

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Hendrik Lehnert

**Die Rolle von p53-Mutationen
bei
Karzinomen des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Christina Sengpiel
aus Wismar

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Nils Homann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rainer Broll

Tag der mündlichen Prüfung: 17.09.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, 17.09.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Für meine Oma

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Das Karzinom des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs	6
1.1.1 Epidemiologie	6
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	7
1.1.2.1 Ätiologie und Pathogenese des Plattenepithelkarzinoms	7
1.1.2.2 Ätiologie und Pathogenese des Adenokarzinoms	8
1.1.3 Klinischer Verlauf und Prognose	9
1.2 Das Tumorsuppressorgen p53	11
1.2.1 Die Geschichte von p53	11
1.2.2 Struktur und Lokalisation von p53	13
1.2.3 Funktionen von p53	14
1.3 Fragestellung	15
2. Material	16
2.1 Untersuchungsmaterial	16
2.2 Chemikalien	16
2.3 Lösungen und Puffer	17
2.4 Enzyme	17
2.5 Primer	17
2.5.1 Auswahl der Oligonukleotide	17
2.5.2 Primer für die PCR	18
2.5.3 Primer für die Sequenzierung	18
2.5.4 Primer für die mikrodisezierten Proben	19
2.6 Reagenzien für die Sequenzierung	20
2.7 Sonstige Materialien	20
2.8 Verwendete Geräte	21
2.9 Klinische Daten	22
3. Methoden	25
3.1 Isolation von Nukleinsäuren	25
3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
3.2.1 Das Prinzip der PCR	26
3.2.2 Erste PCR	27
3.2.3 „nested“-PCR	28
3.2.4 „halfnested“-PCR	29
3.3 Gelelektrophorese	30
3.4 Sequenzierung	30
3.5 PCR und Sequenzierung von mikrodisezierten Proben	33

3.5.1	Aufbereitung der Gewebe vor der PCR	33
3.5.2	Erste PCR der mikrodisektierten Proben	34
3.5.3	„nested“-PCR der mikrodisektierten Proben	35
3.5.4	Sequenzierung der mikrodisektierten Proben	35
3.6	Statistik	35
4.	Ergebnisse	37
4.1	Allgemeine Bemerkungen	37
4.2	PCR	37
4.3	Sequenzierung	38
4.4	Auswertung der klinischen Daten	43
4.5	Vergleich mit der IARC-Datenbank	49
5.	Diskussion	51
5.1	Methodische Aspekte	51
5.1.1	PCR	51
5.1.2	Sequenzierung	52
5.2	Das Tumorsuppressorgen p53: Seine Funktionen und Veränderungen in menschlichen Tumoren	53
5.2.1	Funktionen von p53	53
5.2.2	P53-Veränderungen in humanen Tumoren	56
5.3	P53-Mutationen beim Ösophaguskarzinom: Assoziation zur Pathogenese, klinischen Verlauf und Prognose	57
5.3.1	P53-Mutationsanalyse	57
5.3.2	P53-Mutationen und die Bedeutung bei der Pathogenese	60
5.3.3	P53-Mutationen und die Bedeutung beim klinischen Verlauf und der Prognose	64
6.	Zusammenfassung	67
7.	Literaturverzeichnis	69
8.	Anhang	80
8.1	Abkürzungsverzeichnis	80
8.2	Verzeichnis der Abbildungen	82
8.3	Verzeichnis der Tabellen	83

1. Einleitung

1.1 Das Karzinom des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs

Unter den Begriffen „Ösophaguskarzinom“ und „Karzinom des gastroösophagealen Übergangs“ werden die epithelialen, malignen Tumore der Speiseröhre und der Cardia zusammengefasst. Im nachfolgenden werden Epidemiologie, Risikofaktoren, der klinische Verlauf und die Prognose dargestellt.

