘ hatte Barrett inzwischen festgestellt, dass das untersuchte Zylinderepithel vom gastro-ösophagealen Übergang in einem kontinuierlichen Strang nach oral zieht. In dieser Arbeit führte er das Auftreten des Zylinderepithels nicht mehr auf eine Verlagerung des Magens zurück sondern auf einen fehlerhaften Prozess in der Embryogenese des Ösophagus (Barrett NR, 1957).

Cohen et al. konnten 1963 in ihrer Arbeit bestätigen, dass das bis ins Mediastinum reichende Zylinderepithel originär aus dem Ösophagus stammt und nicht aus dem Magen. Den Beweis führten sie durch den Nachweis einer kontinuierlichen Peristaltik ohne Unterbrechung am Übergang von Plattenepithel zum Zylinderepithel im distalen Ösophagus (Cohen et al. 1963).

Den Zusammenhang zwischen dem Barrett-Ösophagus und dem Adenokarzinom der Speiseröhre beschrieben erstmals Naef und Savary 1972. Sie werteten 4950 endoskopische Untersuchungen des Ösophagus aus, die im Zeitraum von 1963 bis 1971 in den Spitälern von Yverdon und Lausanne in der Schweiz durchgeführt wurden. In ihrer Untersuchung zeigten 62 Patienten einen mit Zylinderepithel ausgekleideten distalen Ösophagus. Davon wiesen 57 Patienten eine Ösophagitis und 59 eine Hiatushernie auf. Ein Adenokarzinom fanden sie in 9 der 62 Fälle (Naef AP, Savary M, 1972).

Erste Hinweise zur Pathogenese des Barrett-Ösophagus lieferten Iacone et al. im Jahr 1983. Sie zeigten, dass ein erniedrigter Druck des unteren ösophagealen Sphinkters und eine

gesteigerte Säureexposition der distalen Speiseröhre bei Patienten sowohl mit einer Ösophagitis als auch mit einem Barrett-Ösophagus zu finden ist. Im Vergleich zum asymptomatischen Vergleichskollektiv zeigten alle diese Patienten einen geringeren Sphinkterdruck und eine erhöhte Säureexposition. Sie postulierten, dass sowohl die Refluxösophagitis als auch der Barrett-Ösophagus die Folge der gesteigerten Säureeinwirkung auf die von Plattenepithel ausgekleidete Ösophagismukosa sind. Eine mögliche Therapie wäre demzufolge das Wiederherstellen des physiologischen Sphinkterdruckes (Iascone C et al., 1983).

In einem Tierexperiment lieferten Bremner et al. schon 1970 einen Beweis für die Zylinderepithelmetaplasie als Reaktion auf eine erhöhte Säureexposition. Sie entfernten 35 Hunden operativ die Mukosa des distalen Ösophagus und teilten sie nach An- oder Abwesenheit eines gastroösophagealen Refluxes und einer gastralen Hypersekretion in 3 Gruppen ein. Im Rahmen der Kontrolle der Reepithelialisierung 425 Tage nach der Operation stellten sie fest, dass ohne Reflux wieder Plattenepithel entstand. Dagegen wiesen die Hunde mit Reflux oder gastraler Hypersekretion einen von Zylinderepithel ausgekleideten distalen Ösophagus auf (Bremner CG et al., 1970).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Norman Barrett 1950 den Grundstein für intensive Forschungsarbeit auf dem Gebiet des nach ihm benannten Barrett-Ösophagus gelegt hat. Der Begriff ‚Barrett-Ösophagus‘ hat sich mittlerweile als Synonym für die Metaplasie des Plattenepithels des distalen Ösophagus in spezialisiertes intestinales Epithel etabliert.

1.1.2 DEFINITION DES BARRETT-ÖSOPHAGUS

Laut der aktuellen Definition des American College of Gastroenterology handelt es sich bei dem Barrett-Ösophagus um eine intestinale Metaplasie der Ösophagusschleimhaut gleich welcher Länge, die (1) endoskopisch erkennbar ist und (2) durch Gewebeproben histologisch bestätigt werden kann. Ein Folge dieser Definition ist, dass der Pathologe allein nicht mehr die Diagnose des Barrett-Ösophagus stellen kann, wenn keine makroskopischen Schleimhautveränderungen vorliegen (Wang KK et al., 2008).

In einem relativ aktuellen Review über Diagnose und Management des Barrett-Ösophagus sind Sharma et al. (2004) übereingekommen, dass multiple und systematische Biopsien durchgeführt werden müssen, um die Diagnose des Barrett-Ösophagus zu etablieren (Sharma P et al., 2004).

Der Barrett-Ösophagus weist oberhalb der Angina diaphragmatica statt Plattenepithel ein gastrales und/oder intestinales Zylinderepithel auf. Pathogenetisch liegt ihm eine Refluxösophagitis zugrunde, die eine Zerstörung des ursprünglichen ösophagealen Plattenepithels zur Folge hat. Da die „Barrett-Metaplasie“ einen Risikofaktor für die Entwicklung eines Adenokarzinoms, des Barrettkarzinoms, darstellt, ist sie häufig Gegenstand der Forschung.

Die gastro-ösophageale Refluxerkrankung (GERD = gastro-esophageal-reflux-disease) gehört zu den häufigsten Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes. Epidemiologische Studien zeigen, dass bis zu 15% der Bevölkerung mindestens einmal pro Woche und etwa 7 % täglich an Sodbrennen leiden (Goyal RK, 2003).

Das Vorliegen einer intestinalen Metaplasie bei Patienten mit symptomatischem Reflux wird auf vier bis zehn Prozent geschätzt. Der Barrett-Ösophagus zeigt eine deutliche Prädominanz für weiße Männer. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 50 Jahren. Insgesamt nimmt die Prävalenz mit steigendem Alter zu (Iacobuzio-Donahue CA et al., 2005).

1.1.3 PATHOGENESE DES BARRETT-ÖSOPHAGUS

Zur gastroösophagealen Refluxerkrankung kommt es durch einen insuffizienten Verschluss am gastroösophagealen Übergang und damit zu einem Reflux von Magensäure und anderen Mageninhalten in den Ösophagus. In diesem Fall können die Schutzmechanismen der Mukosa den durch Magensäure, Pepsin und Gallenflüssigkeit hervorgerufenen Schleimhautschäden nicht mehr ausreichend entgegenwirken. Es kommt zu einer Metaplasie, einer Umwandlung von ausdifferenziertem Gewebe eines bestimmten Typs in ein differenziertes Gewebe eines anderen Typs.

Die Pathogenese der Metaplasie im Barrett-Ösophagus ist nicht vollständig geklärt. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass das Plattenepithel des Ösophagus sich direkt in ein Zylinderepithel umwandelt. Wesentlich wahrscheinlicher ist die Theorie, dass chronische Schädigungen des Epithels durch Säure- oder Gallereflux gesetzt werden und das Zylinderepithel sich im Rahmen der Reepithelialisierung bildet. Möglicherweise führt die saure Komponente des Refluxes zur initialen Erosion, und die alkalische Komponente (Gallenflüssigkeit) startet den reparativen Prozess. Als Ursprung gelten hier die sich umwandelnden pluripotenten Stammzellen der geschädigten Mukosa (Iacobuzio-Donahue CA et al., 2005).

Die chronische Schädigung eines Wechseltgewebes führt zur Umwandlung von Reservezellen mit „hoher prospektiver Potenz“ in ein physikalisch-chemisch resistenteres Gewebe, wobei es aber einen Teil seiner ursprünglichen Funktion einbüßt. In diesem Fall stellt die Metaplasie eine Regenerationssonderform dar, die nicht auf einer Defektheilung beruht, sondern in einem Defektzustand endet.

Als Antirefluxmechanismus spielen der untere Ösophagussphinkter (UÖS), die Zwerchfellschenkel und die anatomische Lage des gastroösophagealen Überganges unterhalb des Zwerchfells eine Rolle. Neben der insuffizienten Barriere tragen folgende Faktoren zum Rückfluß bei (Odze RD et al., 2003):

- Erhöhte Magenvolumina (nach Mahlzeiten, bei pylorischer Obstruktion, gastralere Stase (verzögerte Magenentleerung), Hypersekretion von Magensäure)
- Räumliche Nähe des Mageninhaltes zum gastroösophagealen Übergang (Liegen, Bücken, Vorliegen einer Hiatushernie..)
- Erhöhter intragastralere Druck (Schwangerschaft, Adipositas, Aszites)

1.1.2 PATHOLOGIE DES BARRETT-ÖSOPHAGUS

Während endoskopischer Inspektion erscheint die Barrettschleimhaut makroskopisch als eine zungen- oder fleckförmige rötlich-lachsfarbene Schleimhautveränderung, die vom gastroösophagealen Übergang ausgeht. Erstreckt sich eine solche ‚Zunge‘ über eine Länge von weniger als 3 cm, spricht man von einem ‚short-segment-Barrett‘. Finden sich Veränderungen auf einer Länge von 3 cm oder mehr handelt es sich um ‚long-segment-Barrett‘. Diese Unterscheidung ist relevant, da das Karzinomrisiko des ‚long-segment-Barrett‘ gegenüber dem ‚short-segment-Barrett‘ deutlich erhöht ist (Iacobuzio-Donahue CA et al., 2005).

Mikroskopisch zeigt sich eine Zusammensetzung des metaplastischen Areals aus verschiedenen Epitheltypen, darunter Becherzellen und hochprismatische Zellen, die identisch mit der gastrointestinalen Metaplasie Typ II und III sind. Selten findet sich auch eine komplette intestinale Metaplasie mit sowohl sekretorischen als auch absorptiven Zellen (Typ-I-Metaplasie) (Werner et al., 2006).

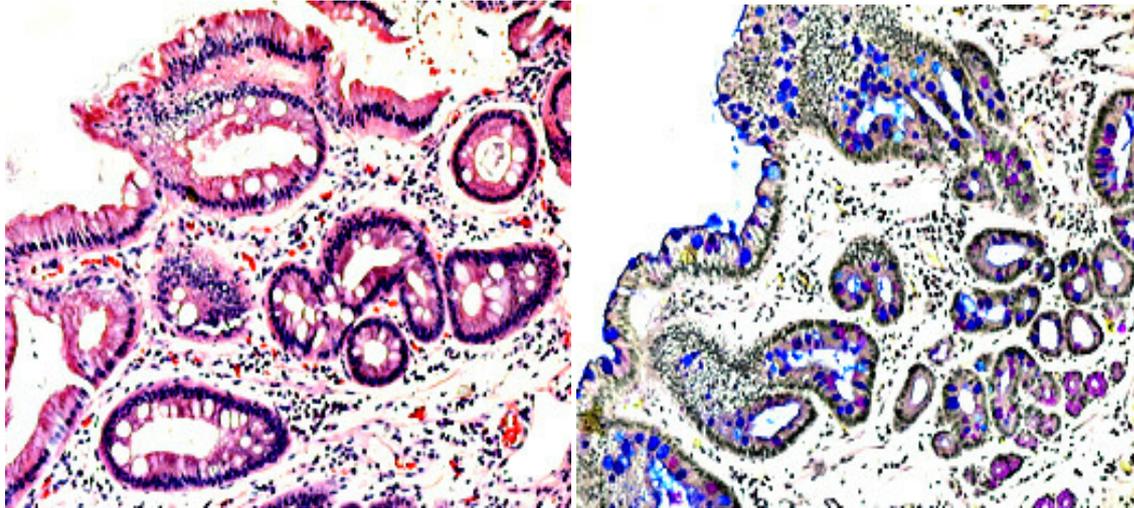


Abb.1 und 2: Barrett-Mucosa, HE, 100fach und Barrett-Epithel, AB-PAS, 75fach

Der Prozess der Karzinogenese in der Barrett-Mucosa läuft mehrstufig ab. In der metaplastisch veränderten Schleimhaut können Dysplasien entstehen. Diese Dysplasien werden als maligne Vorläuferläsionen bezeichnet. In der Nomenklatur verwendet man zurzeit die Begriffe ‚low-grade-IEN‘ (IntraEpitheliale Neoplasie) und ‚high-grade-IEN‘. Zuvor sprach man lange Zeit von den low- und high-grade-Dysplasien.

Für den klinischen Gebrauch unterscheiden die Pathologen zwischen 5 Gruppen (Iacobuzio-Donahue CA et al., 2005):

- Barrett-Ösophagus ohne IEN
- Barrett-Ösophagus ohne sichere Zeichen einer IEN (indefinite for Dysplasia)
- Barrett-Ösophagus mit low-grade-IEN
- Barrett-Ösophagus mit high-grade-IEN
- Adenokarzinom

Barrett-Ösophagus ohne sichere Zeichen einer IEN wurde als mögliche Einteilung neu eingeführt, um solche Fälle einzuordnen, die in den tieferen Anteilen der Mukosa fortgeschrittene zytologische Veränderungen zeigen, die auf eine mögliche low-grade-IEN verdächtig sind, sich zur Oberfläche hin jedoch wieder normalisieren.

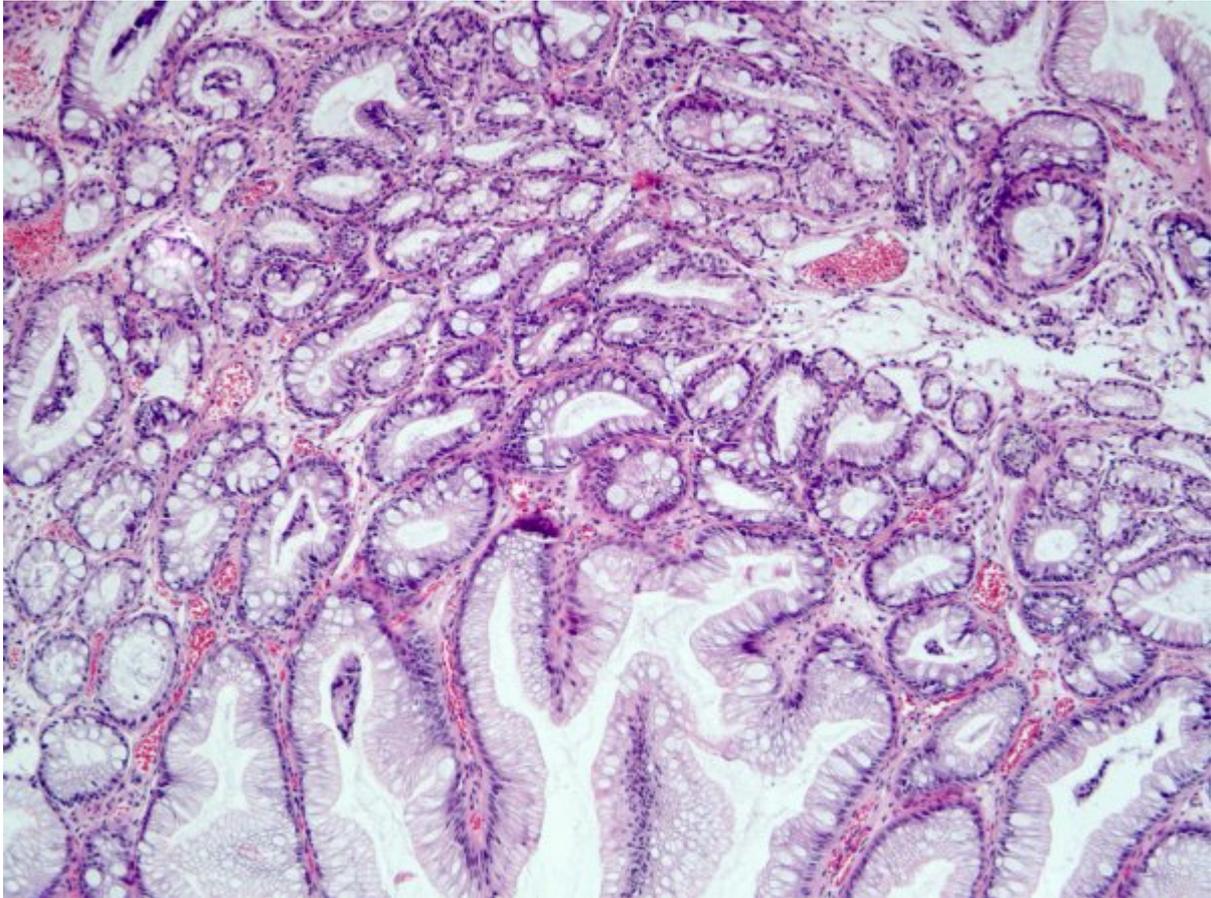


Abb.3: Barrett-Mucosa ohne sichere Zeichen einer IEN, HE, 10fach

Die low-grade-IEN ist durch eine weitgehend erhaltene Kryptenarchitektur gekennzeichnet, die leichte Distorsionen aufweisen kann. Das Epithel scheint überwiegend basal der Krypten mehrreihig zu sein durch die unterschiedlichen Lagen der Zellkerne. Die Zellkerne sind vergrößert und hyperchromatisch. Die Zellen liegen dichter als normal beieinander. Mitosen sind in allen Drüsenabschnitten zu beobachten. Die Schleimbildung ist vermindert und kann sogar fehlen.

Bei der Abgrenzung der low-grade-IEN von Kernanomalien bei Entzündungen und Ulzerationen ist es wichtig, dass die echte Dysplasie hauptsächlich die oberen Drüsenabschnitte und die Schleimhautoberfläche betrifft. Nichtneoplastische, reaktive Epithelveränderungen bleiben auf die unteren Drüsenabschnitte beschränkt (Levin et al., 1993).

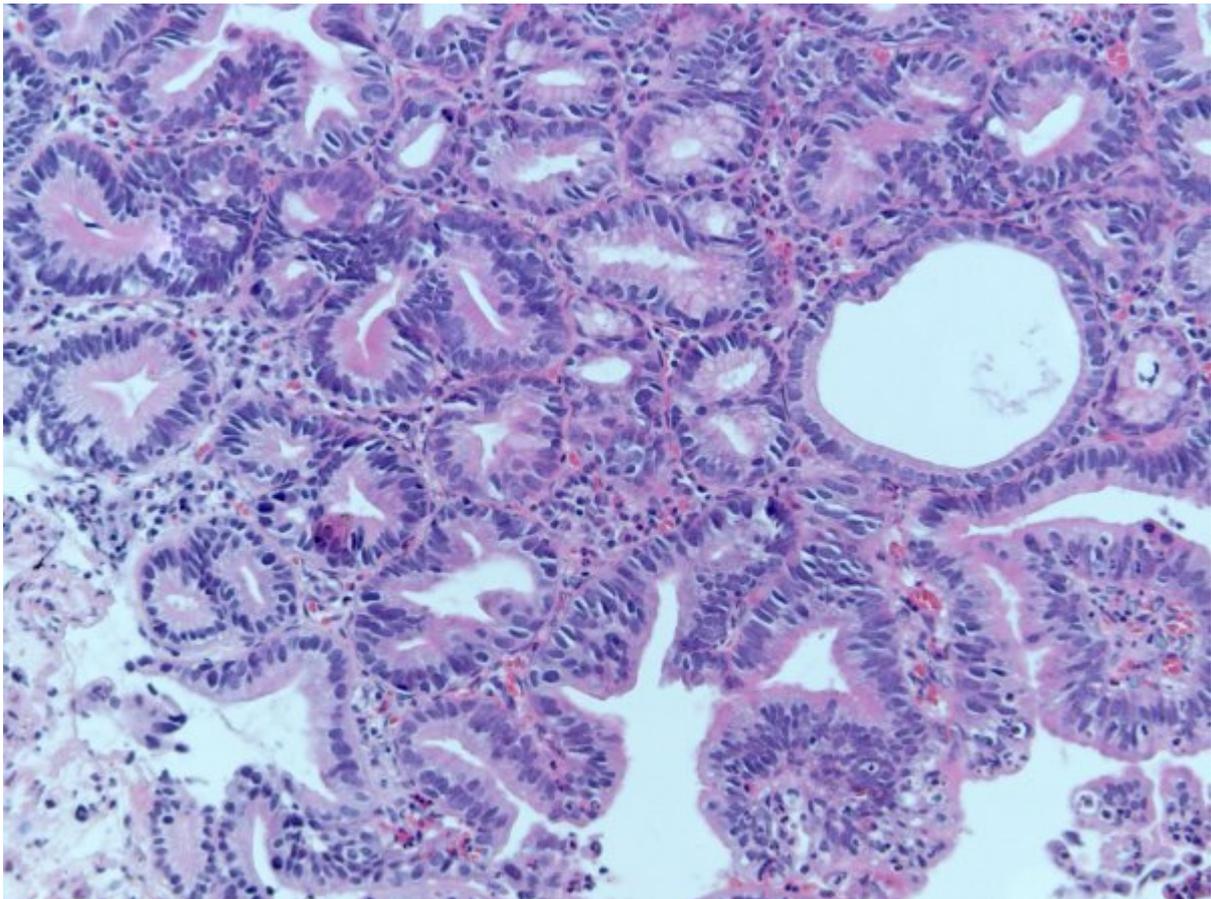


Abb.4: Barrett-Epithel mit low-grade-IEN, HE, 10fach

Bei der high-grade-IEN ist die Kryptenarchitektur stärker gestört als bei der low-grade-IEN. Hier finden sich stärkere Distorsionen, Verzweigungen und Knospenbildungen von Drüsen mit intraglandulären Brückenbildungen von Epithelien, kibriformen Strukturen und eng beieinander liegenden Drüsen. Benachbarte Zellkerne liegen nicht auf gleicher Höhe, so dass der Eindruck einer Mehrreihigkeit entsteht. Dieser Sachverhalt ist ebenso im Übergang zum Oberflächenepithel zu erkennen d.h. nicht nur basal der Krypten. Der Verlust der Kernpolarität ist ein weiteres Kriterium für die Diagnose einer high-grade-IEN. Die Kerne sind noch größer als bei der low-grade-IEN und weisen eine noch höhere Variabilität in Form und Anfärbbarkeit auf. Außer der Schleimdepletion der Becherzellen finden sich so genannte dystrophische Becherzellen mit retronukleären Schleimvakuolen. High-Grade-Dysplasien mit kibriformen Strukturen können manchmal nur sehr schwer von einem Karzinom abgegrenzt werden, weil high-grade-IEN ebenfalls atypische Mitosen aufweisen.