1.1.1 Epidemiologie

Die Ösophaguskarzinome sind die neunthäufigste Krebserkrankung und die sechsthäufigste Krebstodesursache in der Welt (Pisani et al., 1999). Weltweit werden jährlich über 316.000 neue Fälle diagnostiziert, von denen 286.000 versterben (Blot, 1995; Blot und McLaughlin, 1999; Jemal et al., 2002). Die Inzidenz des Ösophaguskarzinoms variiert jedoch beträchtlich zwischen verschiedenen geographischen Regionen und ethnischen Gruppen. Zu den Hochrisikogebieten zählen die Provinz Henan in China (Gao et al., 1994), Teile Irans (Cook-Mozaffari et al., 1979; Saidi et al., 2000), die Normandie in Frankreich (Hollstein et al., 1991a) und einige Teile Südamerikas (Munoz et al., 1987; Victora et al., 1987; De Stefani et al., 1990). Die höchsten Mortalitätsraten für Ösophaguskarzinome bei Männern hatten China (21,6 pro 100.000 Einwohnern), Südafrika und Kasachstan (19,2 bzw. 19,1 pro 100.000) bezogen auf das Jahr 2002. Bei Frauen lag die Todesrate am höchsten in Uganda, Kasachstan und China (11,3, 10,0 bzw. 9,6 pro 100.000 Einwohnern). Im Vergleich dazu waren die Mortalitätsraten in Deutschland und den USA bei Männern etwa 4-fach (5,0 und 5,1 pro 100.000 Einwohnern) und bei Frauen circa 10-fach (1,0 und 1,2 pro 100.000) niedriger (Jemal et al., 2006). Im Krebsregister des Landes Schleswig-Holstein wurden für die Jahre 1999 bis 2004 eine Inzidenz für den gesamten Zeitraum von 1298 Fällen (985 männliche und 313 weibliche Neuerkrankte) sowie eine Mortalitätsrate von 987 Fällen (750 männliche und 237 weibliche Patienten) angegeben (www.krebsregister-sh.de).

Histologisch handelt es sich fast ausschließlich um Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome (Daly et al., 2000). Sehr selten kommen kleinzellige oder undifferenzierte Karzinome, Melanome, Leiomyosarkome oder andere Entitäten vor.

In den letzten zwei bis drei Jahrzehnten hat sich in Nordamerika und Europa die Inzidenz der Ösophaguskarzinome auffallend verändert: Während die Neuerkrankungsrate beim Plattenepithelkarzinom relativ konstant blieb, stieg die Inzidenz der Adenokarzinome des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs rapide an (Devesa et al., 1998; Blot und McLaughlin, 1999; Daly et al., 2000; Levine und Halvorsen, 2000). In den sechziger Jahren machte der Anteil der Plattenepithelkarzinome mehr als 90 % aus, während etwa 5% Adenokarzinome vorkamen. Heute liegt in den industrialisierten Ländern der Anteil der Adenokarzinome zwischen 20-50 % aller Ösophaguskarzinome.

Von der Lokalisation her kommen die Plattenepithelkarzinome in allen Bereichen des Ösophagus vor, während die Adenokarzinome hauptsächlich im distalen Ösophagus und im Bereich der Cardia (Karzinom des gastroösophagealen Übergangs) zu finden sind (Daly et al., 2000; Siewert et al., 2001). Letzteres kann dadurch erklärt werden, dass die Adenokarzinome hauptsächlich auf dem Boden eines Barrett-Ösophagus entstehen, einer intestinalen Metaplasie, bei der das Plattenepithel im distalen Ösophagus durch Zylinderepithel ersetzt wird (Romero et al., 2002).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

1.1.2.1 Ätiologie und Pathogenese des Plattenepithelkarzinoms

Ätiologisch sind für die Plattenepithelkarzinome insbesondere ein übermäßiger Alkohol- und Tabakkonsum zu nennen.

Durch die Inhalation von Tabakkondensat werden Karzinogene, insbesondere Nitrosamine, in Kontakt mit der Ösophagusschleimhaut gebracht (De Stefani et al., 1993). Das Risiko für ein Ösophaguskarzinom korreliert direkt mit der Menge, der pro Tag gerauchten Zigaretten und mit der Dauer des Nikotinabusus (Brown et al., 2001; Wu et al., 2001). In einer Studie von Tavani mit Nicht-Trinkern zeigte sich eine Odds Ratio von 0,8 für Ex-Raucher (95 % Confidence Intervall: 0,2-3,4), von 1,3 bei weniger als 20 Zigaretten pro Tag (95 % CI: 0,4-4,2) und von 7,5 bei Rauchern von mehr als 20 Zigaretten pro Tag (95 % CI: 2,7-20,4) gegenüber Nicht-Rauchern. Die Odds Ratio betrug 4,9 für einen Nikotinkonsum über mehr als 30 Jahre (Tavani et al., 1996).

Auch der Alkohol allein ist ein Risikofaktor für ein Ösophaguskarzinom. So wurde beispielsweise in einer Studie mit Nicht-Rauchern ein 2,7-fach erhöhtes Risiko bei Genuss

von 52 - 104 g Alkohol pro Tag beschrieben. Bei mehr als 104 g/d stieg das relative Risiko auf 5,4 (Tavani et al., 1994).

Bei gleichzeitigem Genuss von Alkohol und Nikotin in der Anamnese zeigt sich ein stark multiplikativer Effekt für das Risiko, ein Ösophaguskarzinom zu entwickeln (Levine, 1997; Castellsaque et al., 1999; Levine und Halvorsen, 2000; Kato et al., 2001). Lagergren et al. beschreibt bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom eine Odds Ratio von 23,1 (95 % Confidence Intervall 9,6-56,0) bei starken Rauchern und Trinkern verglichen mit Nicht-Rauchern und Nicht-Trinkern (Lagergren et al., 2000).

In über neunzig Prozent aller Fälle können Alkohol- und Tabakkonsum zusammen für ein Plattenepithelkarzinom des Ösophagus kausal verantwortlich gemacht werden. Durch diese beiden Noxen wird dabei die Schleimhaut in ihrer gesamten Länge im Sinne einer Feldkanzerisierung geschädigt, insofern ist es auch erklärbar, dass die Kombination von Alkohol und Nikotin auch zu einem ähnlich erhöhten Risiko für einen Tumor im Kopf- und Halsbereich führt. In 1-2 Prozent aller Patienten mit Kopf- und Halstumoren entwickelt sich metasynchron ein Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (Erkal et al., 2001).

In einigen Ländern scheint zusätzlich der häufige Konsum von sehr heißen Getränken ein weiterer Risikofaktor für ein Plattenepithelkarzinom zu sein (Viktora et al., 1987; Garidou et al., 1996; Ghavamzadeh et al., 2001). Die Achalasie, eine neuromuskuläre Erkrankung, bei der der untere Ösophagussphinkter nicht ausreichend erschlaffen kann, sowie Ösophagusstrikturen, beispielsweise infolge von Verätzungen, stellen Langzeitrisikofaktoren dar (Csikos et al., 1985; Sandler et al., 1995). Patienten mit einer Tylosis, einer angeboren autosomal-dominanten Erbkrankheit, oder mit Plummer-Vinson-Syndrom haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko, ein Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zu entwickeln (Schrump et al., 2001; Risk et al., 2002).

1.1.2.2 Ätiologie und Pathogenese des Adenokarzinoms

Für die Adenokarzinome sind die Risikofaktoren weit unklarer. Auch hier spielen der übermäßige Tabak- und Alkoholgenuss eine gewisse Rolle, allerdings ist die Assoziation schwächer (Vaughan et al., 1995; Castellsaque et al., 1999; Wu et al., 2001). Kabat et al. beschreibt in einer Studie an 173 männlichen Patienten mit einem Adenokarzinom des distalen Ösophagus und der Cardia eine Odds Ratio von 2,3 (95% Confidence Intervall: 1,4-3,9) bei Rauchern und von 1,9 (95% CI: 1,2-3,0) bei Ex-Rauchern im Vergleich zu

Nicht-Rauchern. Bei Patienten mit einem Alkoholkonsum von 4 oder mehr Unzen (1 Unze = 28,35 g) Whiskey oder entsprechenden Äquivalenten wird eine Odds Ratio von 2,3 (95% CI: 1,3-4,3) gegenüber Patienten, die weniger als einen Drink (12 g) pro Woche konsumieren, angegeben (Kabat et al., 1993).