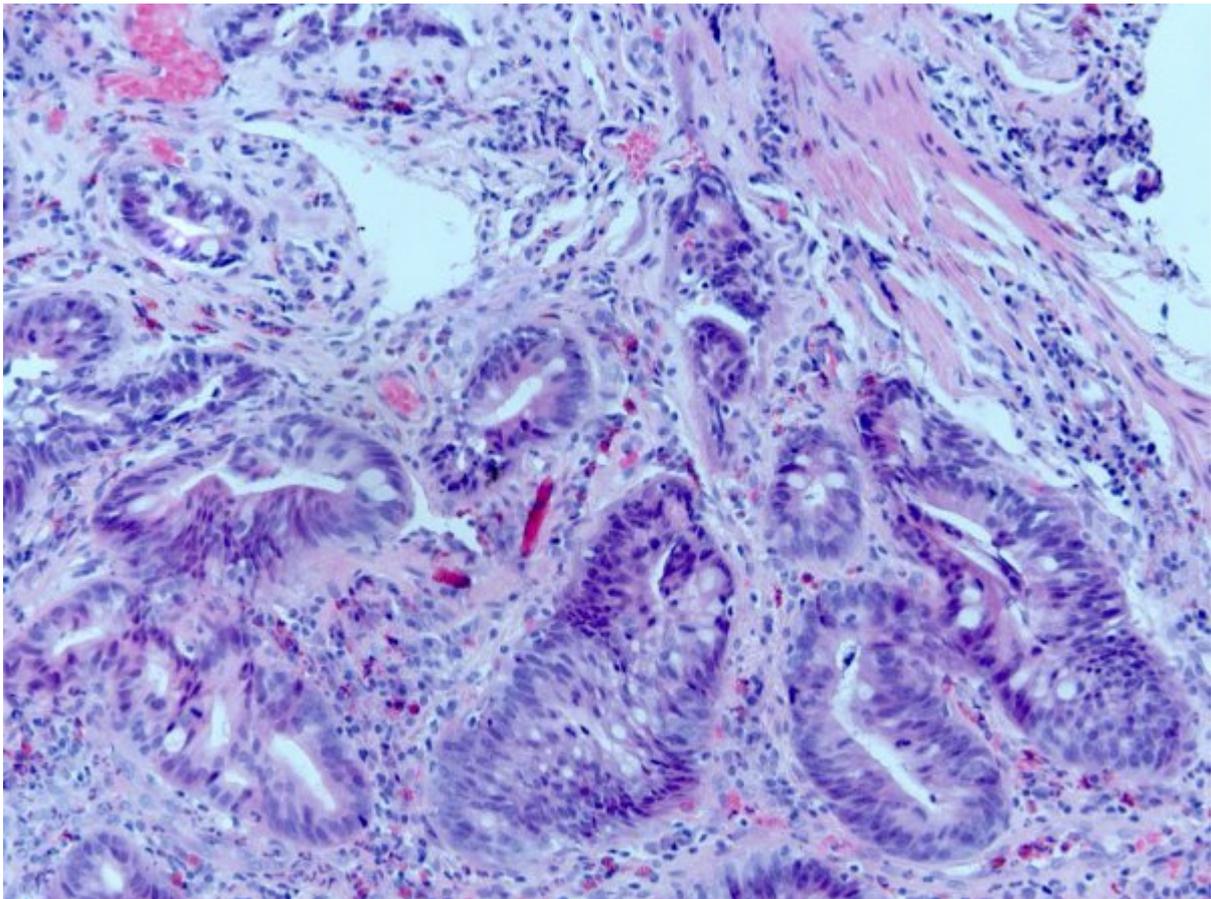


Abb. 5: Barrett-Epithel mit high-grade-IEN, HE, 10fach

Ein gemeinsames Vorkommen des Barrett-Syndroms mit high-grade-IEN kann zur Entwicklung von Adenomen führen, die aus dysplastischen Epithelien bestehen. Obwohl der Grad der Dysplasie flusszytometrisch nicht immer mit dem Grad der Aneuploidie parallel einhergehen soll, wird doch eine zunehmende Aneuploidie des Barrett-Epithels festgestellt. Dies ist ein Ausdruck für eine neoplastische Transformation, mit der ein erhöhtes Karzinomrisiko einhergeht. Besonders schwere dysplastische Veränderungen sind oft in der Nachbarschaft eines Adenokarzinoms nachzuweisen. Aufgrund dessen wird von vielen Ärzten schon eine high-grade-IEN als Indikation für eine Ösophagusresektion angesehen (Buttar et al., 2001).

1.1.3 KLINIK DES BARRETT-ÖSOPHAGUS

Der Barrett-Ösophagus an sich führt zu keinerlei Beschwerden des Patienten abgesehen von den Symptomen, die durch den assoziierten chronischen Säurereflux ausgelöst werden. Es wird sogar berichtet, dass Patienten mit nachgewiesener Metaplasie einen Rückgang der klinischen Symptomatik beschreiben (Iacobuzio-Donahue CA et al., 2005).

Sodbrennen ist ein charakteristisches Symptom der Refluxösophagitis. Es kann mit Regurgitationen oder dem Gefühl, eine warme Flüssigkeit steige im Rachen auf, assoziiert sein. Es ist heftiger nach dem Essen und wird durch Bücken, körperliche Anstrengung oder liegende Position verstärkt. Bei einigen Patienten kommt es zu Angina pectoris-ähnlichen ‚atypischen‘ Thoraxschmerzen.

Bei etwa 10% der Patienten mit unbehandelter GERD bilden sich peptische Strikturen als Folge einer das ösophageale Lumen einengenden Fibrose. Hierdurch kommt es zu Schluckbeschwerden und Regurgitationen. Eine erosive Ösophagitis kann zu Blutungen führen.

Steigt das zurückgeflossene Material bis in den zervikalen Ösophagus auf und überwindet es den oberen Ösophagussphinkter (OÖS), kann es durch Übertritt in Larynx, Pharynx und Trachea zu chronischem Husten, Bronchokonstriktion, Pharyngitis, Laryngitis und Bronchitis führen (Goyal RK, 2003).

1.1.4 DIAGNOSTIK DES BARRETT-ÖSOPHAGUS

Bei der erosiven Ösophagitis kommt es zu endoskopisch sichtbaren, leicht verletzbaren Schleimhautläsionen, Rötungen, Blutungen, oberflächlichen linearen Ulzerationen und Exsudationen. Das endoskopische Bild kann jedoch auch unauffällig sein. In diesem Fall kann der Bernsteintest zum Nachweis einer Refluxösophagitis bei unauffälliger Ösophagoskopie trotz anamnestisch ausgeprägter Refluxsymptomatik durchgeführt werden. Hierfür werden zum einen 0,1 n Salzsäure und zum anderen physiologische Kochsalzlösung in die Speiseröhre appliziert. Bei Patienten mit einer Refluxösophagitis wird durch die Salzsäure Sodbrennen ausgelöst nicht aber durch Kochsalzlösung. Bei Gesunden führt auch die Salzsäurelösung nicht zu Beschwerden.

Der sensitivste Test für die Diagnose GERD bei Patienten mit symptomatischem Reflux ohne endoskopischen Nachweis einer Ösophagitis ist daher die ambulante 24h-pH-Metrie. Bei

dieser kontinuierlichen pH-Messung ist ein pH-Wert kleiner 4 oberhalb des Ösophagusschließmuskels beweisend für einen pathologischen Reflux.

Methoden zur optischen Erkennung (z.B. Chromoendoskopie) von Dysplasien während der endoskopischen Untersuchung werden an größeren Zentren bereits eingesetzt und stellen in den Händen eines in dieser Methode erfahrenen Diagnostikers ein sehr gutes Verfahren zur makroskopischen Darstellung kleinerer Barrettneester dar (Goyal RK, 2003).

1.1.5 THERAPIE DES BARRETT-ÖSOPHAGUS

Bei Patienten mit anhaltenden GERD-Symptomen wird eine einmalige Ösophagoskopie im Alter von 50 Jahren empfohlen.

Da eine einmal entstandene Metaplasie sich auch unter Therapie nicht wieder zurückbildet, sollte eine Refluxösophagitis konsequent medikamentös oder eventuell mit einer Antirefluxchirurgie behandelt werden, um die Entwicklung eines Barrett-Ösophagus zu vermeiden.

Für die säuresuppressive Therapie stehen zahlreiche Protonenpumpeninhibitoren zur Verfügung, Mittel der zweiten Wahl sind H-Blocker und Antacida. Eine probatorische Therapie mit 2x40 mg/d Omeprazol für eine Woche kann zudem die Diagnose GERD bei gutem Ansprechen stark stützen.

Therapie der Wahl bei nachgewiesener high-grade-IEN ist die Resektion des Barrett-Segments. Photodynamische Laserbehandlung, thermokoagulative Mukosaablation und endoskopische Mukosaresektion stehen als alternative Verfahren für Patienten zur Verfügung, die aufgrund hohen Alters, reduzierten Allgemeinzustandes oder Komorbidität nicht operiert werden können.

Bei der Antirefluxchirurgie werden Teile des Magens um den Ösophagus geschlungen (Fundoplicatio), was eine Erhöhung des Druckes im UÖS bewirkt. Sie sollte in Erwägung gezogen werden bei komplizierter oder eine auf medikamentöse Therapie nicht ausreichend ansprechende Refluxösophagitis, sowie wenn der Patient eine Langzeittherapie mit Medikamenten ablehnt. Die laparoskopisch durchgeführte Fundoplicatio ist dabei das Vorgehen der Wahl. Ideale Patienten hierfür sind Patienten, bei denen in der Manometrie ein dauerhaft zu niedriger Druck im UÖS bei regelrechter Peristaltik im Corpus ösophagei nachweisbar ist (Goyal RK, 2003).

1.1.6 PROGNOSE DES BARRETT-ÖSOPHAGUS

Das Karzinomrisiko der Patienten mit einem Barrett-Ösophagus ist gegenüber der Normalbevölkerung ca. 30fach erhöht. Die Krebsentwicklungsrate beträgt 1 pro 200 Patientenjahre. Das Risiko für die Entwicklung eines Adenokarzinoms ist auch von der Länge des betroffenen Schleimhautabschnittes abhängig. So haben die Betroffenen bei Vorliegen eines ‚long-segment‘-Barrett-Ösophagus im Vergleich zur Normalbevölkerung sogar ein 30 bis 125fach höheres Risiko, ein Ösophaguskarzinom zu entwickeln (Iacobuzio-Donahue CA et al., 2005).

Die Notwendigkeit und die erforderliche Häufigkeit von Kontrollendoskopien bei nachgewiesenem Barrett-Ösophagus sind umstritten. Das Karzinomrisiko scheint für einen ‚short-segment‘-Barrett-Ösophagus eher relativ gering zu sein.

Laut der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) sollte bei Patienten ohne IEN in der Barrett-Mukosa und einem ‚long-segment‘-Barrett-Ösophagus nach 2 negativen Kontrollbiopsien das Überwachungsintervall auf 3 Jahre gesetzt werden. Bei Patienten mit einem ‚short-segment‘-Barrett-Ösophagus dagegen wird empfohlen, das Intervall nach 2 negativen Kontrollendoskopien auf 4 Jahre zu setzen (Koop H et al., 2005).

Bei Nachweis von Dysplasien muss, unabhängig von der Länge der Metaplasie, häufiger kontrolliert werden (Iacobuzio-Donahue CA et al., 2005). Hier empfiehlt die Leitlinie der DGVS zunächst zweimal eine Kontrollendoskopie im Abstand von 6 Monaten, um sicherzustellen, dass keine high-grade-IEN übersehen wurde.

Wird hierbei eine low-grade-IEN in einer mukosalen Erhabenheit nachgewiesen, sollte eine endoskopische Resektion der Läsion angestrebt werden. Bei Vorliegen einer high-grade-IEN in einer sichtbaren Läsion sollte ebenfalls eine endoskopische Resektion durchgeführt werden. Bei einer high-grade-IEN ohne sichtbare Läsion empfiehlt die Leitlinie eine Photodynamische Therapie, alternativ die radikale Operation (Koop H et al., 2005).

Obwohl die high-grade-IEN sich im weiteren Verlauf sehr variabel zeigen, beträgt die Wahrscheinlichkeit, in den nächsten fünf Jahren ein Adenokarzinom zu entwickeln, ca. 30%. Aus diesem Grund werden die Patienten mit einer high-grade-IEN oftmals so behandelt, als ob bereits ein Karzinom vorliegt. Es wird ein intensives Überwachungsprogramm mit frühzeitiger Aufklärung des Patienten bezüglich seiner therapeutischen Optionen (z.B. Schleimhautablation, Ösophagusresektion) empfohlen (Koop H et al., 2005).

Einen Sonderfall stellen Patienten dar, die im Verlauf eines Überwachungsprogramms ihre Dysplasie ‚verloren‘ haben. In diesen Fällen wird das Überwachungsprogramm entsprechend der höchstgradigen Dysplasie, die je vorlag weitergeführt (Wang KK et al., 2008).

Versuche, durch endoskopische und zytologische Screeningmaßnahmen frühzeitig Karzinome bei Patienten mit Barrett-Ösophagus zu diagnostizieren, haben bislang zu keiner Verbesserung in der Prognose von Patienten geführt, die im Krankheitsverlauf ein Karzinom entwickeln. Allerdings sind diese Maßnahmen beim Nachweis von hochgradigen Epitheldysplasien effektiv. Trotzdem ist die Endoskopie indiziert bei Patienten mit anhaltender Refluxsymptomatik und bei Patienten mit wiederkehrender Dyspepsie trotz Therapie. Die Endoskopie ist auch indiziert bei lang bestehendem (>10 Jahre) häufigem Sodbrennen. In diesen Fällen besteht im Vergleich zu Patienten mit weniger als einem Jahr Refluxsymptomatik ein sechsfach höheres Risiko für die Entwicklung eines Barrett-Ösophagus. Patienten mit einem Barrett-Ösophagus gehören in ein Überwachungsprogramm, wo mit periodischen Gewebeentnahmen Dysplasien und Frühkarzinome ausgeschlossen werden (Goyal RK, 2003).

1.1.7 DAS BARRETTKARZINOM

Über dysplastische Zwischenformen kann das Barrett-Epithel in ein Adenokarzinom übergehen.

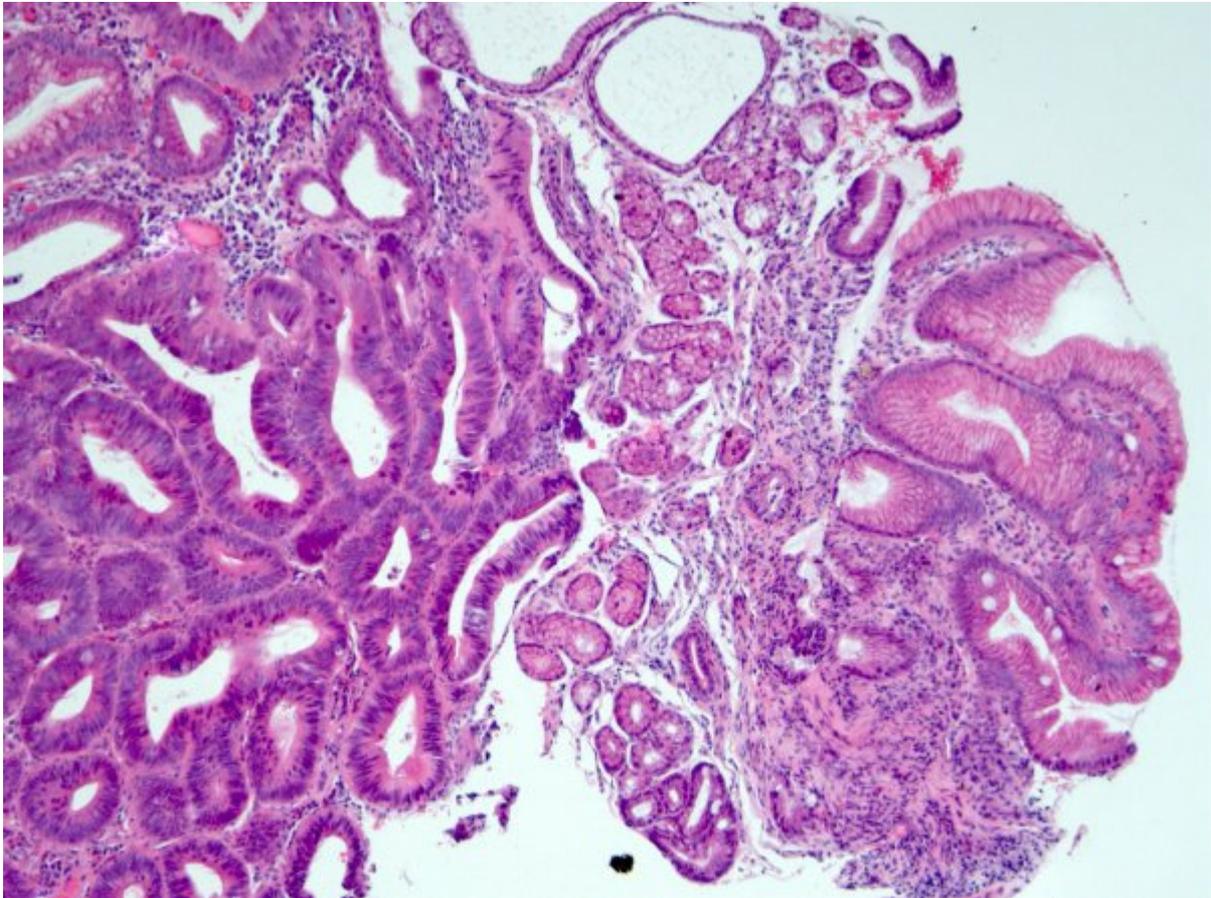


Abb.6: Barrettkarzinom des Ösophagus, HE, 10fach

Ösophaguskarzinome sind relativ seltene aber mit einer hohen Letalität verbundene Tumoren. Die Inzidenz des Ösophaguskarzinoms schwankt weltweit sehr. In Deutschland erkranken jährlich etwa 3000 Männer und 900 Frauen. Der Anteil an krebisbedingten Todesfällen liegt bei ca. 2% (Mayer RJ, 2003).

Aus bislang unbekanntem Gründen hat die Inzidenz der Plattenepithelkarzinome in den letzten 20 Jahren abgenommen, während die Rate der Adenokarzinome dramatisch zugenommen hat. Adenokarzinome des Ösophagus machen mittlerweile mehr als 50% der Ösophaguskarzinome aus (Odze RD et al., 2003).

Diagnostik: Routinemäßig können mit Hilfe von Röntgenkontrastaufnahmen Ösophagusläsionen identifiziert werden, die groß genug sind, um Beschwerden zu

verursachen. Ösophaguskarzinome verursachen charakteristischerweise raue, ulzerierende Schleimhautveränderungen mit tiefreichenden Infiltrationen. Kleinere, potenziell resektable Tumoren sind häufig trotz technisch adäquater Ösophagogramme nur schwer erkennbar. Daher ist die Ösophagoskopie Mittel der Wahl, da außerdem die Diagnose auch histopathologisch abgesichert werden kann. Die zytologische Untersuchung von Bürstensaumabstrichen des Tumors ergänzt häufig die Standardbiopsien und sollte routinemäßig durchgeführt werden. Eine mögliche Ausdehnung des Tumors in das Mediastinum und die paraaortalen Lymphknoten sollte mithilfe einer CT des Thorax und Abdomens sowie durch eine Endosonographie abgeklärt werden (Mayer RJ, 2003).

Pathologische TNM-Klassifikation (Werner et al., WHO Classification of Tumors) :

- T1 Tumorinfiltration bis in Submukosa
- T2 Tumorinfiltration bis in Muscularis propria
- T3 Tumorinfiltration über Muscularis propria hinaus
- T4 Tumorinfiltration in Nachbarstruktur

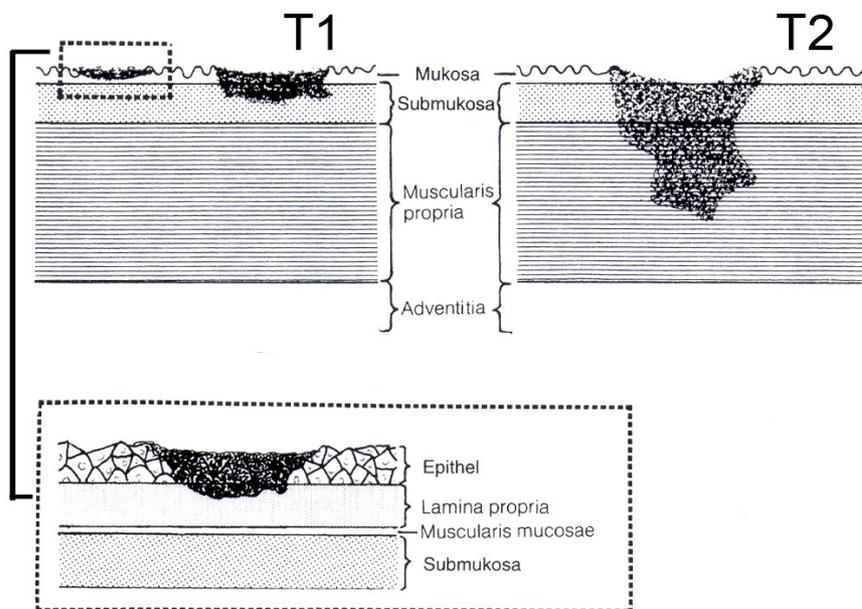


Abb.7: Schematische Darstellung Tumorstadium T1 und T2 (aus Wittekind C et al., ‚TNM-Atlas‘)

T3

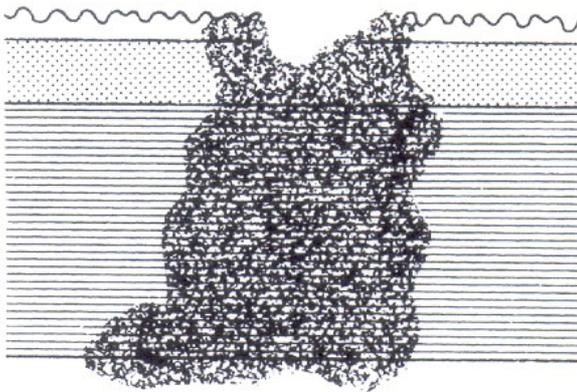


Abb.8: Schematische Darstellung Tumorstadium T3 (aus Wittekind C et al., 'TNM-Atlas')

T4

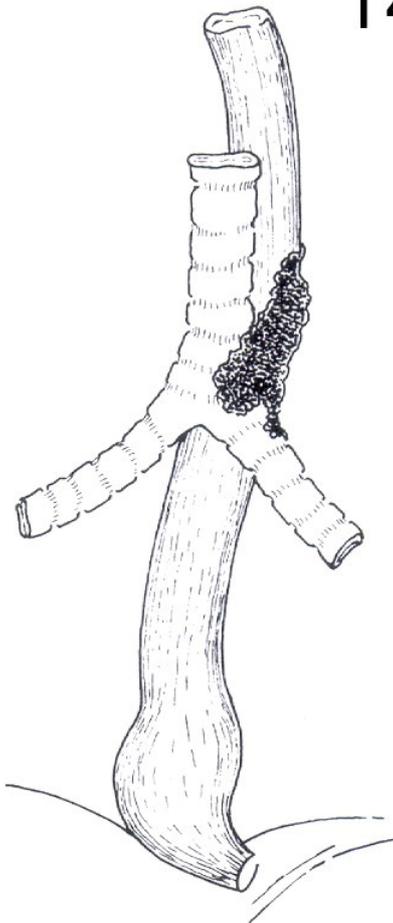


Abb.9: Schematische Darstellung Tumorstadium T4 (aus Wittekind C et al., 'TNM-Atlas')

Klinik des Barrettkarzinoms

Bei den meisten Patienten treten zunächst Dysphagie und ein rasch fortschreitender Gewichtsverlust auf. Da Schluckbeschwerden in der Regel erst auftreten, wenn 60% der Ösophaguszirkumferenz oder mehr durch den Tumor infiltriert sind, ist die Krankheit zu diesem Zeitpunkt meist unheilbar. Die Dysphagie kann mit Schmerzen in Brust und Rücken einhergehen. Begleitende Regurgitationen und Vomit sind möglich. Die Ausbreitung erfolgt am häufigsten in angrenzende Lymphknoten sowie in Lunge, Leber und Pleura. Bei fortschreitender Krankheit können ösophagotracheale Fisteln entstehen, die zu stärksten Beschwerden führen (Odze RD et al., 2003).

Therapie des Barrettkarzinoms

Aufgrund der ungünstigen Prognose konzentriert sich die Behandlung der Patienten häufig auf eine Kontrolle der Symptome. Eine vollständige Entfernung des Tumors ist nur in ca. 40% der Fälle möglich, wobei häufig Tumorzellen am Resektionsrand zurückbleiben. Derartige Ösophagusresektionen waren in der Vergangenheit mit einer postoperativen Letalität von etwa 10% durch Anastomoseninsuffizienzen, subphrenische Abszesse und respiratorische Komplikationen verbunden. Die Letalität konnte jedoch in spezialisierten Zentren auf weniger als 5% gesenkt werden. Außer der Ösophagektomie kann eine fotodynamische Therapie angewandt werden. Hier wird mit einem Laser die obere Epithelschicht abgetragen, dabei kommt es bei 80% der Patienten zu einer Rückbildung der Barrett-Mucosa in ein normales Plattenepithel (Overholt BF, 1999, Schütze K et al., 1997). Mittlerweile wird bei bestätigter Diagnose einer high-grade-IEN eine Mukosektomie empfohlen, die die Läsion bei oberflächlicher Abtragung der Schleimhaut mit Schonung der Lamina propria mucosae entfernt. Ein radikal verstümmelndes chirurgisches Vorgehen wird damit vermieden, da die Kontinenz und Funktion des Ösophagus erhalten bleibt (Schnell T et al., 2001). Daher sollte der Befund einer high-grade-IEN von einem Referenzpathologen bestätigt werden (Lewin KJ et al., 1995).

Die Durchführung einer präoperativen Chemotherapie oder Radiochemotherapie mit anschließender Ösophagusresektion scheint das Überleben der Patienten zu verlängern. Die Ergebnisse randomisierter Studien sind jedoch uneinheitlich. Eine präoperative oder postoperative alleinige Bestrahlung verbessert die Ergebnisse der Operation nicht. Ebenso ist eine postoperative adjuvante Chemotherapie nicht indiziert. Bei inoperablen Tumoren ist die

kombinierte Radiochemotherapie mit Cisplatin und 5-Fluorouracil einer alleinigen Bestrahlung signifikant überlegen und stellt die Therapie der Wahl dar. Mit einer Monochemotherapie bei fortgeschrittenen und metastasierten Tumoren sind Ansprechraten von 10 bis 20 % zu erreichen. Durch platinhaltige Kombinationstherapien lassen sich die Ergebnisse zwar mehr als verdoppeln, die Remissionsdauer ist jedoch meist nur sehr kurz und ein Einfluß auf das Überleben nicht belegt (Goyal RK, 2003).

Bei Patienten mit fortgeschrittenem inoperablem Ösophaguskarzinom ist die palliative Behandlung von Dysphagie, Unterernährung und eventuell vorhandenen Fisteln ein wichtiger Bestandteil der Therapie. Ansätze sind wiederholte endoskopische Dilatationen, die Anlage einer Gastrostomie oder Jejunostomie für Flüssigkeitszufuhr und Ernährung und die endoskopische Platzierung von Stents. Besonders aussichtsreich zur Behandlung stenosierender Tumoren ist die endoskopische Laserbehandlung.

Prognose des Barrettkarzinoms

Die Prognose ist ungünstig. Da der Ösophagus nicht über eine Adventitia verfügt, tritt eine Infiltration der umgebenden mediastinalen Strukturen bereits bei kleineren Tumorgößen auf. Eine lymphogene Aussaat maligner Zellen findet sich bereits bei bis zu 5 % der intramukosalen und bis zu 24 % aller submukosalen Karzinome, da die Schleimhaut des Ösophagus bis zur Lamina propria kräftig mit Lymphgefäßen durchsetzt ist.

Weniger als 5% der Patienten überleben 5 Jahre nach der Erstdiagnose. Ungefähr 20 % der Patienten mit radikaler Ösophagusresektion leben noch nach 5 Jahren. Die einzige Möglichkeit, die Prognose dieser Patienten zu verbessern, ist daher die frühzeitige Identifizierung von Risikopatienten und die konsequente Behandlung, um schon die Umwandlung in einen Barrett-Ösophagus zu verhindern (Goyal RK, 2003).

1.2 GENETISCHE GRUNDLAGEN DER KREBSENTSTEHUNG

Krebs ist eine genetische Erkrankung, die sich auf Zellebene manifestiert. Obwohl einige Krebsarten erblich sind, entstehen die meisten Mutationen in somatischen Zellen durch Fehler bei der DNS-Replikation oder durch eine Exposition gegenüber Karzinogenen. Eine einzelne genetische Läsion reicht meist nicht aus, um die neoplastische Transformation einer Zelle auszulösen. Malignität wird meist nur erreicht, wenn mehrere (5-10) Mutationen zur

Fehlsteuerung einiger Genprodukte führen. Jeder genetische Schaden kann phänotypische Veränderungen hervorrufen, welche als Progression von der Hyperplasie zum Adenom, zur Dysplasie, zum Carcinoma in situ und zum invasiven Carcinom imponieren. Im Laufe der Evolution haben die Zellen Resistenzmechanismen gegen die neoplastische Transformation entwickelt.

Krebsfrüherkennung auf molekularem Niveau hat durch moderne Untersuchungsmethoden an Bedeutung gewonnen. So wurde vor der Existenz der Möglichkeit der Biopsieentnahme verdächtiges Gewebe entfernt, ohne dass der Krebsverdacht bestätigt war. Heute gibt es Möglichkeiten, das Gewebe mittels Biopsie vorab zu untersuchen und über die bestmögliche Therapie zu entscheiden. Eine gängige Methode nach dem Erstellen des histomorphologischen Befundes ist die Immunhistochemische (IHC) Untersuchung, bei der krebsassoziierte Proteine (z.B. p53, p16 oder APC) mittels Antikörper sichtbar gemacht werden können. Dieses Verfahren eignet sich jedoch nicht dazu, Aussagen über das Krebspotential des entnommenen Gewebes, den so genannten *mutation load*, zu treffen. Dazu eignen sich z.B. Analysen mittels so genannter Mikrosatellitenmarker (Loukola A et al., 2001, Griffith AJF et al., 1996). Mikrosatelliten im humanen Genom weisen bei einem einzelnen Individuum auf beiden Allelen immer gleiche Amplifikationslängen auf. Bestehen Längenunterschiede in verschiedenen Geweben eines Individuums – z.B. im Tumorgewebe –, wird von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) gesprochen. Ist ein Mikrosatellit auf einem Allel nicht vorhanden liegt ein *loss of heterozygosity* (LOH) vor, was ein Hinweis auf den Verlust z.B. eines Tumorsuppressorgens ist und ein Anzeichen eines beginnendes Krebsgeschehen sein kann. Bei vielen Krebsarten sind die Mikrosatelliten zwischen bestimmten Exonen und in codierenden Regionen häufig mutiert, was zu Frameshift-Mutationen, Deletionen und Stoppcodons und dadurch zum Ausfall bzw. Funktionseinschränkung der betreffenden Gene führen kann.

Tumoren entwickeln sich im Laufe eines Prozesses, der je nach Organ durch ein bestimmtes Mutationsspektrum charakterisiert ist (Vogelstein B et al., 2000). Im Verlauf der Krebsentstehung beim Barrett-Adenokarzinom kommt es zu so genannten „Signatur“-Genmutationen, wie *p53*, *p16*, *APC* (*adenomatous polyposis coli*), *DCC* (*deleted in colorectal cancer*), *DPC4* (*deleted in pancreatic cancer*, Locus 4) und *Rb* (**R**etinob**l**astom). Bisher ist nur unvollständig untersucht, wie häufig diese einzelnen Genmutationen während bestimmter, histologisch zu erkennender Progressionsschritte (verschiedene Dysplasiegrade) stattfinden. Weiterhin ist nicht bekannt, welche Mutationen im Verlauf einer Erkrankung zu welchem Zeitpunkt akkumulieren. Alle genannten Veränderungen sind potentielle Biomarker, die die

maligne Progression in der Barrett-Mukosa vorhersagen könnten. Eine Vielzahl von Studien hat verschiedene molekulargenetische Veränderungen der Barrett-Mukosa bereits untersucht. Jedoch gibt es nur wenige Studien, die molekulare Veränderungen anhand von longitudinalen Daten analysiert haben (Barrett MT et al., 1999; Bian YS et al., 2001; Hage M et al., 2006; Lai LA et al., 2007; Maley CC et al., 2004). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob es eine Korrelation zwischen Mutationshäufigkeit bzw. Ausfall der Mikrosatelliten in den Genregionen von *p16*, *p53*, *DCC*, *APC*, *DPC4* und *Rb* gibt. Es soll ebenfalls geklärt werden, ob dieser Sachverhalt zeitabhängig ist. Von Interesse ist gleichermaßen, ob relevante Kombinationen von Mutationen auftreten, die Patienten identifizieren können, welche frühzeitig – vor Entstehung des Adenokarzinoms – einer chirurgischen oder ablativen Therapie zugeführt werden können. Eine weitere Frage ist, ob es einen Zeitpunkt gibt, an dem die Mutationshäufigkeit signifikant zunimmt.

1.2.1 ZELLZYKLUS

Die beim Barrettkarzinom und auch bei anderen Tumoren geschädigten Gene sind häufig physiologisch mit der korrekten Regulation des Zellzyklus assoziiert. Zu diesen Genen zählen *p16*, *p53*, *APC*, *DCC*, *DPC4* und *Rb*. Der somatische Zellzyklus ist der Zeitraum zwischen zwei mitotische Zellteilungen. Die Zeit vom Ende einer Mitose bis zum Beginn der nächsten wird Interphase genannt. Die M-Phase ist die Phase, in der sich die Zelle tatsächlich teilt. Zellwachstum und Zellteilung hängen eng mit der Krebsentstehung zusammen.

Der Zellzyklus dauert bei einer typischen somatischen Zelle zwölf bis 24 Stunden, kann aber z.B. bei den meisten Nervenzellen ein ganzes Leben lang dauern. Es werden verschiedene Phasen im Zellzyklus unterschieden: Bei niedriger Konzentration von Wachstumsfaktoren oder bei hoher Populationsdichte befindet sich die Zelle in der G₀-Phase. Eine höhere Konzentration der Wachstumsfaktoren stimuliert das Ableasen der für die Zellteilung wichtigen Gene. Dazu gehören die "*immediate early genes*" (*c-fos*, *c-jun*, *c-myc*). Sie sind für die Progression durch die G₁-Phase wichtig.

In der **G₁-Phase** (G = *gap* = Lücke) synthetisiert die Zelle Bausteine für die nächste Phase, z.B. Enzyme, welche für die Verdoppelung des Genoms erforderlich sind.

In der **S-Phase** (S = Synthese) stellt die Zelle eine originalgetreue Kopie der gesamten DNA her, ca. 6 Milliarden Nukleotidpaare auf 23 Chromosomenpaare verteilt. Während dieser DNA-Replikation kann es zu Basenfehlpaarungen kommen.

In der **G2-Phase** bereitet sich die Zelle auf die Mitose vor, und es wird der erfolgreiche Abschluss der DNA-Synthese kontrolliert, d.h. der neu synthetisierte DNA-Strang wird auf Fehlpaarungen untersucht.

In der **M-Phase** (M = Mitose) verteilen sich die Chromosomen zunächst auf die beiden Hälften der Zelle. Dies geschieht mit Hilfe des Spindelapparates, anschließend erfolgt die Teilung unter Bildung neuer Kernmembranen für die beiden Tochterzellen. Dabei entstehen zwei Zellen mit identischen genetischen Merkmalen (Griffith et al., 1998).

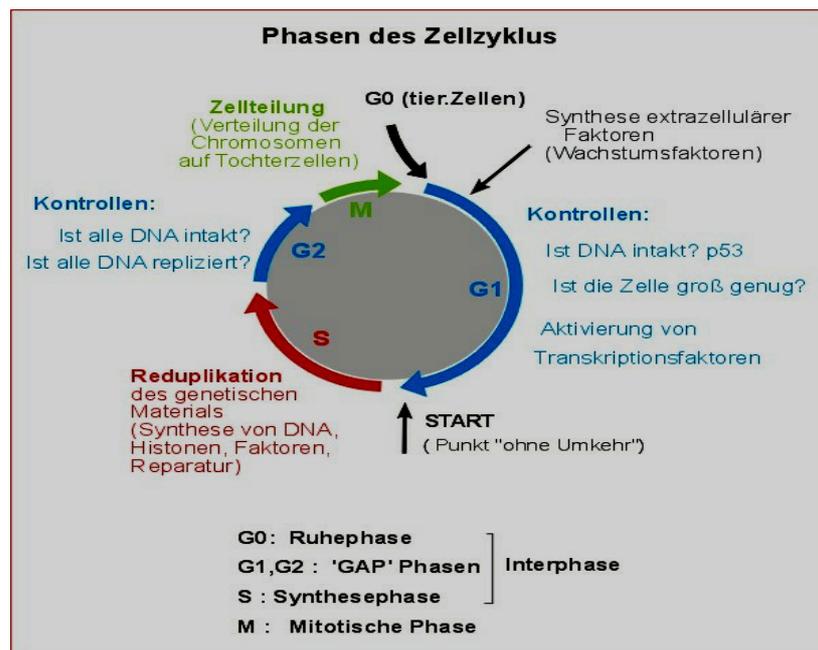


Abb. 10: Zellzyklus

(<http://www.biochemie.web.uni.muenchen.de/biotutor/mitose.htm>)

Der Zellzyklus wird permanent kontrolliert und reguliert, d.h. es gibt mehrere Sicherheitsmechanismen, die den Zellzyklus anhalten oder fortsetzen. Am Ende der G1-Phase wird am so genannten Restriktionspunkt überprüft, ob alle Bedingungen erfüllt sind, danach tritt die Zelle mit einer kurzen Verzögerung in die S-Phase ein. Nach einem weiteren Restriktionspunkt am Ende der G2-Phase teilt sich die Zelle mitotisch. Die kontrollierte Steuerung des Zellteilungszyklus sichert die fehlerfreie DNA-Replikation, Chromosomensegregation und Zellteilung. Die Fehlregulation dieser Vorgänge kann zur Entstehung von Tumorzellen führen. Die zyklische Aktivierung und Inaktivierung von Cyclin-abhängigen-Kinasen (*cyclin-dependent-kinases* CDK) durch regulatorische Untereinheiten, den so genannten Cyclinen, bewirkt eine geordnete Regulation des

Zellteilungszyklus (Morgan DO, 1997). Dabei ist die Proteolyse zur Inaktivierung von Cyclinen und anderen Zellzyklusregulatoren ein zentraler Mechanismus. Die Degradation dieser Proteine durch das Proteasom erfolgt nach Ubiquitinierung. Der Anaphase-Promoting-Komplex (APC) ist eine spezifische Ubiquitinligase und von entscheidender Bedeutung für die Regulation von Chromosomenseparation und dem Mitose-G1-Phase-Übergang (Wäsch et al., 2002). Der APC markiert für diese Vorgänge das Chromosomen-Separationsprotein Securin und B-Cycline durch Anheften von Ubiquitinketten. Dies führt zur Erkennung und Degradation durch das Proteasom. Es ist also nicht die APC-abhängige Proteolyse eines S-Phase Cyclins erforderlich, sondern die eines mitotischen Cyclins für den Mitose-G1-Phase-Übergang. Die deregulierte Proteolyse des S-Phase Cyclins führt dagegen zu einem Phänotyp, der auf Mängel bei der DNA-Replikation und genetische Instabilität hinweist.

1.2.2 TUMORSUPPRESSORGENE

Der Zellzyklus wird durch Enzyme, u.a. Proteinkinasen gesteuert, die eine zentrale Rolle zur Steuerung der Vorgänge in der Zelle spielen (Morgan DO, 1997). Zur Aktivierung einer Proteinkinase sind zusätzlich Moleküle der Cyclin-Klasse von Bedeutung (hauptsächlich die Cycline A, B, D und E); durch unterschiedliche Konzentrationen der Cycline werden die einzelnen Phasen eingeleitet. Es existieren mehrere Cyclin-abhängige-Kinasen: CDK2, 4, 5 und 6 (siehe Abbildung 11). Durch Wachstumsfaktoren wird CyclinD1 veranlasst, einen Komplex mit CDK4 bzw. CDK6 zu bilden und so die G1-Phase des Zellzyklus einzuleiten. In nicht-phosphoryliertem Zustand ist pRb an E2F gebunden, was die Transkription verschiedener Gene verhindert und dadurch als Bremse des Zellzyklus wirkt (siehe Abbildung 2, Beginn der G1-Phase). Durch Phosphorylierung von pRb wird E2F freigesetzt (Nevins NR, 1998). Dieses Protein wirkt als Transkriptionsfaktor. Konsensusstellen für E2F-Transkriptionsfaktoren sind in den Promotoren verschiedener S-Phasen-Gene vorhanden (*c-myc*, *b-myb*, Cyclin E, Cyclin A usw.). Sie dienen dem Übertritt von der G1- in die S-Phase und wirken entscheidend am Ablauf des Zellzyklus mit. Durch Dissoziation des CyclinD1/CDK4-Komplexes wird der CDK4-Inhibitor p16 aktiviert. In der späten G1-Phase wird CyclinE exprimiert und bildet mit CDK2 einen Komplex, der ebenfalls zur Phosphorylierung von pRb beiträgt. Die Aktivität des CyclinE/CDK2-Komplexes steigt bis zum Beginn der DNA-Replikation, um im weiteren Verlauf in der S-Phase wieder abzunehmen.

Die S-Phase ist durch die Aktivität von CyclinA/CDK2 dominiert, das einerseits den Übergang von der G1- in die S-Phase kontrolliert und anschließend für die DNA-Replikation notwendig ist. Nach der Replikation der DNA wird der neu synthetisierte DNA-Strang mit dem DNA-*mismatch*-Reparatursystem auf Fehler überprüft und diese gegebenenfalls behoben. Strangbrüche der DNA werden von einer poly-Adenosin-diphosphat-Ribose-Polymerase (PARP) erkannt und markiert, was zur Stabilisierung von p53 führt. Hierdurch werden Caspasen als Substrat von PARP aktiviert. Diese bauen Bestandteile der Kernlamina ab und leiten dadurch die Zellapoptose ein (Fuchs et al., 1997). Der Komplex CyclinA/CDK1 kontrolliert den Übergang von der G2- in die M-Phase. Zusätzlich phosphorylieren CyclinA-abhängige Kinasen pRb.

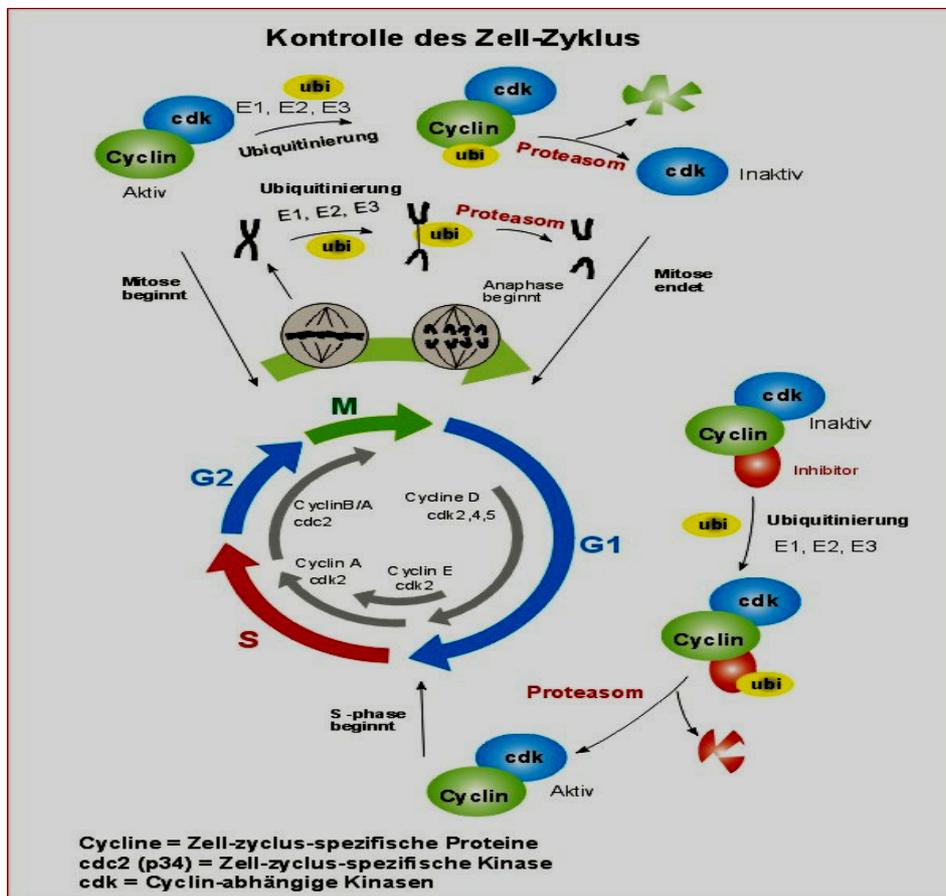


Abb. 11: Kontrolle des Zellzyklus

(<http://www.biochemie.web.uni.muenchen.de/biotutor/mitose.htm>)

Im Ruhezustand (G0) können toxische Agentien wie Sauerstoffradikale, chemische Karzinogene, Strahlung und onkogene Viren Gene schädigen (Neuhof et al., 1998). Dies kann

zu überhöhter Aktivität oder im Falle der Tumorsuppressorgene zur Abschaltung der teilungshemmenden Kontrollmechanismen führen (Wood et al., 2001). Einer dieser Mechanismen ist das DNA-*mismatch*-Reparatursystem. Die dafür verantwortlichen Gene sind *hMSH2*, *hMLH1*, *PMS1*, *PMS2* und *GTBP*. Fällt eines dieser Gene aus, ist die Erkennung und Beseitigung von Fehlpaarungen nicht mehr möglich. Daraus lässt sich ableiten, dass Tumore durch Schädigung der DNA-Replikationskontrolle bzw. Fehlsteuerung der Apoptose entstehen können.

Bei der Betrachtung der molekularen Grundlagen der Mitose ist zu berücksichtigen, dass in den somatischen Zellen des Organismus stets zwei Kopien des Genoms (diploider Chromosomensatz) vorliegen. Der Ausfall eines fehlerhaften Allels kann durch das zweite Allel kompensiert werden. Dies gilt jedoch nicht bei Protoonkogenen. Hier kann bei Vorliegen einer Mutation das geschädigte Allel den aktiven Zustand repräsentieren. Im Falle der Tumorsuppressorgene, bei denen es um eine Inaktivierung des Gens geht, müssen jedoch beide Allele des betreffenden Gens durch Mutation inaktiviert werden (Zwei-Treffer-Hypothese nach Knudson et al., 1983).

Als generellen Inhibitor der Cyclin-CDK-Komplexe kann das Protein p21 bezeichnet werden. Es wird direkt von dem Tumorsuppressor p53 als Reaktion auf eine DNA-Beschädigung stimuliert. Der Übergang aus der G1- in die S-Phase des Zellzyklus wird von dem Protein p27 blockiert, wobei Wachstumssignale von Nachbarzellen (Interleukin-2, CSF-1) die Konzentration von p27 beeinflussen. Der Angriffspunkt des Proteins ist der CyclinE-CDK2-Komplex. Zusätzlich ist p27 an der Wachstumshemmung durch Kontaktinhibition beteiligt. Das Protein p16 ist ebenfalls ein CDK4-Inhibitor, der den Zellzyklus in der G1-Phase blockiert.

Neben Rb hat das p53-Protein eine zentrale Bedeutung für den fehlerfreien Ablauf des Zellzyklus. Die Einleitung von Reparaturmechanismen oder Apoptose geschieht durch die Wirkung von p53. Die Aktivierung des CDK-Inhibitors p21 führt zum Anhalten des Zellzyklus. Fällt das *p53*-Gen aus, so wird der Reparaturmechanismus nicht mehr durchgeführt und die Mutation wird fortgeschrieben. Die Inaktivierung von Inhibitor-Proteinen fördert sowohl den Zellzyklus als auch die Überaktivierung von Regulator-Proteinen (Sherr CJ, 1996). So führt die Überexpression von Cyclinen zu überaktiven CDK-Komplexen. CyclinD1 und CyclinE spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Brustkrebs. Hierbei ist eine Korrelation zwischen CyclinD1-Amplifikation und CyclinD1-

Überexpression feststellbar. Inhibitor-Gene wie *p15* und *p16* können in zahlreichen Tumoren gebremst oder ausgeschaltet sein. In Ösophagus-, Blasen- und Lungenkarzinomen ist vermutlich eine CyclinD1-Genamplifikation der Region 11q 13 dafür verantwortlich. Überexpressionen von CDK4 und CDK6 sind in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen worden (Adams et al., 1998).

1.2.2.1 Rb

Das *Rb*-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 13 und ist ein Tumorsuppressorgen. Werden beide Kopien dieses Gens inaktiviert, fehlt – wie oben bereits erwähnt - dem Zellzyklus eine wichtige Bremse. Das Krebsrisiko erhöht sich drastisch. Tumore mit inaktivierenden Mutationen von *Rb* weisen einen normalen CyclinD1-Gehalt auf und bilden intaktes *p16*. In Tumorzellen ist häufig CyclinD überexprimiert oder *p16* inaktiviert. Der Verlust einer der Komponenten, die im Zellzyklus die Passage über den Restriktionspunkt steuern, genügt, um die normale Wachstumsregulation zu unterlaufen.