Der Hauptrisikofaktor für ein Adenokarzinom des Ösophagus ist das Barrett-Syndrom, eine intestinale Metaplasie als Folge einer lange bestehenden Refluxkrankheit. Etwa 5-8 % aller Patienten mit einer gastroösophagealen Refluxkrankheit entwickeln einen Barrett-Ösophagus (Romero et al., 2002). Patienten mit einem Barrett-Ösophagus haben ein hohes Risiko für ein Adenokarzinom des Ösophagus, wobei die jährliche Rate der malignen Transformation annähernd 0,5 Prozent beträgt (Shaheen und Ransohoff, 2002). Nach neueren Studien kann auch der gastroösophageale Reflux als Symptom alleine eventuell einen Risikofaktor darstellen. (Lagergren et al., 1999, DeMeester, 2006). Nach diesen Studien haben Personen mit rezidivierend auftretendem, symptomatischem Reflux ein achtfach erhöhtes Risiko, ein Adenokarzinom des Ösophagus zu entwickeln. Je häufiger, langandauernder und stärker die Refluxsymptomatik ist, desto größer ist das Risiko für ein Adenokarzinom. So steigt es bis auf das 43-fache bei Patienten mit langjährigen und sehr schweren Refluxsymptomen an (Lagergren et al., 1999).

In einigen Studien schien eine CagA-positive *Helicobacter pylori*-Infektion das Risiko einer schweren gastroösophagealen Refluxkrankheit zu reduzieren und dadurch das Risiko für ein ösophageales Adenokarzinom zu senken (Chow et al., 1998a; Vicari et al., 1998; Warburton-Timms et al., 2001); in anderen bleibt diese Hypothese unbewiesen (Wu et al., 2003). Verschiedene Studien haben die Verbindung zwischen Adipositas und dem Risiko für ein Adenokarzinom gezeigt. Ein Ansteigen des Body-Mass-Index (BMI) korreliert mit einem ansteigenden Risiko für ein ösophageales Adenokarzinom durch Erhöhung des abdominalen Druckes und der gastroösophagealen Refluxerkrankung (Chow et al., 1998b; Wu et al., 2001).

1.1.3 Klinischer Verlauf und Prognose

Für die Prognose und die Behandlungsstrategie spielt das Tumorstadium eine herausragende Rolle (Thomas et al., 1997; Rice et al., 1998). In der Tabelle 1 ist die Stadieneinteilung für die Ösophaguskarzinome nach der TNM-Klassifikation dargestellt (Greene et al., 2002).

Stadium	T	N	M	5-Jahres-Überlebensrate
0	Tis	N0	M0	>95 %
I	T1	N0	M0	50-80 %
II a	T2-3	N0	M0	30-40 %
II b	T1-2	N1	M0	10-30 %
III	T3	N0	M0	10-15 %
	T4	N1	M0	
IV a	Jedes T	Jedes N	M1a	<5 %
IV b	Jedes T	Jedes N	M1b	<1 %

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der Ösophaguskarzinome anhand der Richtlinien des American Joint Committee on Cancer.

(Primärtumor (T): Tis, Carcinoma in situ; T1, Tumor bis in Submucosa reichend; T2, Tumor bis in Muscularis propria; T3, Tumor bis in Adventia/Serosa; T4, Invasion in Nachbarstrukturen. Lymphknoten (N): N0, keine regionären Lymphknotenmetastasen; N1, regionäre Lymphknoten-Metastasen. Metastasierung (M): M0, keine Fernmetastasen; M1a, Metastasen in zervikalen Lymphknoten bei Tumoren oberhalb der Trachealbifurkation und Metastasen in zoeliakalen Lymphknoten bei Tumoren unterhalb der Trachealbifurkation; M1b, andere Fernmetastasen)