1.2.2.2 p16

Das *p16*-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 9. In humanen Zellen wird der Zellzyklus zum Teil durch Cyclin-Kinase-Inhibitoren gesteuert (siehe oben). Es wird angenommen, dass menschliche Zellen einen Cyclin-Kinase-Inhibitor (CKI) herstellen. Obwohl das Protein noch nicht identifiziert ist, ist bekannt, dass humane Zellen mehrere an der Regulation des Zellzyklus beteiligte CKI-Moleküle exprimieren. Diese werden in zwei Klassen eingeteilt:

1. cdk-Inhibitor-Proteine, von denen sämtliche cdk1-, cdk2-, cdk4- und cdk6-Cyclin Komplexe gehemmt werden.
2. Inhibitoren der Kinase 4 (INK4). Von diesen Proteinen werden spezifisch cdk4-CyclinD- und cdk6-CyclinD-Komplexe gebunden und gehemmt.

Experimentell kann eine Überexpression von INK4-Protein hervorgerufen werden, wobei die erhaltenen Zellen die G1-Phase nicht mehr durchlaufen können. Dabei wirkt das INK4-Protein *p16* als Tumorsuppressor. Die Aufgaben der anderen INK4-Proteine sind bisher unbekannt. Der Funktionsverlust von *p16*, z.B. durch inaktivierende Mutationen kann dazu führen, die Cyclin-abhängige Kinaseaktivität zu hemmen. Der Verlust von *p16* hat eine Überexpression von CyclinD1 zur Folge, die zu einer Hyperphosphorylierung von Rb und der

Freisetzung aktiver Transkriptionsfaktoren vom Typ E2F führt. In vielen Krebszellen ist das Gen für den CDK-Inhibitor p16 ausgefallen und somit fehlt hier eine normale und wirkungsvolle Bremse des Zellzyklus.

1.2.2.3 APC

Das Gen *APC* liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms fünf. *APC* gehört zu einer Gruppe von Tumorsuppressorgenen, von denen Proteine codiert werden, die bei verschiedenen Zellarten den Durchgang durch den Zellzyklus hemmen (siehe oben). *APC* speziell hemmt die Fähigkeit des Proteins Wnt, die Expression des *myc*-Gens zu aktivieren.

1.2.2.4 p53

Das Gen *p53* liegt am Ende des kurzen Arms von Chromosom 17. Dieses Gen ist in mehr als 50% humaner Krebszellen geschädigt. Sein Genprodukt unterdrückt das Wachstum einer Zelle oder löst den programmierten Zelltod (Apoptose) aus (Chang et al., 2000). Bei molekularbiologischen Untersuchungen z.B. der Gelelektrophorese wandert das p53-Protein wie ein Protein mit einem Molekulargewicht von 53kDa. Es besteht aus 393 Aminosäuren und besitzt eine zentrale Domäne für die spezifische Bindung an DNA. p53 ist ein nucleäres Phosphoprotein.

Die Menge an p53 nimmt zu, wenn das Genom durch ionisierende Strahlen, UV-Strahlen oder in anderer Form geschädigt ist. Eine Zunahme von p53 löst eine Genexpression aus, die zum Anhalten des Zellzyklus in der G1-Phase führt. In dieser Zeit kann das DNA-Reparatursystem Schäden an der DNA beheben. Tumorzellen, denen ein funktionelles p53-Protein fehlt können weder eine Korrektur noch die Apoptose einleiten.

1.2.2.5 DPC4

Das *DPC4*-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 18. Da der Verlust der normalen Funktion des Gens *DPC4* (Smad4 genannt) zur Tumorbildung beiträgt, wird *DPC4* als Tumorsuppressor (Wachstumsbremse) klassifiziert (Hilgers et al., 2002). Das Produkt dieses Gens ist Bestandteil einer Signalkette, an deren Ende die Unterdrückung der Zellteilung steht. Zu überraschenden Ergebnissen gelangen Schwarte-Waldhoff und Mitarbeiter (2000). Sie stellen fest, dass das *DPC4*-Gen die Neubildung von Blutgefäßen steuert, die für das

Wachstum eines Tumors (Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff) eine unabdingbare Voraussetzung ist. Somit beeinflusst *DPC4* auf indirektem Weg das Wachstum des Tumors.

1.2.2.6 DCC

Das *DCC*-Gen liegt wie das *DPC4*-Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 18. Die Aufgabe der Tumorsuppressorgens *DCC* ist noch nicht geklärt. Bekannt ist nur, dass dieses Gen bei Kolon-Karzinom mutiert bzw. ausgefallen ist und heute schon für diese Krebsart als so genanntes Marker-Gen fungiert.

2. ZIEL DIESER ARBEIT

Ziel dieser Arbeit ist es, einen oder mehrere Biomarker oder Kombinationen von Biomarkern ausfindig zu machen, die den molekularen Prozess der Barrett-Mucosa ohne Dysplasie oder mit einer low-grade-IEN zu einer high-grade-IEN oder einem Barrettkarzinom vorhersagen können. Hierzu ist eine Verlaufsbeobachtung notwendig. Eine große Gruppe von Patienten mit Barrett-Mucosa wird in kontrollierten Überwachungsprogrammen beobachtet. Leider gibt es bis dato keine zuverlässigen Marker, die erkennen lassen, welche Patienten eine fortgeschrittene Dysplasie oder gar ein Adenokarzinom entwickeln und einer frühzeitigen chirurgischen Therapie zugeführt werden müssen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

Probenmaterial

Bei den verwendeten Proben handelte es sich um paraffineingebettetes Biopsiematerial aus dem Ösophagus, welche im Rahmen von oberen gastrointestinalen Endoskopien gewonnen wurden und uns aus

- a) dem Institut für Pathologie des Klinikums Kassel und
- b) dem Privatarchiv von PD Dr. J. Alles, Pathologe, Gießen, für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurde.

Als Kontrolle diente in der gleichen Untersuchung gewonnenes Gewebe aus Magenbiopsien oder unauffälliges Plattenepithel des Ösophagus (ohne Nachweis von Barrettschleimhaut). Zudem wurde in den entsprechenden Fällen Plattenepithel aus der Nähe des Barrettsegments untersucht.

Die Untersuchung beschränkte sich auf 26 Patienten, 18 männliche und acht weibliche. Das Alter lag zwischen 45 - 82 Jahren. Pro Patient standen zwei bis 17 Biopsien zur Verfügung, die in einem Zeitraum von drei bis 51 Monaten entnommen wurden. Insgesamt sind 116 Proben in die vorliegende Untersuchung eingegangen. Geeignete DNA befand sich in 110 Proben.

3.2 METHODEN

3.2.1 LASER-MIKRODISSEKTION

3.2.1.1 VORBEREITUNG DER PRÄPARATE FÜR DIE MIKRODISSEKTION

Der erste Teil der makroskopischen Diagnostik besteht aus dem endoskopischen Befund. Nach Entfernung des Ösophagus-Tumors bzw. nach Gewinnung einer Biopsie der Barrett-Schleimhaut wird eine makroskopische Beschreibung des Resektats durchgeführt.

Das Gewebe wird anschließend in Formalin fixiert. Es folgen die Entwässerung des Präparates, Paraffineinbettung und Schneiden mit einem Mikrotom. Die drei bis 20µm dünnen Schnitte werden auf Glasobjektträger übertragen. Nach der Entparaffinierung und Wässerung folgt eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die gefärbten Schnitte werden entwässert, aufgehellt und eingedeckt und können lichtmikroskopisch untersucht werden. Soll eine genetische Analyse des Gewebes mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion durchgeführt werden, müssen die Schnitte auf spezielle Objektträger, die mit einer Polyester-Folie beschichtet sind, aufgezogen werden, da der Laser später nicht das Präparat schneiden soll, sondern die Folie.

3.2.1.2 DURCHFÜHRUNG DER LASER-MIKRODISSEKTION

Die Laser-Mikrodissektion erlaubt das Ausschneiden von kleinsten Arealen aus gefärbten Schnittpräparaten unter mikroskopischer Kontrolle. Sogar einzelne Zellkerne sind mit dieser Methode zu gewinnen. Das Ausschneiden erfolgt mit einem gepulsten UV-Laser, dessen fokussierter Strahl entlang der Kontur des interessierenden Areals geführt wird. Diese Technik gewährleistet eine äußerst schonende Präparatbehandlung. Da ohne jeglichen mechanischen Kontakt mit dem Gewebe gearbeitet wird, ist die Gefahr einer Kontamination mit Fremd-DNA sehr gering. Ein weiterer wesentlicher Vorteil der Laser-Mikrodissektion ist die exakte Gewinnung einzelner Zellpopulationen (hier Barrett-Mucosa) von größtmöglicher Reinheit im Sinne einer Vermeidung von Beimengung von Normalgewebe, welche eine molekulargenetische Analyse der Zielzellen stören würde. Die vorliegende Untersuchung erfolgt mit dem Laser-Mikrodissektionsverfahren der Firma Leica.



Abb. 12: Leica Mikrodisektionsmodul (<http://www.leica.de>)

Das Laser-Mikrodisektionsmodul ist mit einem computergesteuerten Labormikroskop gekoppelt. Mit einem Trackball wird sowohl der Objektivrevolver als auch die Präparatverschiebung (xy) und die Fokussierung (z) gesteuert. Der Laser ist ein Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337,1nm. Als Auffangbehälter für die Dissektate dienen autoklavierte 0,2µl- oder 0,5µl-Eppendorffcups, die über einen computergesteuerten Motor in die entsprechende Position gefahren werden können. Alle Funktionen des Mikroskops und des Lasers werden über eine Software mit Hilfe des Computers gesteuert. Während der Mikrodisektion ist es möglich, das mikroskopische Bild auf dem PC-Monitor mittels einer 3CCD-Camera (3-Chip Kamera mit RGB-Technik) darzustellen. Das Vorzeichnen der Schneidelinie mit möglicher Korrektur, das Durchführen des Schneidevorgangs, das Abspeichern von Bildern zur Dokumentation unterschiedlicher Bearbeitungsstufen eines Experiments und die Kalibrierung des Gesamtsystems vervollständigen die Funktionen.

Das System erlaubt eine ständige Überprüfung, ob das Dissektat tatsächlich in dem vorgesehenen Reaktionsgefäß gelandet ist. Dazu verfügt die Einheit über ein Kontrollobjektiv, das mittels der Software eine schnelle Kontrolle ermöglicht, ohne den Objektträger entfernen zu müssen. Zum Schneiden wird der Laserstrahl über das Präparat bewegt, d.h. das Präparat kann während des Schneidens problemlos beobachtet werden. Die Schneidepräzision ist automatisch mit der gewählten Vergrößerung gekoppelt. Bei einer höheren Vergrößerung wird automatisch eine feinere Schnittbewegung festgelegt, da der Schneidestrahle und seine Ablenkung im gleichen Maß verkleinert werden. Da die Zellen ohne mechanische Berührung und ohne Anwendung zusätzlicher physikalischer Kräfte in die Reaktionsgefäße fallen, ist dieses Verfahren - wie bereits erwähnt - aufgrund geringster Kontaminationsgefahr besonders geeignet für den PCR-Prozess.

3.2.1.2.1 HERSTELLUNG DER OBJEKTTRÄGER FÜR DIE LASER-MIKRODISSEKTION

Für die Laser-Mikrodissektion sind spezielle Objektträger erforderlich. Dazu werden Glasobjektträger für die Lichtmikroskopie mit einer Polyester-Folie bezogen, da der Laserstrahl die Folie schneidet und nicht das Präparat, wodurch einen „Hitzeschaden“ verhindert werden kann. Die Objektträger werden zuerst in Ethanol getaucht und über die vorher genau zugeschnittene Folie gehalten, die durch Ko- und Adhäsionskräfte möglichst glatt an den Objektträger schnappt. Nach dem Trocknen wird die Folie an den Rändern mit einem Klebstoff (Fixogum) fixiert. Anschließend werden 80µl einer Poly-L-Lysin-Lösung als Präparatadhäsiv gleichmäßig auf der Objektträgerfolie verteilt.

3.2.1.2.2 VORBEREITUNG DER PRÄPARATE

Von den zu untersuchenden Präparaten werden Mikrotomschnitte angefertigt, die (mittels eines warmen Wasserbades zur Streckung des Schnittes) auf die folienbeschichteten Objektträger überführt werden. Die Dicke der Gewebeschnitte kann zwischen drei und 20µm variiert werden. Diese so hergestellten Präparate werden bei 80°C für 20min im Wärmeschrank getrocknet, anschließend entparaffiniert und mit **Hämatoxylin-Eosin** gefärbt (HE-Färbung siehe unten).

3.2.1.2.3 ENTPARAFFINIERUNG UND HE-FÄRBUNG

Zur Entparaffinierung werden die Präparate zweimal für 5min in Xylol überführt, danach kurz in eine absteigende Alkoholreihe getaucht (100%-100%-96%) und anschließend mit destilliertem Wasser gespült.

Die Präparate werden dann einer Sukzedanfärbung unterzogen. Dabei werden die Farbstoffe, hier Hämatoxylin und Eosin, nacheinander angeboten. Zur **Hämatoxylin-Eosin-Färbung** (HE-Färbung) werden die Präparate wie folgt behandelt:

- fünf Minuten in Hämatoxylin nach Mayer
- kurz mit Leitungswasser spülen
- fünf Minuten mit warmem Leitungswasser bläuen.

- fünf Minuten in Eosin 0,1%ig, pH6,
- spülen mit destilliertem Wasser
- kurz in 70%igen und 96%igen Alkohol eintauchen.
- für ca. eine Stunde bei 50°C in den Wärmeschrank zum Trocknen gegeben.

3.2.1.2.4 MIKRODISSEKTION

Aus den gefärbten Präparaten werden unter lichtmikroskopischer Kontrolle mittels Laser-Mikrodissektion einzelne Zellen aus Tumor- und Normalgewebe herausgeschnitten. Zwischen 50 und 500 Zellen werden pro Cup gesammelt. Abbildung 13 zeigt den histologischen Aspekt einer Drüse in der Barrett-Schleimhaut vor, während und nach der Mikrodissektion.



Abb. 13: Bildbeispiel einer Laser-Mikrodissektion

3.2.2 DNA-Isolation

Für die weitere Aufarbeitung zur molekularen Analyse muss die DNA isoliert werden. Dazu ist es nötig, alle Proteine aus dem Zellpräparat zu entfernen. Dies geschieht unter Zugabe des Enzyms Proteinase K, das zusammen mit TL-Puffer in den Cup-Deckel gegeben wird, in welchen das Zellpräparat beim Ausschneiden fällt. Folgende Reagenzien finden Verwendung:

- 20µl TL-Puffer
- 1 x Taq PCR Puffer (Life Technoligies, Eggenstein, Deutschland)
- 2mg/ml Proteinase K
- 3% Tween 20 (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Die Ansätze werden für 16 bis 20 Stunden bei 50°C inkubiert, anschließend 12min bei 13000rpm zentrifugiert. Danach wird die Proteinase K durch 10min Inkubation bei 94°C inaktiviert. Es folgt eine Amplifikation der erhaltenen DNA mittels PCR.

3.2.3 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1983 von Mullis entwickelt und ist eine hervorragende Methode für die Herstellung großer Mengen eines speziellen DNA-Abschnittes mittels einer einfachen enzymatischen Reaktion (Mullis et al., 1986).

Von besonderer Bedeutung für die Molekularbiologie ist die minimale Menge an Substrat, die in einem Versuchsansatz Verwendung finden kann.

Obwohl es sich bei der PCR um eine sehr komplexe Methode handelt, werden nur relativ wenige Materialien benötigt (Lachmund et al., 1994):

Eine DNA- oder RNA-Matrize, Primer (Oligonukleotide), Nukleotide (G,A,C,T), eine Polymerase, ein geeignetes Puffersystem sowie ein Thermocycler.

Man benötigt mindestens zwei verschiedene Primer mit einer definierten Basenfolge, die komplementär zu den flankierenden Abschnitten des gesuchten DNA-Fragmentes sein müssen. Die Primer dienen von beiden Seiten der Polymerase als Startpunkt für die DNA-Vermehrung. Die Sequenz der Primer sollte möglichst nur einmal im menschlichen Genom vorkommen, um eine Fehlpaarung zu vermeiden. Dies ist im Normalfall bei einer Länge von mindestens 18 Basen gewährleistet. Die notwendige Zeit für die Hybridisierung mit dem Matrizenstrang nimmt mit steigender Anzahl an Basen zu, daher sollte die Mindestlänge nicht unnötig überschritten werden.

Die Nukleotide als Bausteine der DNA liegen als Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) vor und müssen in ausreichender Menge vorhanden sein, um die Polymerase zu sättigen. Sie sollten jedoch nicht übermäßig oder in unterschiedlicher Konzentration vorliegen, um Fehlpaarungen zu vermeiden.

Die Polymerase ist das Schlüsselenzym der Reaktion und aufgrund ihrer geringen Fehlerrate optimal geeignet für die naturgetreue Kopie der DNA. Sie benötigt einen Matrizenstrang, an dem sie sich orientiert, um den komplementären Strang aufzubauen und Primer, an denen sie starten kann.

Der pH-Wert im Reaktionsansatz hat im basischen Bereich sein Optimum (~ 8,8) und muß eingehalten werden, da das Enzym sonst frühzeitig inaktiviert wird (Lachmund et al., 1994).

Das Prinzip der PCR ist einfach und beruht auf der bekannten Struktur der DNA, auf dem Wissen um die DNA-Replikation und der daran beteiligten Enzyme und „Bausteine“. In Anlehnung an den natürlichen Ablauf der DNA-Vermehrung gliedert sich die PCR in drei Teilschritte, die in einer bestimmten Anzahl von Zyklen wiederholt werden (Lachmund et al., 1994).

Von besonderer Bedeutung hierbei ist die richtige Wahl der PCR-Bedingungen:

Die optimale Temperatur für jeden einzelnen Teilschritt, Zugabe einer ausreichenden Menge von den benötigten Substanzen und die richtige Anzahl der Zyklen, die von der Ausgangskonzentration der Matrize abhängig ist.

Im Regelfall handelt es sich um 25-30 Zyklen, wobei die Teilschritte jeweils verschiedene Zeiten und unterschiedliche Temperaturen benötigen. Für diesen Zweck ist der Thermo-Cycler programmierbar, heizt und kühlt somit automatisch auf die geforderte Temperatur und inkubiert den Reaktionsansatz für die benötigte Zeit ((Lachmund et al., 1994; Arnheim et al., 1992).

1. Denaturierung der DNA

Ausgehend vom ersten Schritt der natürlichen Polymerisation muß zunächst die Doppelhelixstruktur der DNA aufgespalten werden, so daß am Ende zwei Einzelstränge vorliegen.

Diese Aufspaltung der DNA erfolgt durch einfache Hitzebehandlung bei ca. 90-96°C für 30-60 Sekunden.

2. Annealing/Hybridisierung

Bei 50-60°C werden nun die Primer an die ihnen komplementäre Stelle des DNA-Stranges angelagert, wo sie der TAQ-Polymerase als Startpunkt dienen. Dieser Schritt dauert ungefähr eine Minute und wird als Annealing bezeichnet.

3. Polymerisation

Dieser Schritt benötigt ungefähr eine Minute bei einer Temperatur von 72°C.

Die Polymerase erkennt die Primer und beginnt mit der Synthese des Gegenstranges am 3'-OH-Ende. Dieser Vorgang spielt sich an beiden Strängen gleichzeitig ab, so daß wir am Ende dieses Schrittes zwei Doppelstränge vorliegen haben. Jeder dieser beiden Stränge beginnt an einem der Enden mit der Primersequenz und läuft am anderen Ende offen aus.

Zu Beginn des nächsten Zyklus werden diese beiden Doppelstränge dann denaturiert, so daß jetzt vier Einzelstränge für die Polymerase als Matrize zur Verfügung stehen. Erforderlich

hierbei ist natürlich, daß das Template weit genug über die eigentliche Sequenz verlängert wird, so daß der Primer auf der anderen Seite wieder ansetzen kann.

An den im ersten Zyklus entstandenen offenen Enden setzt nun wieder ein Primer an und die Polymerisation läuft nun bis zu dem Ende durch, an dem der andere Primer im vorangehenden Zyklus begonnen hat. Dieser Abschnitt mit definierter Länge unterliegt im Gegensatz zu dem Hauptprodukt einem DNA-Produkt, das exakt so lang ist wie der gewünschte DNA-Abschnitt plus der beiden Primer. Während der folgenden PCR-Zyklen kommt es theoretisch zu einer exponentiellen Vermehrung des ursprünglichen Gensegments.

Trotz aller Optimierungsmöglichkeiten erreicht die Effizienz dieser Methode keine 100%: Die Zahl der Amplifikationen nimmt mit zunehmender Anzahl der Zyklen ab. Man erreicht ein Plateau, welches durch zwei Phänomene erklärt werden kann:

Zum einen kommt es bei steigender Zahl der Doppelstränge zu einer Konkurrenz zwischen Annealing von Template und Primer und einem Reannealing der komplementären Stränge.

Zum anderen reicht irgendwann die Enzymmenge nicht mehr aus, die Primer-Template-komplexe in der zur Verfügung stehenden Zeit zu verlängern (Arnheim et al., 1992).

Das PCR-Produkt kann im Anschluß mit einem Agarosegel nachgewiesen werden. Es tritt hier als scharfe Bande bei entsprechender Länge auf. Weitere unscharfe Banden weisen auf Verunreinigungen mit Fremd-DNA und auf unspezifische Nebenprodukte hin und bieten somit eine Kontrolle für die Qualität der PCR.