Das Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs wird, wie in Abbildung 1 dargestellt, zusätzlich nach Siewert in folgende drei Tumorentitäten unterteilt: Typ 1, Adenokarzinom des distalen Ösophagus (sogenanntes Barrett-Karzinom); Typ 2, eigentliches Kardiakarzinom und Typ 3, subcardial entstandenes Magenkarzinom, welches von aboral die Kardia infiltriert (Siewert und Stein, 1996):

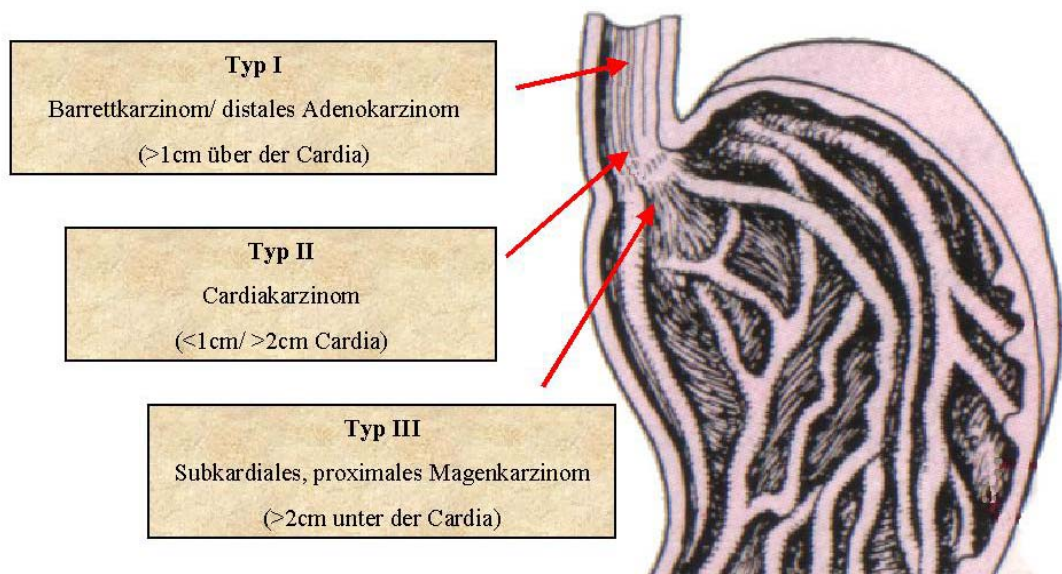


Abbildung 1: Die Einteilung des Adenokarzinoms des gastroösophagealen Übergangs nach Siewert.

Bei der Erstdiagnose liegt bereits bei circa 50 % aller Patienten ein lokal fortgeschrittenes oder metastasiertes Stadium vor. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist insgesamt sehr schlecht und liegt zwischen 10 bis 20 % (Ajani, 1998). Nach kompletter Resektion beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate über 95 % für das Stadium 0. Im Stadium I liegt sie bei 50-80 % und sinkt auf 30-40 % im Stadium IIa, 10-30 % im Stadium IIb und 10-15 % im Stadium III (Pera et al., 1992; Reed, 1999; Headrick et al., 2002). Die Therapie der Wahl bei lokal resektablen Stadien (vor allem T1-2, N0-1) ist die Operation. Bei lokal fortgeschrittenen, nicht metastasierten Tumoren kommen multimodale Therapiekonzepte unter Einbeziehung von Radio- und/oder Chemotherapie zum Einsatz. Nach neueren Metaanalysen existiert hier eine gute Evidenz für eine neoadjuvante Radiochemotherapie und bei Adenokarzinomen alternativ auch für eine neoadjuvante Chemotherapie (GebSKI et al., 2007). Eine primäre Radiochemotherapie wird bei nicht metastasierten Karzinomen, die nicht für eine Operation in Frage kommen, angewendet. Dazu zählen vor allem Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand und hochsitzende thorakale oder zervikale Ösophagustumore. Bei Patienten mit Fernmetastasen verbleiben nur noch palliative Maßnahmen. Dabei sind die obersten Therapieziele eine adäquate analgetische Therapie und eine Wiederherstellung der Nahrungspassage. Bei letzterem kommen beispielsweise intraluminale Stents, eine endoskopische Laserung oder eine endoluminale Bestrahlung in Frage. Bei Patienten im Stadium IV, die mit palliativer Chemotherapie behandelt wurden, beträgt die mediane Überlebensrate weniger als ein Jahr, wobei der lebensverlängernde Charakter noch unklar ist (Enziger et al., 1999; Brenner et al., 2004; Shah und Schwartz, 2004).

Zusammenfassend gehört das Karzinom des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs zu den prognostisch ungünstigen Tumoren. Ob der Einsatz neuer Zytostatika und Therapiemodalitäten, wie zum Beispiel Gentherapie, dies in Zukunft ändert, bleibt abzuwarten.

1.2 Das Tumorsuppressorgen p53

1.2.1 Die Geschichte von p53

Das p53-Protein wurde im Jahre 1979 als ein tumorassoziiertes Antigen in mit dem Simianvirus SV 40 transformierten Nagetierzellen entdeckt (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Nachdem man dieses Protein auch in anderen Zelllinien und

menschlichen Tumoren nachgewiesen hatte (DeLeo et al., 1979; Rotter et al., 1980; Rotter et al., 1981; Crawford et al., 1982), wurde es als ein zelluläres Onkogen betrachtet. In den späten achtziger Jahren, nachdem das Gen zumindest teilweise kloniert war (Oren et al., 1983), wurde klar, dass diese onkogene Eigenschaft zu einigen mutierten Formen gehörte (Hinds et al., 1989), während das p53-Wildtyp-Gen *in vitro* die Transformation ebenso gut wie *in vivo* das Tumorstadium supprimierte. In einigen Studien wurde nachgewiesen, dass das p53-Protein mit viralen Proteinen, z.B. HPV 16 und 18 (E6), Adenoviren Typ 5 (E1b) und Epstein-Barr-Virus EBNA-5 (Sarnow et al., 1982; Scheffner et al., 1990), und mit dem MDM-2-Onkogenprodukt („murine double minute 2“; Momand et al., 1992) komplexe Bindungen eingeht. Im Jahr 1990 wurde das p53-Gen als genetische Grundlage des Li-Fraumeni-Syndroms, einer selten vorkommenden, autosomal vererbten Erkrankung, die mit einem frühen Auftreten und einer hohen Inzidenz maligner Tumore bei den betroffenen Patienten einhergeht, entdeckt (Li et al., 1988; Malkin et al., 1990). In einem Nacktmausmodell konnte die tumorsupprimierende Eigenschaft von p53 beobachtet werden, in dem p53-homozygote und -hemizygoten „knock-out“-Mäuse zuerst normal heranwuchsen, dann aber frühzeitig und auch verschiedene maligne Tumore entwickelten (Donehower et al., 1992). Diese Beobachtungen ließen spekulieren, dass p53 das „ultimative Tumorsuppressorgen“ ist (Oren, 1992).

P53 gehört zu einer Familie von Genen mit verschiedenen und speziellen Funktionen. Ende der neunziger Jahre wurden zwei weitere Mitglieder dieser Genfamilie entdeckt: TP63 (lokalisiert auf Chromosom 3q27-28) und TP73 (lokalisiert auf Chromosom 1p36) (Kagdad et al., 1997; Yang et al., 1998). Die DNA-Bindungssequenzen dieser beiden Gene stimmen in 65 % mit der Sequenz des p53-Gens überein. Im Gegensatz zu p53 spielen sie keine große Rolle als Tumorsuppressorgene und sind nur unregelmäßig in Karzinomzellen mutiert.

Die erste Punktmutation im p53-Gen wurde erstmals 1989 bei einem Patienten mit einem Kolonkarzinom beschrieben (Baker et al., 1989; Nigro et al., 1989). Heute steht fest, dass p53-Mutationen eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung spielen. Mittlerweile wurden in bis zu 50 % der Karzinome Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 nachgewiesen. P53 ist somit das am häufigsten mutierte Gen in allen menschlichen Tumoren (Hollstein et al., 1991b; Olivier et al., 2002). Die größte Datenbank über p53-Mutationen ist die der International Agency for Research on Cancer (IARC), in der heute mehr als 24800 Mutationen bekannt sind (www.iarc.fr).