Der Rest des Produktes kann nun in weiteren Versuchen Verwendung finden.

|----- Zielsequenz -----|

Template

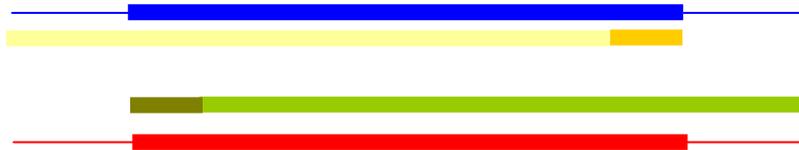


Denaturierung
und Anlagerung
der Primer



1. Zyklus

Verlängerung der
Primer



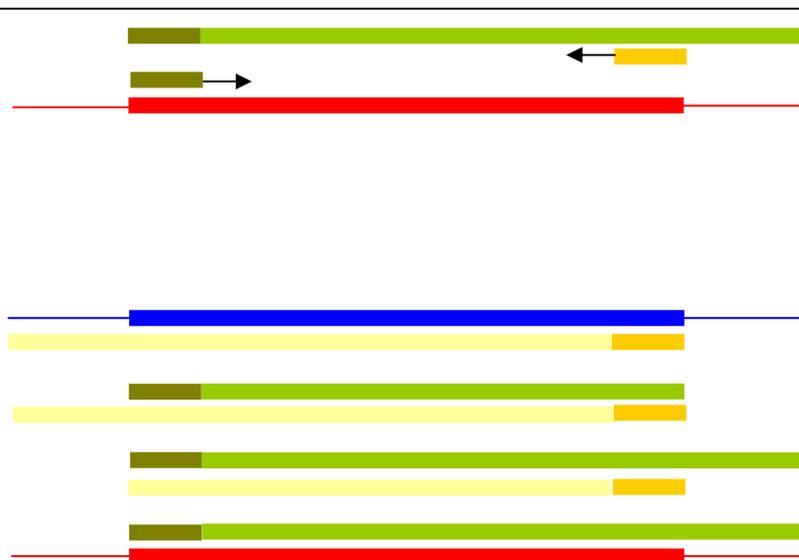
2. Denaturierung

2. Zyklus

Anlagerung der
Primer



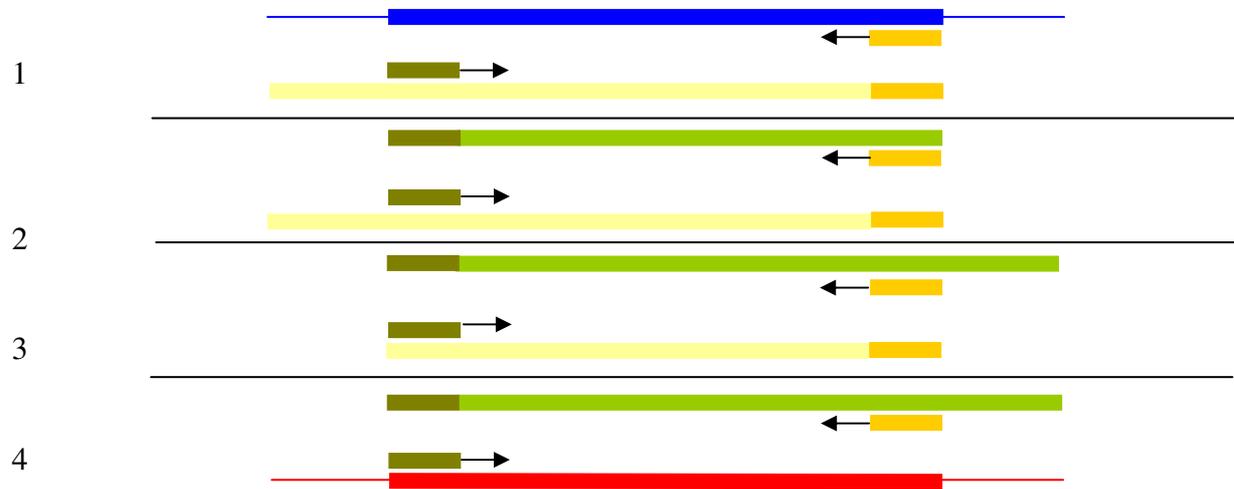
Verlängerung
der Primer



3. Denaturierung

3. Zyklus

Anlagerung der
Primer



Verlängerung der
Primer

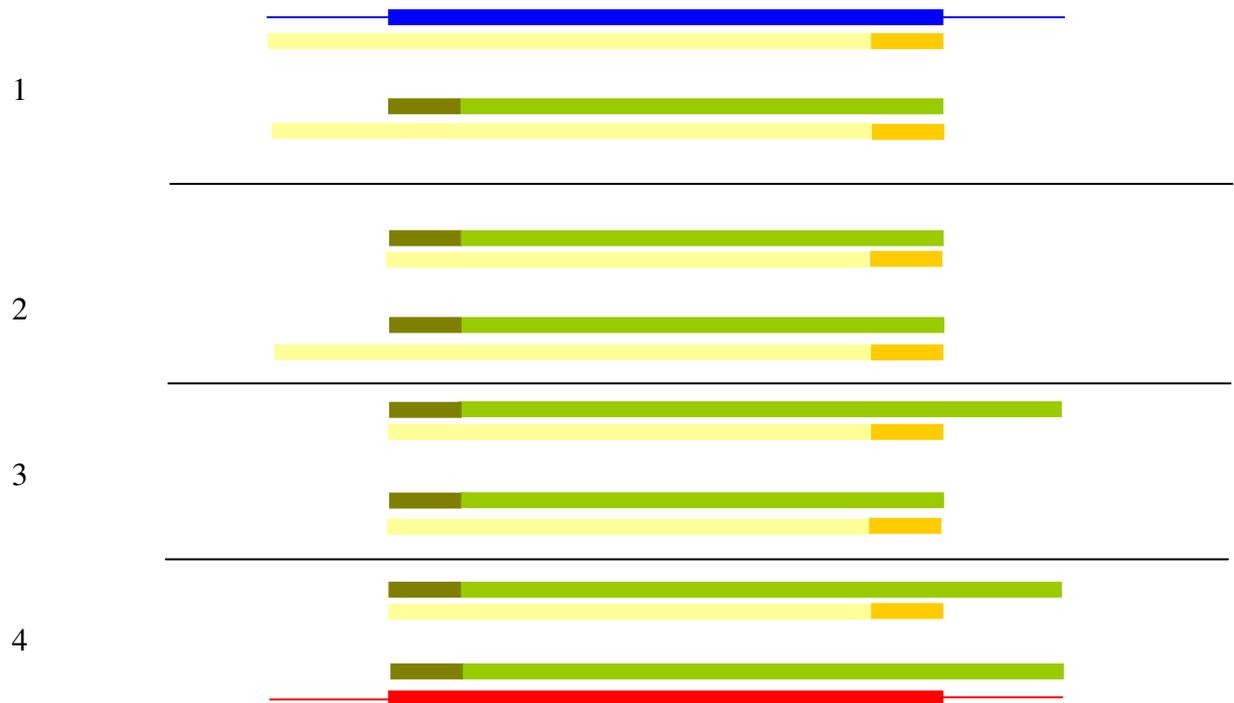


Abb. 14: PCR-Schema

3.2.3.1 PEP-PCR

Da bei der Mikrodissektion nur ca. zwischen 50 und 500 Zellen gewonnen werden, liegt eine sehr geringe Menge an Ausgangs-DNA vor, so dass zunächst mit Hilfe einer so genannten ‚primer-extension-preamplification-polymerase-chain-reaction‘ (PEP-PCR) das ganze Genom vervielfältigt werden muss („Whole genome amplification“). Diese Maßnahme erlaubt, im Gegensatz zur herkömmlichen PCR, multiple molekulare Analysen in wenigen oder sogar nur einer einzigen Zelle (Heinmoeller E et al., 2002; Zhang et al., 1992)

Das von Dietmaier et al.(1999) beschriebene Protokoll der improved extension preamplification (I-PEP) PCR diente als Grundlage für die Optimierung der I-PEP PCR. Im Folgenden das optimierte Protokoll:

Die PCR wurde aus einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler durchgeführt (Foster City, CA). Der I-PEP PCR Mix bestand aus 30µl I-PEP mix (Endkonzentration: 0.05 mg/ml Gelatine, 20 µmol/L (N)₁₅ random Primer, 1 mmol/L dNTPs, 3U Taq Expand High Fidelity polymerase, 6 mmol/L MgCl₂, in 1 x PCR Puffer No. 3 und 10µl Lyspuffer mit der verdauten Einzelzelle oder genomischer DNA. Es werden 50 PCR Zyklen durchgeführt:

- Schritt 1: 95°C für 2 min
- Schritt 2: 95°C für 30 sec
- Schritt 3: 28°C für 90 sec
- Schritt 4: Rampe 0.1°C pro Sekunde bis 55°C
- Schritt 5: 55°C für 2 min
- Schritt 6: 68°C für 3 min
- Schritt 7: zurück zu Schritt 2 weitere 49mal
- Schritt 8: 68°C für 15 min
- Schritt 9: 4°C für 5 min

3.2.3.2 MSI-PCR

Auf eine PEP-PCR folgt nun eine spezifische, exponentielle PCR, in der eine ganz bestimmte DNA-Sequenz amplifiziert wird, um herauszufinden, ob diese bestimmten Gene am Krankheitsprozess beteiligt sind. Es werden in dieser Arbeit spezielle Mikrosatelliten-Primer

(Mikrosatellitenmarker) für Gene eingesetzt, von denen bekannt ist, dass sie an der Entstehung verschiedener Tumore beteiligt sind:

- *p53* (17p),
- *p16* (9p),
- *APC* (adenomatous polyposis coli, 5q),
- *DCC* (deleted in colorectal cancer, 18q),
- *DPC4* (deleted in pancreatic cancer, Locus4, 18q)
- *Rb* (Retinoblastom, 13q)

3.2.3.2.1 MSI-PCR-BEDINGUNGEN

Es werden insgesamt 18µl der folgenden Reagenzien eingesetzt:

- 2,5mmol/l MgCl₂, in 1 x PCR Puffer No. 2 von Roche
- 0,2mmol/l dNTPs
- 0,3µmol/l Primer (siehe Tabelle 2)
- 0,5 U *Taq* Expand High Fidelity Polymerase
- 2µl präamplifizierte DNA

Diese Proben werden in einen Eppendorff Mastercycler, für 50 Zyklen mit folgendem Programm überführt:

- Schritt 1: 95°C für 3 min
- Schritt 2: 95°C für 30 sec
- Schritt 3: X°C für 45 sec
- Schritt 4: 72°C für 1 min
- Schritt 5: Schritte 2 bis 5 werden 49 mal durchlaufen
- Schritt 6: 72°C für 10 min
- Schritt 7: 4°C für 5 min

Schritt 3 gibt die Annealing-Temperatur des MSI-Primers an, d.h. diese Temperatur ist je nach PCR bzw. eingesetztem Primer variabel (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Eingesetzte Primer

MSI-Primer	Gen	Basensequenz	Annealingtemp.
p53F3	<i>p53</i>	5'-GTT GGC TCT GAC TGT ACC AC-3'	57°C
p53R3		5'-CTG GAG TCT TCC AGT GTG AT-3'	
p53ivs1a	<i>p53</i>	5'-GCA CTT TCC TCA ACT CTA CA-3'	54°C
p53ivs1b		5'-AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG-3'	
TP53ALU up	<i>p53</i>	5'-AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG-3'	58°C
TP53ALU down		5'-GCA CTT TCC TCA ACT CTA CA-3'	
TP53ALS-up	<i>p53</i>	5'-TCG AGG AGG TTG CAG TAA GCG GA-3'	50°C
TP53ALS-down		5'-AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG-3'	
D17S1678 forward	<i>p53</i>	5'-TTT GGG TCT TTG AAC CCT TG-3'	54°C
D17S1678 reverse		5'-CCA CAA CAA AAC ACC AGT GC-3'	
APC up	<i>APC</i>	5'-AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T-3'	55°C
APC down		5'-ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG-3'	
D18S63 left	<i>DPC4</i>	5'-AGC TCA TGT TGG ATG TAT CA-3'	56°C
D18S63 right		5'-GTC AGA CTA CGC GCC TT-3'	
D18S69 forward	<i>DCC</i>	5'-CTC TTT CTC TGA CTC TGA CC-3'	56°C
D18S69 reverse		5'-GAC TTT CTA AGT TCG TGC CAG-3'	
D13S127 forward	<i>Rb</i>	5'-CAG ATA TGT ACT CAT GCA CAT G-3'	53°C
D13S127 reverse		5'-AAA CAA ATG AGT TTG GCT GT-3'	
PKY11 forward	<i>p16</i>	5'-TTG TTG ATT CTG CCT TCA AAG TCT TTT AAC-3'	56°C
PKY11 reverse		5'-CGT TAA GTC CTC TAT TAC ACA GAG-3'	
PKY3 forward	<i>p16</i>	5'-CAC CTC AGA AGT CAG TGA GT-3'	56°C
PKY3 reverse		5'-GTG CTT GAA ATA CAC CTT TCC-3'	
D9S942 forward	<i>p16</i>	5'-GCA AGA TTC CAA ACA GTA-3'	50°C
D9S942 reverse		5'-CCA CAA CAA AAC ACC AGT GC-3'	

3.2.4 GELELEKTROPHORESE

3.2.4.1 POLYACRYLAMIDGEL

Zur weiteren Analyse werden die Proben auf eine 6,7%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wird mit folgenden Reagenzien durchgeführt.

- 4,5 ml Aqua dest.
- 0,9 ml Acrylamid 40%
- 0,6 ml 10-fach Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (10 x TBE)
- 100 µl Ammoniumpersulfat 10% (APS)
- 5 µl Tetramethyldiamin (TEMED)

Die Gelelektrophorese ist eine effektive Methode zur Trennung von Makromolekülen. Polyacrylamidgele haben eine definierte Porengröße, die durch netzartige Polymerisation des Acrylamid entstehen. Makromoleküle können dadurch vor allem nach ihrer Größe getrennt werden können, wobei die elektrische Beweglichkeit der zu trennenden Moleküle ebenfalls eine Rolle spielt.

3.2.4.1.1 DURCHFÜHRUNG PAGE

1. Zusammensetzen der Gelkammer
2. Ansatz der Gel-Reagenzien und der Proben mit 1µl 10 x Ladepuffer und 5µl PCR Produkt (siehe oben)
3. Gießen der Kammer und Einsetzen des Probenkamms
4. Beladen des Gels mit den Proben
5. Aufsetzen der Pufferkammer und Befüllen mit Puffer (1 x TBE)
6. Strom anlegen mit einer Spannung von 130 bis 140mV, einer Stromstärke von 400mA für 30 bis 40 Minuten
7. Färben mit Ethidiumbromid
8. Nachweis eventueller Banden mit einer speziellen Fluoreszenzkamera

3.2.4.2 SILBERGEL

Bei erfolgreich durchgeführter PCR sind Banden in dem Gel erkennbar, die sich mit Ethidiumbromid darstellen lassen. Anschließend folgt die so genannte Silbergel-Analyse (denaturierendes Acrylamidgel), um beide Allele darstellen zu können. Silbergele haben bessere Trenneigenschaften als Polyacrylamidgele aufgrund ihrer feineren Vernetzungsstruktur. 0,1µg Amplifikat ergeben erkennbare Banden bei Coomassie-Blue-Färbung und 0,02µg Amplifikat bei Silberfärbung. Die Proben werden bei 95°C denaturiert, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Das Gel wird aus folgenden Reagenzien hergestellt:

- 19,4ml Formamid
- 10,5ml Acrylamid (40%)
- 6,1 ml 10 x TBE-Puffer
- 24,6 ml Harnstofflösung
- 500 µl APS
- 50 µl Temed

3.2.4.2.1 DURCHFÜHRUNG SILBERGEL

1. Zusammensetzen der Gelkammer
2. Ansatz der Gel-Reagenzien (siehe oben)
3. Gießen der Kammer und Einsetzen des Probenkamms
4. Nach Auspolymerisierung des Gels Überführen in die Elektrophorese-Apparatur.
5. Befüllen der Pufferkammer
6. Entfernung des Probenkamms und anschließendes „Warmlaufen“ des Gels 30 bis 60 min.
7. Ansatz der Proben (3 µl Ladepuffer, 5 µl PCR-Produkt), anschließend denaturieren bei 95°C für 4 min.
8. Beladen des Gels mit den Proben
9. Das Programm wird gestartet mit einer Spannung von 3000 mV und einer Stromstärke von 400 mA für 1h45 min

3.2.4.2.2 FÄRBEN DES SILBERGELS

Zum Färben des Silbergels wird eine Kammerwand entfernt und ein Rahmen aufgesetzt. Danach wird das Gel wie folgt behandelt:

1. Gel kurz mit destilliertem Wasser spülen
2. Gel 5 min mit 10%igem Ethanol bedecken
3. Gel 3 min mit 1%iger Salpetersäure bedecken
4. Gel kurz mit destilliertem Wasser spülen
5. Gel 20 min mit 1%iger Silbernitratlösung bedecken
6. Gel 2 min mit destilliertem Wasser spülen
7. Mehrmals das Gel mit Natriumcarbonat-Formalin spülen, bis Banden zu erkennen sind
8. Gel 2 min mit 10%iger Essigsäure bedecken
9. Gel 2 min mit destilliertem Wasser spülen
10. Rahmen entfernen und Gel mit Papier (Vorderseite) und PE-Folie (Rückseite) bedecken
11. Trocknen des Gels in einem Geltrockenapparat ca. 60 min.

3.2.4.3 AUSWERTUNG

Das Prinzip der denaturierenden Gelelektrophorese beruht darauf, dass durch die Schmelzeigenschaften von doppelsträngiger DNA, deren Stränge sich nur in einem Basenpaar unterscheiden, sie sich leichter voneinander trennen lassen. Der Übergang von doppel- zur einzelsträngigen DNA ist in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgrund der schlechteren elektrophoretischen Laufeigenschaften der einzelsträngigen DNA gut zu verfolgen. Dazu wird ein Gel mit denaturierenden Eigenschaften verwendet, hier chemisch durch Harnstoff. Bei der Elektrophorese werden zwei ähnliche DNA-Stücke, in diesem Fall Mikrosatellit auf mütterlichem und Mikrosatellit auf väterlichem Allel, voneinander getrennt. Die Banden auf dem Silbergel liegen sehr dicht beieinander. Anhand eines standardisierten Markers kann die Länge der Amplifikate bestimmt werden.

Fehlt eine der Banden im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe, wird von einem *loss of heterozygosity* (LOH) gesprochen. Grundlage des Phänomens ist der Verlust des speziellen Genabschnitts durch Mutation im Verlauf der Karzinogenese. Hier können kleine Genabschnitte von wenigen Basen bis hin zu gesamten Chromosomen verloren gehen. LOH-

Analysen können nur sagen, dass ein Genverlust vorliegt, eine Aussage über den Mutationsstatus des verbleibenden Allels kann aber ohne weitere Analysen – wie z.B. eine Gensequenzanalyse – nicht gemacht werden. Eine Charakterisierung solcher Mutationen muss deshalb mit anderen Methoden z.B. Gensequenzierung vorgenommen werden. Die Diagnose eines LOH kann nur mit dem Vergleich möglichst reiner (homogener) Zellpopulationen gestellt werden. Ist ein Tumor mit einem großen Anteil Normalgewebe, z.B. Bindegewebe und Entzündungszellen durchsetzt, wird dadurch die Diagnose eines LOH erschwert oder unmöglich. Besitzen Normalzellen das fragliche verloren gegangene Allel und dieses wird in der PCR amplifiziert (mit einer Retention der Heterozygotität auf dem Silbergel) wäre das Ergebnis falsch negativ. Daher ist die Anwendung eines Laser-Mikrodissektions-Mikroskops von entscheidender Bedeutung zur Gewinnung möglichst homogener Zellpopulationen. In dieser Arbeit wird die Diagnose eines LOH erst gestellt, wenn die Intensität des verloren gegangenen Allels maximal 50% der Färbeintensität des Allels des Normalgewebes aufweist. Ferner müssen noch zwei weitere PCR unter gleichen Bedingungen dieses bestätigen.

Ein weiterer Problemfall in der Diagnostik einer LOH ist gegeben, wenn die Auftrennung der PCR-Produkte keine zwei eindeutig voneinander zu unterscheidende Allele ergibt. Dies ist z.B. der Fall, wenn sich die Länge beider Mikrosatelliten-Allele nicht oder nur unwesentlich voneinander unterscheidet. In diesem Fall gilt die Genlokalisierung als wenig polymorph und somit als nicht informativ. Diese Situation tritt häufig ein. In einem solchen Fall wird eine eng benachbart gelegene Genlokalisierung mit Hilfe eines alternativen Mikrosatelliten-Marker untersucht. Zur Absicherung der Ergebnisse folgt die statistische Auswertung der Daten. Dazu gehört die Errechnung des arithmetischen Mittels unter den Gesichtspunkten der verschiedenen Parameter wie Patienten, Gewebearten und Genen. Die Errechnung der Streuung S^2 ist wichtig, um alle Daten vergleichen zu können, da nicht alle Patienten den gleichen Untersuchungszeitraum besitzen. Die Wahrscheinlichkeit $p' = 50\%$ für die Ermittlung der Signifikanz der Daten gibt an, ab welchem Zeitpunkt 50% der Patienten ein bestimmtes Phänomen (z.B. Mutation eines Gens) aufweisen.

4. ERGEBNISSE

Während unseres Untersuchungsintervalls zwischen 3 und 51 Monaten wurden bei den 26 in dieser Studie eingeschlossenen Patienten zwischen 2 und 17 Endoskopien durchgeführt. Insgesamt resultierten hieraus 118 Gewebeproben, die jeweils in einem Gewebeblock untersucht wurden. Jedoch nur 110 dieser Proben enthielten ausreichend DNS-Material, um eine molekulargenetische Analyse durchzuführen.

Bei 46 endoskopischen Untersuchungen wurde die Länge der Barrett-Mucosa vom Untersucher angegeben. Lediglich in 2 Fällen wurde vom Untersucher angegeben, wie das histologische Material gewonnen wurde (z.B. Quadrantenbiopsien). Ebenso variierte die Anzahl der entnommenen Proben pro durchgeführter Endoskopie. Von den 118 in dieser Studie verarbeiteten Objektträgern, enthielten nur 64 (54%) 4 oder mehr Gewebeproben (Tabelle 3). 54 der 118 Objektträger enthielten entweder eine (13 Objektträger), zwei (14 Objektträger) oder drei (15 Objektträger) Gewebeproben. Nicht alle Gewebeproben, die von vermeintlichen Barrettzungen entnommen wurden, enthielten Gewebe mit Barrett-Mucosa. Im Durchschnitt fanden sich 3,8 Gewebeproben (1 bis 11 Gewebeproben) auf einem Objektträger. In der histologischen Aufarbeitung fanden sich pro Schnittpräparat durchschnittlich 2,7 Biopsiepartikel Barrett-Mucosa (1 bis 8 Biopsiepartikel). Der diagnostische Befund zu den Proben lautet:

26 x Normalgewebe

12 x Plattenepithel

56 x Barrett-Mucosa

13 x low-Grade-IEN

3 x Karzinomgewebe

Die Diagnose einer high-grade-IEN in der Erstprobe führte zum Ausschluss des Patienten. In die Studie wurden Biopsien mit der Diagnose einer low-grade-IEN und der Diagnose einer Barrettmetaplasie ohne Dysplasie aufgenommen. Als Normalgewebe (Kontrolle) dient Gewebe aus Magenbiopsien des gleichen Patienten oder, falls nicht vorhanden, Plattenepithel ohne Nachweis einer Barrett-Schleimhaut.

Tabelle 2: Gesamtübersicht der gewonnenen Mutationsdaten aller Patienten im zeitlichen Verlauf

Fall	Befunddatum	Material	Mikrosatellitenmarker					
			<i>P53</i>	<i>P16</i>	<i>APC</i>	<i>DCC</i>	<i>DPC4</i>	<i>Rb</i>
1	16.12.97	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
		Low-Grade- IEN	n	n	n	n	n	n
	29.06.98	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
		Low-Grade- IEN	n	LOH	LOH	n	n	n
	13.11.98	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	06.07.99	Barrettgewebe	n	n	LOH	n	n	n
		Low-Grade- IEN	n	LOH	n	n	n	n
	14.12.99	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	19.01.00	Normalgewebe	n	n	LOH	n	n	n
		Barrettgewebe	n	n	n	n	n	LOH
	25.05.00	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	25.08.00	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	28.11.00	Plattenepithel	n	n	n	n	n	n
		Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	05.03.01	Plattenepithel	n	n	n	n	n	LOH
		Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	09.07.01	Barrettgewebe	n	n	LOH	n	n	LOH
	21.01.02	Barrettgewebe	LOH	n	LOH	n	n	n
2	20.07.99	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n
		Low-Grade- IEN	n	n	n	n	n	n
	27.07.99	Karzinom	n	n	n	n	n	n.i.
	14.10.99	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n
	28.03.00	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n
	22.08.00	Normalgewebe	n	n	n.i.	n	n	n
	16.03.01	Plattenepithel	n	n	n	n	n	n
	18.12.01	Plattenepithel	n	n	LOH	n	n	n
3	09.04.97	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	01.10.97	Barrettgewebe	n	n	LOH	n	n	n
	10.02.98	Barrettgewebe	n	n	n	n	n.i.	n
	21.10.98	Barrettgewebe	n	n	LOH	n	n	n
	14.10.99	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n
	14.10.99	Barrettgewebe	n	LOH	LOH	n	n	n
	02.10.00	Low-Grade- IEN	n	n	LOH	n	LOH	n
	09.10.01	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
4	25.03.98	Barrettgewebe	n	n	LOH	n	n	n
	21.03.00	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n
	16.08.00	Plattenepithel	n	n	n	n	n	n
	25.10.00	Plattenepithel	n	n	n	n	n	n
	08.06.01	Plattenepithel	n	n	n	n	n	n
	30.10.01	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n
5	29.01.99	Barrettgewebe	n	n	LOH	n	n	n.i.
	20.10.00	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n.i.

	23.11.00	Barrettgewebe	n	n	n.d.	n	n	n
	26.10.01	Plattenepithel	n	n	n	n	n	n
	19.12.01	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
6	04.08.98	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	18.09.98	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n
		Barrettgewebe	n	n	n	n	n.i.	n
	10.01.00	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
7	07.05.98	Low-Grade-IEN	n	n	n	n	n	n
	13.09.00	Barrettgewebe	n	n	LOH	n	n	n
	04.01.01	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n
		Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
8	21.02.97	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n
	24.04.97	Normalgewebe	n.d.	n	n	n	n	n
		Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	30.10.97	Barrettgewebe	n.d.	n	LOH	n	n	n
	20.10.99	Barrettgewebe	LOH	n	LOH	n	n	n
9	23.01.98	Normalgewebe	LOH	n	n	n	n	n
	23.05.00	Barrettgewebe	n	n	LOH	n	n	n
	02.02.01	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
10	25.01.99	Barrettgewebe	n	n	LOH	n	n	n
	01.02.00	Barrettgewebe	n	LOH	LOH	n	n	n
	19.02.01	Normalgewebe	n	LOH	n	n	n	n
11	13.08.97	Barrettgewebe	n	LOH	LOH	n	n	n
	03.08.98	Barrettgewebe	n	n	LOH	n	n	n
	15.07.99	Barrettgewebe	n	LOH	LOH	n	n	n
		Low-Grade-IEN	n	n.i.	n	n	n	n
12	10.02.99	Barrettgewebe	LOH	n	n	n	n.i.	MSI
	31.01.01	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	MSI
	14.01.02	Normalgewebe	n	n	n	n	n	MSI
		Barrettgewebe	LOH	n	n	n.i.	n	MSI
13	16.10.98	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	16.10.01	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n
		Low-Grade-IEN	n	n	n	n	n	n
14	05.09.01	Normalgewebe	n	n	n	n	n.d.	n
		Plattenepithel	n	n	LOH	n	n	n
		Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	13.09.01	Low-Grade-IEN	n	n	n	n	n	n
	17.09.01	Barrettgewebe	n	n	n	n	n.d.	n
15	09.11.99	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	23.11.99	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n
	20.11.00	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	18.01.02	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
16	14.02.00	Barrettgewebe	n	n	LOH	n	n	n.i.
	19.06.01	Normalgewebe	n	n	LOH	n	n	n.i.
		Barrettgewebe	n	n	LOH	n	n	n
17	15.02.00	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	28.08.00	Normalgewebe	n	n	LOH	n	n	n
		Barrettgewebe	n	n	LOH	n.d.	n	n
18	31.03.00	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n

		Barrettgewebe	n	n	LOH	n	n	n
	28.04.00	Barrettgewebe	n	n	LOH	n.d.	n	n
19	02.09.98	Barrettgewebe	n	MSI	n	n	n	n
	28.02.00	Plattenepithel	LOH	MSI	n	n	n	n
		Barrettgewebe	LOH	MSI	LOH	n	n	n
20	02.06.99	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n.d.
	18.10.99	Barrettgewebe	n	n	LOH	n.d.	n	n
21	09.07.98	Plattenepithel	n	LOH	n.d.	n	n	n
		Low-Grade- IEN	n	n	LOH	n	n	n
	16.10.98	Plattenepithel	LOH	n.d.	LOH	n	n.d.	n
		Low-Grade- IEN	LOH	LOH	n	n	n	n
22	10.04.00	Normalgewebe	n	HD	LOH	n	HD	n
		Karzinom	n	HD	LOH	n	HD	n
23	31.01.01	Barrettgewebe	n	n	LOH	MSI	n	n
	12.09.01	Normalgewebe	n	n	n	MSI	n	n
		Barrettgewebe	LOH	n	LOH	MSI	n	n
		Karzinom	n	n	LOH	MSI	n	n
24	12.09.01	Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
	07.12.01	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n
		Barrettgewebe	n	n	n	n	n	n
25	06.05.02	Normalgewebe	n	n	n	n	n.i.	n
		Low-Grade- IEN	n	n	n	n	n.i.	n
26	02.05.01	Normalgewebe	n	n	n	n	n	n
		Low-Grade- IEN	n	n	n	n	n	n
	20.11.01	Barrettgewebe	n	n	n	n.d.	n	n.i.

Tabelle 3: Anzahl der Gewebeproben pro Objektträger und Endoskopie

	Gewebeproben pro Objektträger			
	1	2	3	4 oder mehr
Anzahl der Proben gesamt	13(11%)	16(13,6%)	25(21,2%)	64(54,2%)
Proben mit Barrett-Mucosa pro Objektträger	8(6,8%)	8(6,8%)	10(8,5%)	49(41,5%)

Tabelle 4: Akkumulation der Mutationen im zeitlichen Verlauf

PN	Überwachsungszeitraum in Monaten																
	0	3-5	6-8	9-11	12-14	15-17	18-20	21-23	24-26	27-29	30-32	33-35	36-38	39-41	42-44	45-47	48-51
1	N		APC p16		N		APC p16	N	APC Rb		N	N	Rb	N	APC Rb	N	APC p53
2	N	N			N	N	N	N		APC							
3	N	APC		N			APC		N	N	APC p16				APC DPC4		N
4	N		APC					N		N	N	N					
5	N		APC				N				N	N	N				
6	N						N										
7	N									APC		N					
8	N		APC								APC p53						
9	p53									APC				N			
10	APC		N		APC p16				p16								
11	APC p16			APC				APC p16									
12	p53							N			p53		N				
13	N												N				
14	APC						N										
15	N							N		N							
16	APC					APC											
17	N	N	APC														
18	APC	N															
19	N					APC p53	N										
20	N	APC															
21	APC p16	APC p16 p53															
22	N																
23	APC	N	APC p53 DPC4														
24	N	N															
25	N																
26	N			N													

Loss-of Heterozygosity-(LOH)-Daten der 26 Patienten

Die Tabellen 2-4 zeigen die molekulargenetischen Daten der Gewebeproben, die den 26 in dieser Studie eingeschlossenen Patienten entnommen wurden. Der individuelle Untersuchungszeitraum variierte zwischen 3 und 51 Monaten. Von 2 Patienten lagen Follow-up-Daten über einen Zeitraum von mehr als 39 Monaten vor.

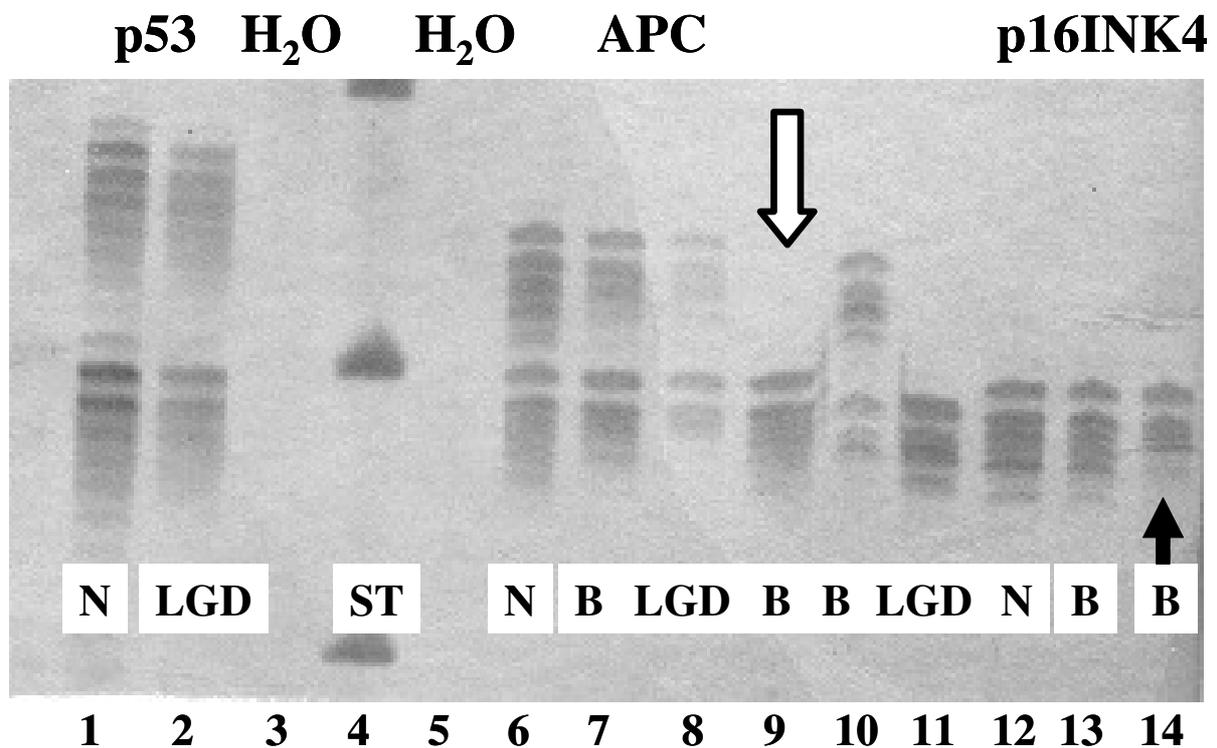


Abb 15.: Beispiel Silbergel

Die LOH-Daten aller getesteten Mikrosatellitenmarker sind in Tabelle 2 zusammengefasst und exemplarisch in Abbildung 16 demonstriert.

Sechs der 26 Patienten (23%) zeigten im gesamten Untersuchungszeitraum kein LOH der untersuchten Mikrosatellitenmarker. Im Verlauf der individuellen Untersuchungsintervalle war LOH des *APC*-Gens (Tab. 4) die häufigste genetische Aberration (19 von 26 Patienten) gefolgt von LOH des *p16^{INK4}*-Gens und des *p53*-Gens (7 von 26 Patienten). LOH des *DPC4*-Gens zeigte sich bei 2 von 26 Patienten und LOH des *Rb*-Gens bei einem der 26 Patienten. 19 Patienten (73%) zeigten mehrere LOH in bis zu 3 Mikrosatellitenmarkern (Tab. 4 und Abb. 16).

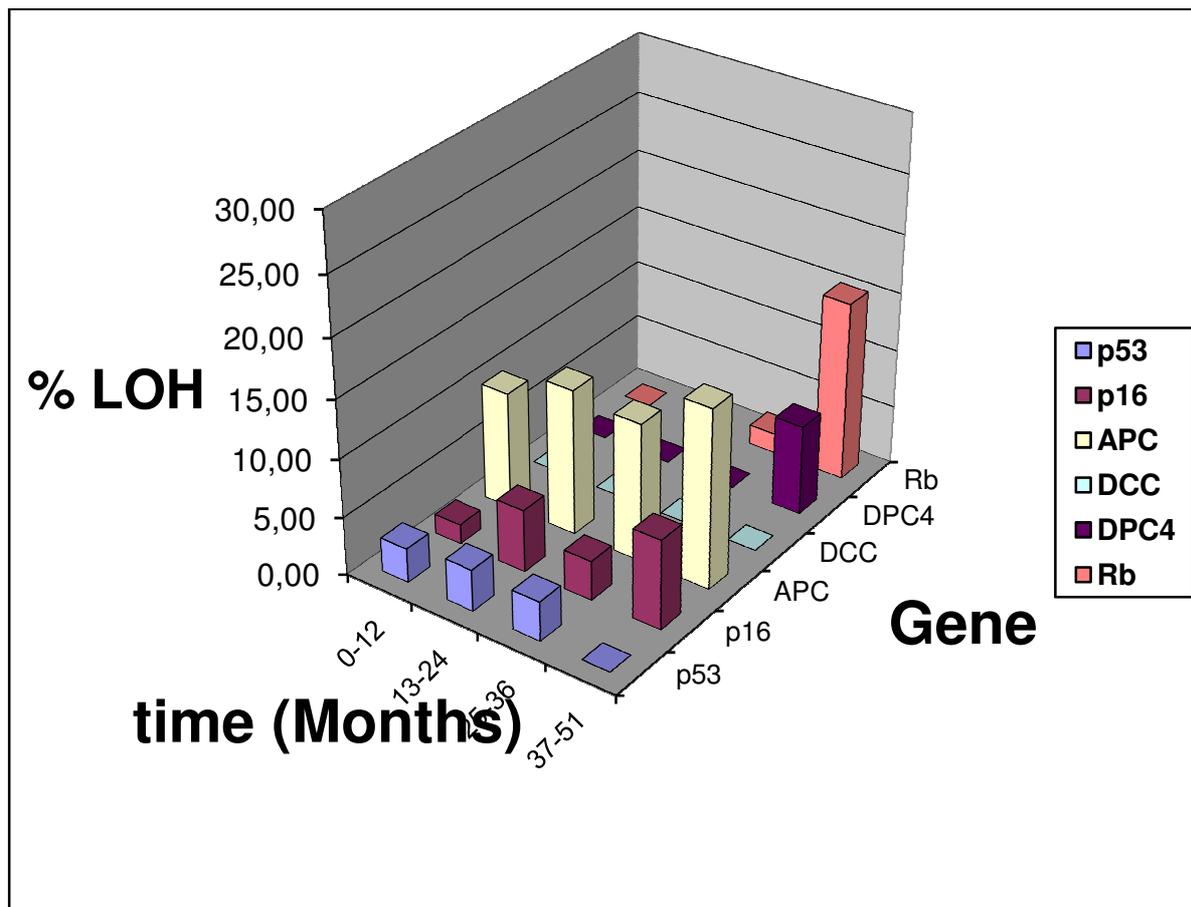


Abb.16: LOH der einzelnen Tumorsuppressorgene im Verlauf des Studienintervalls

Die häufigste Kombination von LOH war *APC/p16^{INK4}* (9 Gewebeproben) gefolgt von *APC/p53* (5 Gewebeproben). Die Kombination von *APC/DPC4* und *APC/Rb* erschien nur einmal. *APC* ist der einzige Mikrosatellitenmarker, der in allen detektierten LOH-Kombinationen nachweisbar war.

Ein Patient zeigte LOH des *p16^{INK4}*-Gens oder des *Rb*-Gens im Barrett-Mucosa umgebenden Normalgewebe. Sechs Patienten zeigten im Normalgewebe LOH des *APC*-Gens und 2 Patienten LOH des *p53*-Gens. LOH des *DPC4*- oder des *DCC*-Gens im Normalgewebe fand sich bei keinem Patienten.

Von den 19 Patienten mit LOH eines beliebigen Mikrosatellitenmarkers fand sich eine große Bandbreite der LOH-Ergebnisse. Ebenso zeigten im Rahmen der gesamten Untersuchung zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten die einzelnen Mutationen eine sehr heterogene Präsenz im Biopsiematerial (Tab. 4). Zum Beispiel zeigt Patient Nummer 3 LOH des *APC*-Gens bei 4-6 Monaten. Im Zeitraum von 9-12 Monaten erscheint jedoch kein LOH mehr. Dagegen zeigen die Proben zwischen 19 bis 21 Monaten, 31 bis 33 Monaten und 43 bis 45 Monaten wieder LOH des *APC*-Gens. Dazwischen kann LOH des *APC*-Gens in den

Intervallen 25-27 Monate und 28-30 Monate nicht mehr nachgewiesen werden. Zusätzlich ändert sich das Spektrum der begleitenden Mutationen im Zeitraum 31-33 Monate (zusätzlich LOH des *p16^{INK4}*-Gens) und 43-45 Monate (zusätzlich LOH des *DPC4*-Gens, kein LOH des *p16^{INK4}*-Gens mehr nachweisbar). Eine weitere Variation der LOH-Ergebnisse erscheint bei Patient Nummer 10. Ein initial gefundenes LOH des *APC*-Gens kann im Zeitraum zwischen 7 und 9 Monaten nicht mehr nachgewiesen werden. Gleichwohl findet sich wieder LOH des *APC*-Gens zwischen 13 und 15 Monaten, begleitet von LOH des *p16^{INK4}*-Gens. Im weiteren Verlauf des Untersuchungszeitraums des Patienten lässt sich keine weitere LOH des *APC*-Gens finden. Im Zeitraum zwischen 25-27 Monaten findet sich jedoch wieder LOH des *p16^{INK4}*-Gens.

Eine Mikrosatelliteninstabilität fand sich in den Proben von 3 Patienten. Im Gegensatz zur LOH zeigte sich die Mikrosatelliteninstabilität durchweg konstant in den weiteren Follow-up-Biopsien der einzelnen Patienten.

Zwei Patienten (Patienten Nummer 22 und 23, Tab. 2) entwickelten in dem kurzen Intervall zwischen 3 und 6 Monaten ein Adenokarzinom. Beide Patienten wiesen eine LOH des *APC*-Gens und zusätzlich entweder des *p53*-Gens, des *p16^{INK4}*-Gens oder des *DPC4*-Gens, dieses weist hier eine homozygote Deletion an 2 Loci auf.

Werden alle Patienten zusammengefasst, fällt ein minimaler Anstieg der LOH-Ereignisse im Verlauf der Untersuchungszeitraums auf, gleichwohl dieser Anstieg nicht signifikant ist ($p > 0,05$) (Abb. 17).

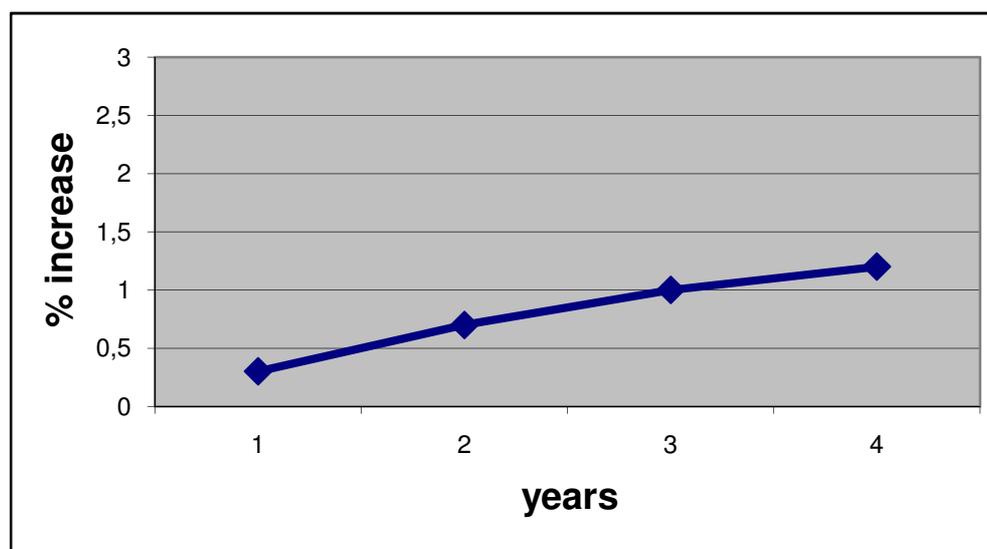


Abb.17: Prozentualer Anstieg der LOH-Ereignisse der 26 Patienten im Studienverlauf

5. DISKUSSION

In den letzten Jahren sind mehrere Studien veröffentlicht worden, die den Ursprung der Barrett-Mucosa und die molekulargenetischen Veränderungen, die während der Transformation der Barrett-Mucosa zum Adenokarzinom auftreten, adressiert haben. Trotz allem hat man bis heute kein histomorphologisches oder molekulargenetisches Kriterium etablieren können, welches verlässlich das Entstehen eines Barrettkarzinoms auf dem Boden der Barrett-Mucosa vorhersagen kann. Besonders Patienten mit einer Barrett-Mucosa ohne Nachweis einer IEN oder mit einer low-grade-IEN, die zu einem Adenokarzinom entarten kann, können bis heute nicht sicher erkannt werden. Gerade diese Patienten könnten bei erhöhtem Risiko durch engmaschigere Kontrolluntersuchungen bzw. frühzeitige chirurgische Intervention eine wesentlich bessere Prognose erreichen. Bei geringerem Risiko wiederum könnten die Kontrollintervalle ausgeweitet werden (Alikhan et al., 1999). Reid et al. schreiben in diesem Zusammenhang auch, dass Patienten mit einer high-grade-IEN in spezialisierten Zentren betreut werden sollten. Hier können besonders Barrett-erfahrene Endoskopiker, Pathologen und Chirurgen in einem engen interdisziplinären Dialog die weitere Vorgehensweise individuell und fallbezogen diskutieren (Reid et al., 2000). Ein Aspekt, der bei der Erforschung der Barrett-Mucosa bis dato erstaunlich wenig Aufmerksamkeit erhalten hat, ist die Analyse der molekulargenetischen Veränderungen, welche bei Gewebeproben im Verlauf von Kontroll-Endoskopien einzelner Patienten auftreten können (Barrett et al., 1996; Reid et al., 2000; Maley et al., 2004).

Bian et al. (2000) untersuchten in einem longitudinalen Studienaufbau 30 Patienten mit einer Ösophagusresektion aufgrund eines Barrettkarzinoms retrospektiv. Sie konnten keine Korrelation zwischen der Häufigkeit einer p53-Mutation und einer reduzierten Überlebensrate der Patienten feststellen. Auffallend erschien jedoch, dass eine Mutation im p53-Locus häufig beim Progress einer low-grade-IEN in eine high-grade-IEN zu beobachten war (Bian et al., 2001).

Eine prospektive Analyse von 48 Patienten im Rahmen von Kontrollendoskopien bei Barrett-Ösophagus führten Dolan et al. (2003) durch. Sie konnten die LOH eines bestimmten Mikrosatellitenmarkers des p53-Gens zur signifikanten Vorhersage eines erhöhten Karzinomrisikos identifizieren. Die Mutationsanalyse wurde hier jedoch nur bei der initialen Biopsie durchgeführt. Der weitere Verlauf und das Outcome der Patienten wurde nur klinisch beobachtet (Dolan et al., 2003).

Fang et al. (2004) führten eine retrospektive Verlaufsbeobachtung an archivierten Gewebeproben von Patienten mit Barrett-Ösophagus per zytometrischer DNA-Analyse durch. Sie konnten feststellen, dass eine DNA-Abnormalität in Form einer Aneuploidie ein sensitiverer Marker im Vergleich zu einer high-grade-EIN, um Patienten mit erhöhtem Karzinomrisiko zu erkennen (Fang et al., 2004).

Um die molekulargenetischen Veränderungen der bekannten Tumorsuppressorgene in der Barrett-Mucosa zu bestimmen, beobachteten wir das Auftreten von Deletionen dieser Gene in der Barrett-Mucosa in einer Serie von 26 Patienten, welchen im Rahmen einer Serie von Kontrollendoskopien regelmäßig Gewebeproben entnommen wurden. Die Entnahmeintervalle reichten von 6 bis zu 51 Monaten. Wir nahmen an, dass die Analyse der LOH bestimmter Tumorsuppressorgene über einen definierten Zeitraum helfen könnte eine Gruppe von Markern zu finden, welche ein erhöhtes Risiko einer neoplastischen Transformation bei Patienten mit Barrett-Mucosa ohne Dysplasie oder einer low-grade-IEN vorhersagen können. Unsere Studie ergab, dass eine LOH des *APC*-Gens am häufigsten auftritt, gefolgt von einer LOH des *p16^{INK4}*- und des *p53*-Gens. Veränderungen dieser Tumorsuppressorgene in der Barrett-Mucosa wurden in anderen Studien ebenfalls festgestellt (Barrett et al., 1996; Souza et al., 2001). Galipeau et al. untersuchten 61 Patienten mit einer high-grade-IEN auf LOH der *p16^{INK4}*- und *p53*-Gene. Ihre Ergebnisse ließen vor allem bei gleichzeitigem Auftreten der Mutationen auf ein erhöhtes Karzinomrisiko schließen. Sie stellten auch fest, dass LOH des *p16^{INK4}*-Gens im Verlauf zeitlich früher auftritt als LOH des *p53*-Gens (Galipeau et al., 1999). Diesen Umstand erkannten auch Wong et al. in ihrer Untersuchung und stellten die Hypothese auf, dass solche *p16^{INK4}*-Mutationen, die im Sinne einer klonalen Expansion weitläufig in der Barrett-Mucosa zu finden sind, eine Rolle als Wegbereiter anderer Genomveränderungen spielen könnten (Wong et al., 2001).

Ergänzend muss allerdings gesagt werden, dass die meisten dieser Studien nicht prospektiv angelegt waren.

Des Weiteren ergab die Untersuchung in unserem Biopsiematerial, dass die Tumorsuppressorgene *Rb*, *DCC* und *DPC4* nur selten Mutationen aufwiesen, was dadurch zu erklären ist, dass Mutationen dieser Gene vornehmlich beim Übergang zur high-grade-IEN oder zum Adenokarzinom zu finden sind und diese Läsionen in unserer Studie deutlich unterrepräsentiert sind. Zusätzlich scheint eine Inaktivierung des *DPC4*-Gens durch Mutation im Verlauf der Karzinogenese das Barrett-Adenokarzinoms keine wesentliche Rolle zu spielen, da andere Studien keine Mutationen in der Sequenzanalyse der Barrett-Mucosa und

des Adenokarzinoms detektieren konnten (Riegmann et al., 2001; Romagnoli et al., 2001; Souza et al., 2001; Barrett et al., 1996).

Ein interessanter Punkt ist die Kombination mehrerer LOH-Ereignisse bei einem Teil unserer untersuchten Patienten. LOH des *APC*-Gens ist hierbei immer als ein Teil einer solchen LOH-Kombination zu finden. Boynton et al. (1992) untersuchten eine LOH des *APC*-Gens von Ösophaguskarzinomen anhand von 30 Präparaten nach Ösophagusresektion. Sie konnten zeigen, dass LOH im *APC*-Locus in 77 % aller Ösophaguskarzinome auftraten. Jedoch handelte es sich bei den von Boynton untersuchten Karzinomen nicht nur um Adenokarzinome (18), sondern auch um Plattenepithelkarzinome (19), die nicht mit der Barrett-Mucosa assoziiert sind (Boynton et al., 1992).

Da Veränderungen des *APC*-Gen sehr früh in der neoplastischen Entwicklung der Barrett-Mucosa auftreten, kann angenommen werden, dass Kombinationen mehrerer LOH, insbesondere *APC/p16^{INK4}* oder *APC/p53*, ein erhöhtes Risiko für ein neoplastisches Fortschreiten in der Barrett-Mucosa bei einem Teil der Patienten anzeigen können. Eine Studie von Maley et al. aus dem Jahre 2004 hat bereits gezeigt, dass Veränderungen der Gene *p16^{INK4}* und *p53*, insbesondere wenn sie in Kombination mutiert sind, zusammen mit chromosomaler Ploidie eine Entwicklung zum Adenokarzinom anzeigen (Maley et al., 2004). Diesbezüglich sollten größere Kohorten von Patienten über einen noch größeren Zeitraum untersucht werden, um diese Hypothese zu stützen. Insbesondere wäre ein längerer Zeitraum von Bedeutung, da in unserer Studie ein statistisch signifikanter Anstieg der Mutationen während des Untersuchungszeitraums nicht gefunden werden konnte.

Obwohl das Untersuchungsintervall einiger unserer Patienten in dieser Studie relativ kurz ist, scheint ein interessantes Ergebnis dieser Studie zu sein, dass LOH-Ereignisse, die in vorhergehenden Biopsien nachgewiesen wurden, in den Follow-Up-Untersuchungen nicht mehr auftraten. Zusätzlich verschwanden LOH-Kombinationen in Follow-Up-Untersuchungen oder die verschiedenen LOH-Kombinationen wechselten. Mindestens eines dieser Phänomene fand sich bei allen Patienten, die im Untersuchungsverlauf eine LOH aufwiesen. Diese Ergebnisse erheben einige wichtige Fragen über (1) die Technik der endoskopischen Probengewinnung und die klinischen Angaben des Untersuchers, (2) über die in dieser Studie angewandten molekulargenetischen Analyseverfahren und durchgeführte Probenverarbeitung und (3) über die Heterogenität der Mutationen in der Barrett-Mucosa.

Fehler, die während der Probengewinnung auftreten, stellen die Hauptursache für das Übersehen eines kleinen dysplastischen Fokus oder sogar eines kleinen Adenokarzinoms dar. Um diese Fehler zu minimieren, wurden von der International Society for Diseases of the Oesophagus Leitlinien zur Handhabung der Überwachung und Probengewinnung bei der Diagnose des Barrett-Ösophagus erstellt. Diese Empfehlung sieht vor, dass die Barrett-Mucosa - insbesondere hinsichtlich einer nicht optimalen Trefferquote von Barrett-Mucosa bei mehreren Biopsien und der häufig geringen Anzahl der entnommenen Biopsien - über ihre gesamte Länge in 2 cm-Intervallen per Quadrantenbiopsie untersucht werden sollte (Stein, 1996). Angesichts der Ergebnisse unserer Studie sollte diese Empfehlung ausgeweitet werden, besonders in Anbetracht der anzunehmenden Verbesserung der genetischen Analysen der Gewebeproben in näherer Zukunft.

Andere Studien haben bereits darauf hingewiesen, dass zur Probengewinnung so genannte Jumbo-Forceps eingesetzt werden sollten. Hierbei handelt es sich um Biopsiezangen, die pro Biopsie etwa doppelt so viel Gewebe entnehmen als die sonst üblichen Biopsiezangen. Levine et al. (1993) haben in einem Vergleich zwischen endoskopisch überwachten und radikal chirurgisch therapierten Patienten mit high-grade-IEN oder Adenokarzinom ein striktes Biopsie-Protokoll mit Jumbo-Forceps festgelegt. Die Studie zeigte, dass alle potentiell chirurgisch zu behandelnden Patienten erkannt werden konnten. Auch Patienten, bei denen trotz bestehender high-grade-IEN keine chirurgische Resektion durchgeführt werden musste, konnten mit diesem Protokoll erkannt werden (Levine et al., 1993). Reid et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Biopsie-Intervalle auf 1 cm reduziert werden sollten. Sie untersuchten 45 Patienten mit high-grade-IEN im Rahmen der Kontrollendoskopien mit 4-Quadranten-Biopsien in einem 1 cm-Intervall. Alle weiteren makroskopisch auffälligen Befunde wurden ebenfalls biopsiert. Auch hier wurden die Jumbo-Forceps mit einer so genannten ‚turn-and-suction‘-Technik eingesetzt. Diese Methode der Probengewinnung sorgt für ein größeres Gewebsvolumen als die sonst übliche Technik. Erstaunlicherweise fanden sich 82 % der entdeckten Karzinome in einem einzigen 1-cm-Intervall. 69 % der Karzinome waren sogar nur in einer einzigen Gewebeprobe nachweisbar. 30 der 45 Patienten wiesen ein Karzinom auf, obwohl die Schleimhaut, abgesehen von der Barrett-Mucosa, endoskopisch unauffällig war. Von diesen 30 Patienten war bei neun das Karzinom nur in einer so genannten ‚gezielten Biopsie‘ eines auffälligen Areals aufgetreten. Nun verglichen die Autoren diese Ergebnisse mit einem 2 cm-Intervall Protokoll, das aus dem ursprünglichen Protokoll konstruiert wurde. 50 % der im 1 cm-Intervall gefundenen Karzinome wären laut dieser Studie in dem 2 cm-

Intervall übersehen worden (Reid et al., 2000). Falk bezeichnet diese standardisierte Untersuchungsmethode als das ‚Seattle‘-Protokoll (Falk, 2002).

Allerdings erscheint das Umsetzen dieser Empfehlung in den klinischen Alltag schwierig. Das oben genannte Protokoll ist sehr zeitaufwendig und erzeugt eine große Menge an Gewebeproben. Diese müssen dann in sehr zeit- und kostenintensiven Verfahren aufgearbeitet werden. Des Weiteren werden für dieses Protokoll größere Endoskope benötigt, die eine Sedierung des Patienten während der Untersuchung notwendig machen. Auch die Kosten durch erhöhten Personal- und Raumbedarf für die postinterventionelle Beobachtung dürfen nicht vernachlässigt werden.

Nichtsdestotrotz verhindert eine zu kleine Anzahl an Biopsien nicht nur eine genaue molekulargenetische Analyse, sie erhöht auch die Wahrscheinlichkeit, kleine Areale der Schleimhaut zu verpassen, auf denen eine neoplastische Transformation zu einer high-grade-IEN oder sogar zu einem Adenokarzinom stattgefunden hat. Diese Annahme wird von der Studie von Cameron et al. (1997) unterstützt. Sie hatten die Präparate von Patienten nach Ösophagusresektion aufgrund einer high-grade-IEN oder eines Adenokarzinoms ohne Nachweis endoskopisch sichtbarer Läsionen untersucht. Die durchschnittliche Fläche der Barrett-Mucosa auf der Ösophagusschleimhaut betrug 32 cm^2 , die Fläche einer low-grade-IEN 13 cm^2 , high-grade-IEN $1,3 \text{ cm}^2$ und eines Adenokarzinoms nur $1,1 \text{ cm}^2$. Die 3 kleinsten Karzinome wiesen nur eine Fläche $0,02$, $0,3$ und $0,4 \text{ cm}^2$ auf. Die Autoren zeigten, dass das übliche Protokoll mit Quadrantenbiopsien im 2 cm-Intervall nicht ausreicht um alle Läsionen, mit high-grade-IEN und Adenokarzinomen zu entdecken (Cameron et al., 1997). Die Ergebnisse unserer Studie unterstützen diese Hypothese, besonders in Anbetracht der reduzierten Qualität der Probengewinnung in knapp 50 % der durchgeführten Kontrollendoskopien.

In der Zeit der evidenzbasierten Medizin wurde in dem oben genannten Zusammenhang bisher gesagt, dass bei den meisten Patienten mit Barrett-Ösophagus aufgrund der Komorbidität und des fortgeschrittenen Lebensalters eine radikalen Ösophagusresektion nicht mehr durchgeführt wird. Ein entsprechendes Überwachungsregime mit regelmäßigen Endoskopien und kostenintensiven Laboruntersuchungen wäre im Sinne der Kosteneffektivität nicht angezeigt. Van der Burgh et al. (1996) untersuchten in ihrer Studie eine Kohorte von 150 Patienten mit der Diagnose eines Barrett-Ösophagus. In dem durchschnittlichen Untersuchungszeitraum von 9,3 Jahre starben 79 der 150 Patienten. Nur

fünf dieser 79 Patienten haben im Verlauf ein Ösophaguskarzinom entwickelt und nur bei 2 dieser fünf Patienten stellte es die unmittelbare Todesursache dar. Die von van der Burgh et al. untersuchte Kohorte hätte von einem kontrollierten Überwachungsprogramm nicht profitiert (Van der Burgh et al., 1996).

Bei vielen Patienten mit Adenokarzinomen wird aufgrund des fortgeschrittenen Lebensalters eine Ösophagusresektion nicht mehr durchgeführt, da es sich um eine sehr belastende Operation mit hoher perioperativer Komplikationsrate handelt. Diese Patienten müssten bei nicht vorhandener therapeutischer Konsequenz aus einem kontrollierten Überwachungsprogramm herausgenommen werden. Hier zeigt jedoch die neuere Entwicklung der Schleimhautablationstechniken große Fortschritte, so dass auch für diese Patientengruppe ein kurativer Therapieansatz möglich ist. Insgesamt zeigen diese strikten Untersuchungsprotokolle durchaus eine Berechtigung, müssen allerdings in zukünftigen Studien noch verifiziert werden.

Allerdings ist nicht nur die schiere Anzahl der Biopsien für eine genaue Untersuchung der Barrett-Mucosa entscheidend, sondern auch die Anzahl der Proben, die auch wirklich Barrett-Mucosa enthalten. Nur 44,16 % der in unserer Studie untersuchten Biopsien enthielt auch wirklich Barrett-Mucosa. Ob die Adenokarzinome zweier unserer Studienpatienten mit diesem Protokoll früher hätten gefunden werden können, bleibt eine Spekulation. Gleichwohl beschreiben Reid et al. (2000) in ihrer Studie, dass 100 % aller Adenokarzinome durch das Benutzen der Jumbo-Forceps in einem Biopsieintervall von 1 cm entdeckt werden konnten (Reid et al., 2000). Zusätzlich zur reduzierten Qualität der Probengewinnung müssen auch die molekulargenetischen Analysemethoden kritisch betrachtet werden. Erscheinen doch in den verschiedenen Kontrollintervallen stark unterschiedliche Ergebnisse in den genetischen Analysen. Als mögliche Fehlerquelle können kleine, nicht erfasste dysplastische Areale während der Laser-Mikrodissektion in Betracht kommen. Außerdem könnten die dissezierten Gewebestücke zu klein gewählt sein, obwohl Studien bereits gezeigt haben, dass die Laser-Mikrodissektion die Sensitivität einer molekulargenetischen Analyse deutlich verbessern kann. Heinmöller et al. (2001) zeigten in ihrer Studie die Überlegenheit der lasergestützten Mikrodissektion im Vergleich zur Immunhistofärbung anhand der Mikrosatelliteninstabilitäten bei HNPCC. Dort hätte eine Diagnostik nur mit immunohistochemischer Färbung ein falsch-negatives Ergebnis für die Mikrosatelliteninstabilität geliefert (Heinmöller et al., 2001). Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Laser-Mikrodissektion-induzierte Veränderungen zu verhindern, wurden in

unserer Studie die Biopsien mehrerer Areale in einem einzelnen Teströhrchen zusammengeführt. Ein weiterer Grund für mögliche divergierende Ergebnisse ist die PCR-Amplifikationstechnik bei kleinen Gewebstücken, besonders wenn vor der spezifischen PCR-Amplifikation das gesamte Genom im ersten Schritt vervielfältigt wird. Andererseits haben mehrere Studien gezeigt, dass ein solches Vorgehen eine sichere Methode ist, wenn sie korrekt durchgeführt wird (Dietmaier et al., 1999; Heinmöller et al., 2002).

Nicht nur Probengewinnung und Weiterverarbeitung können die molekulargenetische Analyse beeinflussen, ein weiterer Grund ist die *in vivo*-Biodynamik der Barrett-Mucosa. Neuere Studien haben gezeigt, dass es bei ca. 60 – 65 % der Fälle zu einer Rückbildung der Dysplasie bei Patienten mit initialer Diagnose einer low-grade-IEN kam. In der Studie von Weston et al. (2001) zeigten von den 48 Patienten mit einer low-grade-IEN 31 im Verlauf der Studie eine Regression zu einer reinen intestinalen Metaplasie (Weston et al., 2001). Auch bei Skacel et al. (2000) bildete sich bei 15 der 43 Patienten die initiale low-grade-IEN zurück (Skacel et al., 2000). Die verbleibenden Patienten zeigen eine persistierende low-grade-IEN oder eine Transformation zu einer high-grade-IEN oder einem Adenokarzinom.

Weiterhin kann es während der mehrstufigen Karzinogenese zu einem Prozess der Selektion und Expansion von Zellklonen kommen, welcher in der Barrett-Mucosa zu verschiedenen großen Gebieten führen kann, die unterschiedliche Zellpopulationen mit unterschiedlichen Mutationen aufweisen (Wong et al., 2001).

Galipeau et al. (1999) untersuchten 404 Biopsien von 61 Patienten mit einer high-grade-IEN auf LOH von p16 und p53. Sie fanden vor allem im p16-Genlocus ein Mosaik an Klonen und Subklonen großflächig über die Barrett-Mucosa verteilt, sogar in Arealen, die keine wesentlichen dysplastischen epithelialen Veränderungen aufwiesen. Veränderungen im p53-Genlocus traten in dieser Studie deutlich seltener auf (Galipeau et al., 1999).

In einer ähnlichen Studie zeigten Prevo et al. (1999), dass verschiedene p53-Mutationen in der Barrett-Mucosa bei ca. 50 % der Patienten mit einer high-grade-IEN zu finden waren. Auch hier waren die verschiedenen Zellklone auf große Flächen der Barrett-Mucosa verteilt.

Beide Autoren stellen die Hypothese auf, dass die klonale Expansion als Wegbereiter weiterer Mutationen dient und dass dieser Prozess nach gewisser Zeit in der Entstehung des Adenokarzinoms kulminiert (Galipeau et al., 1999; Prevo et al., 1999).

Maley et al. (2004) aus dem gleichen Autorenteam stellen in ihrer Studie sogar fest, dass die Kombination aus der klonalen Expansion und der Anzahl der verschiedenen Zellklone eine

bessere Vorhersage zum Karzinomrisiko treffen können als jeder dieser Werte für sich allein (Maley et al., 2004).

In unserer Studie führte eine Kombination aus der zu geringen Anzahl an Gewebeprobe, verschiedenen mutierten Klonen und das Phänomen der regressiven Veränderungen der mutierten Zellpopulationen zu oft nicht reproduzierbaren und teilweise divergierenden LOH-Ergebnissen. Es ist denkbar, dass eine solche Kombination möglicher Fehlerquellen bereits in einer signifikanten Anzahl weiterer Studien, in denen zahlreiche histomorphologische, immunhistochemische und/oder molekulargenetische Analysen der Barrett-Mucosa durchgeführt wurden, zu verfälschten Ergebnissen geführt hat.

Ein Ziel unserer Studie war es einen Biomarker zu finden, der eine neoplastische Transformation der Barrett-Mucosa ohne IEN oder mit einer low-grade-IEN vorhersagen kann. Wie in Tabelle 4 und Abbildung 17 zu sehen, war unser Untersuchungszeitraum zu kurz gewählt, um verlässliche Daten diesbezüglich zu extrahieren. Des Weiteren ist die Anzahl der untersuchten Patienten in unserer Studie nicht groß genug, obwohl den Kombinationen verschiedener LOH – besonders APC/p16^{ink4} oder APC/p53 – als Biomarker in zukünftigen Studien eine erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte. Entscheidend jedoch für die inkonstanten und negativen Ergebnisse dieser Studie ist sehr wahrscheinlich die in knapp 50 % der Fälle vorliegende reduzierte Qualität der Probengewinnung.

Ein wesentliches Ergebnis der systematischen Aufarbeitung unserer Gewebeprobe ist, dass bei Kontrollendoskopien bei bekannter Barrett-Mucosa eine Probengewinnung in Form von Quadrantenbiopsien in 1 cm- Intervallen und, wenn möglich, mit Jumbo-Forceps in der so genannten ‚turn-and-suction‘-Technik durchgeführt werden sollte. Weiterhin sollten alle makroskopisch auffälligen Areale großzügig mitbiopsiert werden. Dieses Protokoll ist Voraussetzung für eine verlässliche molekulargenetische Analyse der Gewebeprobe, um wichtige Fragen bezüglich der Biodynamik der epithelialen Zellklone zu beantworten. Zusätzlich sollte dieses Protokoll auch bei zukünftigen Studien angewandt werden, die den Vorhersagewert von Biomarkern untersuchen möchten.

Für die kommenden Jahre kann man erwarten, dass die molekularen Analysen der Mutationen in Tumoren eine Einteilung der Malignome in therapeutisch relevante präzisere Subgruppen erlauben wird, als es heute durch die histologische Klassifizierung möglich ist, und so die Bildung von Subgruppen mit besonders schlechter oder guter Prognose ermöglicht. Es besteht

die Aussicht, in Zukunft detaillierte molekulare „Fingerprints“ jedes Tumors zu erhalten und möglichst umfassend Informationen über seine Biologie bereitzustellen.

Die Fähigkeit, Krebs susceptibilitäts gene zu identifizieren, kündigt eine neue Ära in der Krebsprävention an. Die Möglichkeit, die Individuen mit erhöhtem Risiko zu identifizieren, wäre von größter Bedeutung hinsichtlich Krebsprävention bei gleichzeitig maximaler Kosteneffizienz, da Patienten mit geringem Risiko ein eher größeres Untersuchungsintervall benötigen würden. Die Früherkennungsstrategien werden noch wirkungsvoller, wenn man in der Lage ist, eine sehr kleine Anzahl maligner oder prä-maligner Zellen zu identifizieren zu einem Zeitpunkt, in dem das Invasions- bzw. Metastasierungsrisiko noch klein ist.

Auch der Benefit für den Patienten, der eine akkurate und frühzeitige Diagnose kleiner dysplastischer Zellnester erhält, spielt in diesem Zusammenhang eine große Rolle. Entsprechende therapeutische Konsequenzen ergeben sich aufgrund der neueren Ablationsverfahren auch für Patienten, die zuvor nicht kurativ durch eine Ösophagusresektion behandelt werden konnten. Gerade bei diesen Verfahren ist es notwendig, eine high-grade- IEN und kleine Adenokarzinome frühzeitig zu erkennen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Barrett-Ösophagus ist eine Veränderung des distalen Ösophagus, bei dem durch chronischen säure- und gallehaltigen Reflux aus dem Magen eine intestinale Metaplasie entsteht. Der Barrett-Ösophagus tritt vor allem bei männlichen Kaukasiern auf. Eigentlich ohne wesentliche klinische Relevanz, wird der Barrett-Ösophagus durch seine maligne Potenz überhaupt erst interessant. Patienten mit dieser Veränderung haben ein ca. 30- bis 125-fach erhöhtes Risiko, ein Adenokarzinom des Ösophagus zu entwickeln. Die Entwicklung der Metaplasie zu einem Adenokarzinom erfolgt in einem mehrstufigen Prozess. Zunächst treten niedriggradige Dysplasien, gefolgt von höhergradigen Dysplasien auf.

Um Patienten mit einem Adenokarzinom rechtzeitig einer kurativen Therapie zu unterziehen, müssen diese prämaligen Läsionen in endoskopischen Überwachungsprogrammen beobachtet werden. Ein Streitpunkt in der aktuellen Literatur ist der zeitliche Rahmen dieser Kontrolluntersuchungen und auch die Frage, welche Patienten eine erhöhte Wahrscheinlichkeit haben, ein Karzinom zu entwickeln. In vielen bisher veröffentlichten Arbeiten wurden nun verschiedenste so genannte Biomarker untersucht, die eine mögliche maligne Transformation der Barrett-Mucosa vorhersagen können. Bisher konnte sich noch keiner dieser Biomarker klinisch etablieren.

Ziel unserer Studie war es genetische Veränderungen der für die Karzinogenese des Barrettkarzinoms relevanten Tumorsuppressorgene zu analysieren. Besonderes Augenmerk legten wir auf den zeitlichen Verlauf der genetischen Veränderungen im Rahmen der Kontrollendoskopien bei Patienten mit Barrett-Ösophagus.

Hierzu griffen wir auf die in einem Zeitraum von bis zu 51 Monaten angefallenen Präparate aus dem Archiv von PD Dr. Alles (Gießen) und dem Pathologischen Institut des Klinikum Kassel zurück. Insgesamt untersuchten wir 110 Proben von 26 Patienten. Die Zellen wurden mittels Laser-Mikrodissektion aus dem Gewebe gewonnen und nach einer PEP-PCR mit nachfolgender spezifischer Mikrosatelliten-PCR mittels einer Gelelektrophorese ausgewertet. Untersucht wurden die Mikrosatellitenmarker der Tumorsuppressorgene p53, p16, APC, DCC, DPC4 und Rb. Mögliche Ereignisse waren entweder ein Verlust der Heterozygotie (LOH), eine Mikrosatelliteninstabilität oder eine homozygote Deletion.

Als Ergebnis unserer Studie war ein Anstieg der LOH-Kombinationen von APC und p53 sowie APC und p16 relativ früh in der neoplastischen Entwicklung des Barrettkarzinoms zu erkennen. Statistisch war dieser Anstieg ein Trend ohne Signifikanz.

Als wichtigste Erkenntnis zeigt sich, dass vermutlich in bereits sehr vielen Studien ein mangelhaftes Untersuchungsprotokoll zu verfälschten Ergebnissen geführt hat. Hierdurch ließen sich die teilweise sehr divergierenden Ergebnisse mancher Studien erklären. In dem uns vorliegenden Material fanden wir in Verlaufsbiopsien nur in etwas weniger als der Hälfte der entnommenen Biopsien Barrett-Mucosa.

Auch ältere Studien zeigen, dass das bisher benutzte Untersuchungsprotokoll nicht ausreicht, um die teilweise sehr kleinen high-grade-IEN oder Adenokarzinome in der Barrett-Mucosa zu entdecken.

Auch wir empfehlen, zukünftig die Probenentnahme im Rahmen der Barrett-Kontrollendoskopien als eine Quadrantenbiopsie mit einem 1 cm-Intervall mit so genannten ‚Jumbo‘-Forceps in der ‚turn-and-suction‘-Technik durchzuführen. Zusätzlich sollten alle makroskopisch auffälligen Areale großzügig mitbiopsiert werden. Von anderen Autoren wird dieses Vorgehen als das ‚Seattle-Protokoll‘ bezeichnet.

Nur auf diese Weise können zukünftige molekulargenetische oder histomorphologische Untersuchungen eine entsprechende Aussagekraft gewährleisten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Adams PD, Kaelin WG (1998)

‘Negative control elements of the cell cycle in human tumors.’

Curr Opin Cell Biol 10:791-797

Alikhan M, Rex D, Khan A, Rahmani E, Cummings O, Ulbright TM (1999)

‘Variable pathologic interpretation of columnar lined esophagus by general pathologists in community practice.’

Gastrointest Endosc 50:23-26

Arnheim N, Erlich H (1992)

‘Polymerase chain reaction strategy’

Ann Rev Biochem 61:131-156

Barrett MT, Sanchez CA, Galipeau PC, Neshat K, Emond M, Reid BJ (1996)

‘Allelic loss of 9p21 and mutation of the CDKN2/p16 gene develop as early lesions during neoplastic progression in Barrett's esophagus.’

Oncogene 13:1867-1873

Barrett MT, Schutte M, Kern SE, Reid BJ (1996)

‘Allelic loss and mutational analysis of the DPC4 gene in esophageal adenocarcinoma.’

Cancer Res 56:4351-4353

Barrett MT, Sanchez CA, Prevo LJ, Wong DJ, Galipeau PC, Paulson TG, Rabinovitch PS, Reid BJ (1999)

‘Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus.’

Nat Genet 22:106-109

Barrett NR (1950)

‘Chronic peptic ulcer of the oesophagus and oesophagitis’

BR J Surg 58:175-182

Bian YS, Osterheld MC, Bosman FT, Benhattar J, Fontoliet C (2001)

'p53 gene mutation and protein accumulation during neoplastic progression in Barrett's esophagus.'

Mod Pathol 14:397-403

Boynton RF, Blount PL, Yin J, Brown VL, Huang Y, Tong Y, McDaniel T, Newkirk C, Resau JH, Raskind WH (1992)

'Loss of heterozygosity involving the APC and MCC genetic loci occurs in the majority of human esophageal cancers.'

Proc Natl Acad Sci 89:3385-3388

Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (2003)

'Harrisons Innere Medizin Band 1, Dt. Ausgabe der 15. Auflage'

ABW, Wiss-Verl., Berlin

Buttar N S, Wang K K, Sebo T J, Riehle D M, Krishnadath K K, Lutzke L S, Anderson M A, Petterson T M, Burgart L J (2001)

,'Extent of high-grade-dysplasia in barrett's correlates with risk of adenocarcinoma.'

Gastroenterology 120:1630-1639

Cameron AJ, Carpenter HA (1997)

'Barrett's esophagus, high-grade dysplasia an early adenocarcinoma.'

Am J Gastroenterol 92:586-591

Chang HY, Yang X (2000)

'Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases.'

Microbiol Mol Biol Rev 64:821-824.

Chen YQ, Hsieh JT, Yao F, Fang B, Pong R, Cipriano SC, Krepulat F (1998)

,'Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC'

Oncogene 18:801-804

Cho KR, Oliner JD, Simons JW, Hedrick L, Fearon ER, Preisinger AC, Hedge P, Silverman GA, Vogelstein B (1994)

'The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas'
Genomics 19:525-531

Dear PH, Cook PR (1993)

'Happy mapping: linkage mapping using a physical analogue of meiosis.'
Nucl Ac Res 21:13-20

DelSal G, Loda M, Pagano M (1996)

'Cell Cycle and Cancer, Critical Events at the G1 Restrictions Point'
Critical Reviews in Oncogenesis 7:127-142

Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J (1997)

'Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression.'
Cancer Res 57:4749-4756

Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, Heinmöller E, Kerner T, Endl E, Jauch KW, Hochstädter F, Rüschoff J (1999)

'Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification'
Am J Pathol 154:83-95

Doak SH, Jenkins GJ, Parry EM, D'Souza FR, Griffiths AP, Toffazal N, Shah V, Baxter JN, Parry JM (2003)

'Chromosome 4 hyperploidy represents an early genetic aberration in premalignant Barrett's oesophagus.'
Gut 52:623-628

Dolan K, Morris AI, Gosney JR, Field JK, Sutton R (2003)

'Loss of heterozygosity on chromosome 17p predicts neoplastic progression in Barrett's esophagus.'
J Gastroenterol Hepatol 18:683-689

Falk GW (2002)

'Barrett's esophagus.'

Gastroenterology 122:1569-1591

Fang M, Lew E, Klein M, Sebo T, Su Y, Goyal R (2004)

'DNA abnormalities as marker of risk for progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma: image cytometric DNA analysis in formalin-fixed tissues.'

Am J Gastroenterol 99:1887-1894

Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, and Vogelstein B (1990)

'Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers'

Science 247:49-56

Fuchs EJ, McKenna KA, Bedi A (1997)

'p53 dependent DNA-damage-induced apoptosis requires Fas/APO-1-independent activation of CPP32.'

Cancer Res. 57:2550-2554

Galipeau PC, Prevo LJ, Sanchez CA, Longton GM, Reid BJ (1999)

'Clonal expansion and loss of heterozygosity at chromosomes 9p and 17p in premalignant esophageal (Barrett's) tissue.'

J Natl Cancer Inst 91:2087-2095

Gao X, Honn KV, Grignon D, Sakr W, Chen YQ (1993)

'Frequent loss of expression and loss of heterozygosity of the putative tumor suppressor gene DCC in prostatic carcinomas'

Cancer Res. 53:2723-2727

Goldblum JR, Lauwers GY (2002)

'Dysplasia arising in barrett's esophagus: diagnostic pitfalls and natural history.'

Semin Diagn Pathol 19:12-19

Goyal RK (2003)

'Harrisons Innere Medizin Band 1, Dt. Ausgabe der 15. Auflage'

ABW, Wiss-Verl., Berlin

Green RA, Kaplan KB (20xx)

,Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC'

J Cell Biol. 163:949-61

Griffith AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM (1996)

'An Introduction To Genetic Analysis'

W. H. Freeman an Company

Griffith T, Lynch S David H (1998)

'TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms.'

Current Opinion in Immunology 10:559-563

Hage M, Siersema PD, Vissers KJ, Dinjens WN, Steyerberg EW, Haringsma J, Kuipers EJ, van Dekken H (2006)

'Genomic analysis of Barrett's esophagus after ablative therapy: persistence of genetic alterations at tumor suppressor loci.'

Int. J. Cancer 118:155-160

Hamilton SR, Aaltonen LA (Eds.) (2000)

'World health organization of tumours. Pathology and genetics of tumours of the digestive system.'

IARC Press: Lyon

Hardie LJ, Darnton SJ, Wallis YL, Chauhan A, Hainaut P, Wild CP, Casson AG (2005)

'p16 expression in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: association with genetic and epigenetic alterations.'

Cancer Lett 217:221-230

Heinmöller E, Renke B, Beyser K, Dietmaier W, Langner C, Rüschoff J (2001) 'Pitfalls in diagnostic molecular pathology--significance of sampling error.'
Virchows Arch 439:504-511.

Heinmöller E, Schlake G, Renke B, Liu Q, Hill KA, Sommer SS, Rüschoff J (2002)
'Microdissection and molecular analysis of single cells or small cell clusters in pathology and diagnosis--significance and challenges.'
Anal Cell Pathol 24:125-134

Heinmöller E, Qiang L, Sun Y, Schlake G, Hill KA, Weiss LM, Sommer SS (2002)
'Toward efficient analysis of mutations in single cells from ethanol-fixed, paraffin-embedded, and immunohistochemically-stained tissues.'
Lab Invest 82:443-453

Hilgers W, Rosty C, Hahn SA (2002)
'Molecular pathogenesis of pancreatic cancer'
Haematol Oncol Clin North Am 16:17-35

Hohne MW, Halatsch M-E, Kahl GF, Weinel RJ (1992)
'Frequent loss of expression of the potential tumor suppressor gene DCC in ductal pancreatic adenocarcinoma'
Cancer Res. 52:2616-2619

Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA (2005)
'Gastrointestinal and Liver Pathology: A Volume in the Foundations in Diagnostic Pathology Series'
Churchill Livingstone

Jankowski JA, Harrison RF, Perry I, Balkwill F, Tselepis C (2000)
'Barrett's metaplasia.'
Lancet 16;356:2079-2085

Koop H, Schepp W, Müller-Lissner S, Madisch A, Micklefield G, Messmann H, Fuchs KH, Hotz J (2005)

‘Gastroösophageale Refluxkrankheit – Ergebnis einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten.’

Z Gastroenterol 2005; 43: 163–164

Knudson AG (1983)

‘Cancer genes in man.’

Curr Probl Cancer 7:4-14

Lachmund A, Sachse GE (1994)

‘Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und ihre Anwendungsbereiche’

in Gassen HG ‚PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerasekettenreaktion‘ 1-12

Lai LA, Paulson TG, Li X, Sanchez CA, Maley C, Odze RD, Reid BJ, Rabinovitch PS (2007)

‘Increasing genomic instability during premalignant neoplastic progression revealed through high resolution array-CGH.’

Genes Chromosomes Cancer 46:532-542

Levin AJ (1993)

‘The Tumor Suppressor Genes.’

Rev. Biochem. 62:623-651

Levine DS, Haggitt RC, Blount PL, Rabinovitch PS, Rusch VW, Reid BJ (1993)

‘An endoscopic biopsy protocol can differentiate high-grade dysplasia from early adenocarcinoma in Barrett's esophagus.’

Gastroenterology 105:40-50

Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992)

‘Telomere end-replication problem and cell aging’

J Mol Biol 225:951-960

Lewin KJ, Appelman HD (1995)

,'Atlas of Tumorpathology: Tumor of the esophagus and stoma.'

Armed forces institute of pathology, Washington D.C.

Liu J, Yao F, Wu R, Morgan M, Thorburn a, Finley Jr RL, Chen YQ (2002)

'Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 α '

J Biol Chem 277:26281-26285

Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Järvinen H, Mecklin JP, Launonen V, Aaltonen LA (2001)

'Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)'

Cancer, 61:4545-4549

MacDonald CE, Wicks AC, Playford RJ (2000)

'Final Results from 10 year cohort of patients undergoing surveillance of Barrett's esophagus.'

Br Med J 321:1252-1255

Maley CC, Galipeau PC, Li X, Sanchez CA, Paulson TG, Blount PL, Reid BJ (2004)

'The combination of genetic instability and clonal expansion predicts progression to esophageal adenocarcinoma.'

Cancer Res 64:7629-7633

Maley CC, Galipeau PC, Li X, Sanchez CA, Paulson TG, Reid BJ (2004)

'Selectively advantageous mutations and hitchhikers in neoplasms: p16 lesions are selected in Barrett's esophagus.'

Cancer Res 64:3414-3427

Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE (1998)

,'The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis'

Nature 395:801-804

Miyake, S., K. Nagai, K. Yoshino, M. Oto, M. Endo, and Y. Yuasa (1994)

‘Point mutations and allelic deletion of tumor suppressor gene DCC in human esophageal squamous cell carcinomas and their relation to metastasis’

Cancer Res. 54:3007-3010

Montgomery E, Bronner MP, Goldblum JR, Greenson JK, Haber MM, Hart J, Lamps LW, Lauwers GY, Lazenby AJ, Lewin DN, Robert ME, Toledano AY, Shyr Y, Washington K (2001)

‘Reproducibility of the diagnosis of dysplasia in Barrett esophagus: a reaffirmation.’

Hum Pathol 32:368-378

Morales TG, Sampliner RE (1999)

‘Barrett's esophagus: update on screening, surveillance, and treatment.’

Arch Intern Med 159:1411-1416

Morgan DO (1997)

‘Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors.’

Annu Rev Cell Devel Biol 13:261-291

Mullis KB, Faloona FA, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986)

‘Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction’

Cold Spr Har Symp Quant Bio 51:263-273

Neuhof D, Wenz F, Weber KJ (1998)

‘Bestrahlungsinduzierte Veränderung der Telomeraseaktivität in humanen TK6-Lymphoblasten’

Strahlenther und Onkol 174, 1:41

Nevins LR (1998)

‘Toward an understanding of the E2F and retinoblastoma families.’

Cell Growth Differentiation 9:585-593

Odze RD, Goldblum JR, Crawford JM (2003)

'Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas'

Saunders

Ormsby AH, Kilgore SP, Goldblum JR, Richter JE, Rice TW, Gramlich TL (2000)

'The location and frequency of intestinal metaplasia at the esophagogastric junction in 223 consecutive autopsies: implications for patient treatment and preventive strategies in Barrett's esophagus.'

Mod Pathol 13:614-620

Overholt BF (1999)

Review

Gastrointest. Endosc. 49: 1-7

Pierceall WE, Cho KR, Getzenberg RH, Reale MA, Hedrick L, Vogelstein B, Fearon ER (1994)

'NIH3T3 cells expressing the deleted in colorectal cancer tumor suppressor gene product stimulate neurite outgrowth in rat PC12 pheochromocytoma cells'

J Cell Biol 124:1017-1027

Powell J, McConkey CC (1992)

'The rising trend in oesophageal adenocarcinoma and gastric cardia.'

Eur J Cancer Prev 1:265-269

Prevo LJ, Sanchez CA, Galipeau PC, Reid BJ (1999)

'p53-mutant clones and field effects in Barrett's esophagus.'

Cancer Res 59:4784-4787

Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Roth G, Surawicz CM, VanBelle G, Lewin K, Weinstein WM, Antonioli DA, Goldman H, MacDonald W, Owen D (1988)

'Observer variation in the diagnosis of high grade dysplasia in Barrett's esophagus.'

Hum Pathol 19:166-178

Reid BJ, Blount PL, Feng Z, Levine DS (2000)

'Optimizing endoscopic biopsy detection of early cancers in Barrett's high-grade dysplasia.'

Am J Gastroenterol 95:3089-3096

Reid BJ, Levine DS, Longton G, Blount PL, Rabinovitch PS (2000)

'Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: baseline histology and flow cytometry identify low- and high-risk patient subsets.'

Am J Gastroenterol 95:1669-1676

Reid BJ, Blount PL, Rabinovitch PS (2003)

'Biomarkers in Barrett's esophagus.'

Gastrointest Endosc Clin N Am 13:369-397

Riegman PH, Vissers KJ, Alers JC, Geelen E, Hop WC, Tilanus HW, van Dekken H (2001)

'Genomic alterations in malignant transformation of Barrett's esophagus.'

Cancer Res 61:3164-3170

Romagnoli S, Roncalli M, Graziani D, Cassani B, Roz E, Bonavina L, Peracchia A, Bosari S, Coggi G (2001)

'Molecular alterations of Barrett's esophagus on microdissected endoscopic biopsies.'

Lab Invest 81:241-247

Scheck AC, and Coons SW (1993)

'Expression of the tumor suppressor gene DCC in human gliomas'

Cancer Res. 53:5605-5609

Schlegel J, Bocker T, Zirngibl H, Hofstädter F, Rüschoff J (1995)

'Detection of microsatellite instability in human colorectal carcinomas using a non-radioactive PCR-based screening method.'

Virchows Arch 426:223-227

Schnell T, Sonntag S J, Chejfec G, Arnha G, Metz A, O'Connell S, Seidel U, Sonnenberg A (2001)

'Long-term nonsurgical management of Barrett's esophagus with high-grade-dysplasia.'
Gastroenterologie 120:1607-1619

Schütze K, Böhm M, Thalhammer St, Pösl H (1997)

,'Laser Mikroablation für die Genanalyse auf Einzelzellbasis.'
BIOforum 20:82-87

Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Luttgies J, Kloppel G, Graeven U, Eilert-Micus C (2000)

'Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis'
Proc Natl Acad Sci USA 97:9624-9629

Sharma P, McQuaid KR, Dent J et al (2004)

'A critical review of the Diagnosis and Managment of Barrett's esophagus: the AGA Chicago workshop.'
Gastroenterology 127:310-30

Shaheen NJ, Crosby MA, Bozymski EM, Sandler RS (2000)

'Is there publication bias in the reporting of cancer risk in Barrett's esophagus?'
Gastroenterology 119:333-338

Sherr CJ (1996)

'Cancer cell cycles.'
Science 274:1672-1677

Skacel M, Petras RE, Gramlich TL, Sigel JE, Richter JE, Goldblum JR (2000)

'The diagnosis of low-grade dysplasia in Barrett's esophagus and its implications for disease progression.'
Am J Gastroenterol 95:3383-3387

Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJV, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJC, Wolf CR (2002)

'Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer'
Proc Natl Acad Sci USA 99:9433-9438

Souza RF, Morales CP, Spechler SJ (2001)

'A conceptual approach to understanding the molecular mechanisms of cancer development in Barrett's oesophagus.'
Aliment Pharmacol Ther 15:1087-1100

Stein HJ (1996)

'Esophageal cancer: screening and surveillance. Results of a consensus conference held at the Vith world congress of the International Society of the Esophagus.'
Dis Esophagus 9:S3-S19

Sun F, Arnheim N, Waterman MS (1995)

'Whole genome amplification of single cells: mathematical analysis of PEP and Tagged PCR'
Nuc Acid Res. 23:3034-40

Tannapfel A (2004)

'Molecular findings in Barrett's epithelium.'
Dig Dis 22:126-133

Tytgat GNJ, Hameeteman W (1992)

'The neoplastic potential of columnar-lined (Barrett) esophagus.'
World J Surg 16:308-312

Van der Burgh A, Dees J, Hop WC, van Blankenstein M (1996)

'Oesophageal cancer is an uncommon cause of death in patients with Barrett's oesophagus'
Gut 39:5-8

Vogelstein B, Lane D, Levine A (2000)

'Surfing the p53 network.'
Nature 408:307-310

Wang KK, Sampliner RE (2008)

'Updated Guidelines 2008 for the Diagnosis, Sureillance and Therapy of Barrett's Esophagus'
Am J Gastroenterol 103:788-797

Wäsch R., Cross F.R. (2002)

'APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit.'
Nature 418:556-562.

Weston AP, Banerjee SK, Sharma P, Tran TM, Richards R, Cherian R (2001)

'p53 protein overexpression in low grade dysplasia (LGD) in Barrett's esophagus:
immunohistochemical marker predictive of progression.'
Am J Gastroenterol 96:1355-1362

Wild CP, Hardie LJ (2003)

'Reflux, Barrett's oesophagus and adenocarcinoma: burning questions.'
Nat Rev Cancer 3:676-684

**Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ,
Kern SE, Hruban RH (2000)**

'Loss of expression of DPC4 in pancreatic intraepithelial neoplasia:evidence that DPC4
inactivation occurs late in neoplastic progression'
Cancer Res 60:2002-2006

Wong DJ, Paulson TG, Prevo LJ, Galipeau PC, Longton G, Blount PL, Reid BJ (2001)

'p16(INK4a) lesions are common, early abnormalities that undergo clonal expansion in
Barrett's metaplastic epithelium.'
Cancer Res 61:8284-289

Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T (2001)

'Human DNA Repair Genes.'
Science 291:1284-1289

Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N (1992)

,Whole genom amplification from a single cell: implications for genetic analysis'

Proc Natl Acad Sci USA 1992 (89), pp 5847-5851

8. ANHANG

8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APC	adenomatous polyposis coli
CDC	cell deivision cycle
CDK	cyclin-depend-kinasis
DCC	deleted in colorectal cancer
DGVS	Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC4	deleted in pancreatic cancer, locus 4
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
HD	homozygote Deletion
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
IHC	Immunhistochemie
LOH	loss of heterozygosity
hMSH2	human mutS homolog 2 gen
hMLH1	human mutL homolog 1 gen
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
N	Normalgewebe
n.d.	not done
n.i.	not informative
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	poly-Adenosin-diphosphat-Ribose-Polymerase
PEP-PCR	primer-extension-preamplification-polymerase-chain-reaction
PCR	polymerase-chain-reaction
pRb	Retinoblastomprotein
Rb	Retinoblastomgen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Taq	Thermus aquaticus
u.a.	unter anderem

8.2 VERÖFFENTLICHUNGSVERZEICHNIS

Werther M, Saure C, Pahl R, Schorr F, Rüschoff J, Alles JU, Heinmöller E (2008)

‘Molecular genetic analysis of surveillance biopsy samples from Barrett’s mucosa – significance of sampling.’

Pathol Res Pract. 204(5): 285-94. Epub 2008 Mar 11

8.3 DANKSAGUNG

Für die Mithilfe und Unterstützung bei Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich bei allen beteiligten Personen bedanken.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Jens Uwe Alles vom Institut für Pathologie und Zytologie Wetzlar für die Bereitstellung des Themas und Ermöglichung der Arbeit, für die engagierte Betreuung und die zahlreichen wertvollen Anregungen.

Desweiteren danke ich Herrn PD Dr. Ernst Heinmöller vom Institut für Pathologie des Klinikum Kassel - der mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand - für die vielfältige Unterstützung, die hilfreichen Tipps und die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen.

Für die wertvolle und kompetente Unterstützung während des experimentellen Teils der Arbeit am Klinikum Kassel möchte ich Dr. Meike Werther herzlich danken.

Ein großer Dank geht an die MTLAs der Labore in Wetzlar, Gießen und Kassel, die mir in der Laborphase der Arbeit jederzeit zur Seite standen. Besonderer Dank geht an dieser Stelle an Fr. Seibert aus dem Labor in Wetzlar für die logistische Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meiner lieben Frau Melanie für die außerordentliche Hilfe und Geduld über den gesamten Zeitraum der Entstehung dieser Arbeit.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen,

die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der “Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis” niedergelegt sind eingehalten.

8.4 ABSTRACT

Barrett’s mucosa is a preneoplastic condition predisposing to Oesophageal adenocarcinoma. The prevalence of Barrett’s mucosa is estimated to be 1 in 50-200 people. The risk of progression to oesophageal cancer is estimated to be 30-125 fold and progression is most likely to be a multistep process. Until today dysplasia (intraepithelial neoplasia, IEN) is thought to be the best biomarker available for risk of progression to adenocarcinoma in patients with Barrett’s metaplasia. However, important pitfalls especially in the recognition of low grade IEN are high interobserver variability and the difficulties of diagnosis of IEN in the background of severe inflammation. The development of IEN can be recognized by endoscopic biopsy which is recommended as surveillance for all surgically fit Barrett’s mucosa patients. However, this is neither feasible nor cost effective. Thus, for optimized surveillance it is necessary to 1.) identify patients with increased risk of progression, e.g. by use of predictive biomarkers which may more accurately predict the subgroups progressing to malignant disease, and 2.) determining an interval of endoscopic surveillance being effective in regard of cost and early surgical intervention, e.g. by mucosectomy.

In this study we performed molecular genetic analyses of laser microdissected biopsy specimens taken from surveillance biopsies after the diagnosis of Barrett’s mucosa without high grade IEN in a follow-up time up to 51 months. The prospective data presented here highlight the need for accurate and extensive sampling as a prerequisite for reliable molecular genetic analyses.

Formalin fixed paraffin embedded biopsy specimens from 26 Patients obtained at surveillance endoscopy after a diagnosis of Barrett’s oesophagus were laser microdissected (18 men and 8 women, age between 45 and 82 years, samples from the Institute of Pathology Klinikum Kassel and Department of Pathology Evangelisches Krankenhaus Giessen collected between 1996 and 2002). Only specimens with Barrett’s metaplasia or low grade IEN were chosen for initial molecular genetic analyses after the diagnosis has been confirmed by at least two

expert pathologists. Follow up biopsies were available for an interval between 6 and 51 months. Biopsy samples or tissue specimens with normal gastric mucosa or normal squamous epithelium from the oesophagus served as normal controls. Suitable DNA could be obtained from 110 biopsy samples consisting of 91 samples with metaplastic Barrett's epithelium and 17 samples with low grade IEN. Two samples were from two patients who progressed to Barrett's adenocarcinoma during the surveillance interval. Samples taken during surveillance endoscopy that did not contain Barrett's mucosa were excluded from the study or served as normal controls. In addition, samples from the distal oesophagus in which the presence of metaplastic gastric mucosa could not be ruled out were also excluded from the study.

Our data show that there is no significant increase of LOH events at least in a 51 months interval. In two patients, Barrett's adenocarcinoma was diagnosed 6 months after first diagnosis of Barrett's mucosa. 6 of 26 patients did not show LOH. The remaining patients exhibited a striking variation of LOH pattern and accumulation in individual biopsy samples taken over time. From our microsatellite marker panel we were not able to define a surrogate marker which could serve as a potential biomarker or biomarker set indicating an increased risk for progression to Barrett's adenocarcinoma.

As a result and consequence of our sampling data of biopsy specimens, the performance of multiple (quadrant) biopsies in an interval of 10 mm in a Barrett's mucosa segment, if possible, with a jumbo forceps is strongly suggested. This sampling technique is a prerequisite for reliable molecular analysis of the biopsy specimens to answer important questions in regard of biological dynamics of epithelial cell clones in addition to the search for future biomarkers predictive for neoplastic progression. In addition, a side effect of accurate sampling with important benefit to the patient will be early detection of small dysplastic areas or even small adenocarcinomas which may be otherwise missed.