1.2.2 Struktur und Lokalisation von p53

Das humane p53-Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17, auf der Bande 17p13.1 (Isobe et al., 1986; McBride et al., 1986). Es umfasst eine Region von 20303 bp und besteht aus 11 Exons, von denen das erste nicht kodierend ist, und 10 Introns (Lamb und Crawford, 1986).

Das p53-Protein ist ein nukleares Phosphoprotein, das ein Molekulargewicht von 53000 Dalton hat und aus 393 Aminosäuren besteht. Es bindet DNA-Sequenzen, die Wiederholungen des Motivs RRRC(A/T)-(T/A)GYYY entsprechen [wobei R ein Purin (Base A oder G) und Y ein Pyrimidin (Base C oder T) ist; el-Deiry et al., 1992]. Das Protein lässt sich in fünf strukturelle und funktionelle Regionen aufteilen (siehe auch Abbildung 2):

- Der N-terminalen Domäne (Aminosäuren 1-44) werden transkriptionsaktivierende Eigenschaften zugeschrieben.
- Dem folgt ein prolinreicher, regulatorischer Teil (Aminosäuren 63-97).
- In der Mitte liegt eine Domäne, die für die sequenzspezifische DNA-Bindung zuständig ist (Aminosäuren 102-292).
- Es folgt eine Domäne, die für die Oligomerisierung verantwortlich ist (Aminosäuren 323-356).
- Der multifunktionelle C-terminale Teil (Aminosäuren 363-393) wirkt aufgrund seiner eigenen Struktur stabilisierend auf den Mittelteil und ist in die Regulation der DNA-Bindung involviert.

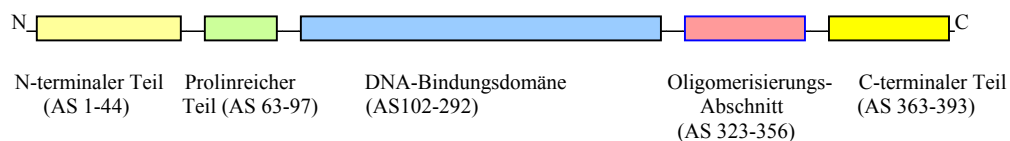


Abbildung 2: Lineare Darstellung der fünf strukturellen und funktionellen Domänen des p53-Proteins.

Die Kristallstruktur des p53-Proteins wurde erstmals 1994 beschrieben (Cho et al., 1994). Die Struktur ist aufgeteilt in ein β -Sandwich-Gerüst und eine DNA-bindende Oberfläche, die aus einer Schleifenblattspirale (loop-sheet-helix = LSH) und zwei Schleifen (L2 und L3), die durch ein Zink-Atom verbunden sind, besteht. Das p53-Protein hat in normalen Zellen nur eine sehr kurze Halbwertszeit von maximal 45 Minuten.

1.2.3 Funktionen von p53

Das Tumorsuppressorgen p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der vielfältige Funktionen hat. Entscheidende Bedeutung hat p53 bei der Regulation des Zellzyklus, des programmierten Zelltods (Apoptose), der DNA-Replikation und -Reparatur. Ebenso spielt es eine wichtige Rolle bei der Differenzierung, Entwicklung und Seneszenz und ist an der Stabilität des Genoms beteiligt (Hainaut und Hollstein, 2000; Vousden und Lu, 2002).

P53 fungiert dabei als eine Art Schlüsselprotein. Durch DNA-Schädigung (z.B. durch Röntgen-, UV- oder Gammastrahlung), zytotoxische Substanzen und Onkogenaktivierung akkumuliert p53 und wird aktiviert (Kuerbitz et al., 1992; Nelson und Kastan, 1994).

P53 reguliert die Transkription von sogenannten „downstream“ Genen, den p53-Zielgenen, dadurch kann p53 seine oben genannten Funktionen beeinflussen (Hainaut und Hollstein, 2000; Bullock und Fersht, 2001; Bykov und Wiman, 2003).

Insgesamt ist es vermutlich ein komplexes Zusammenspiel mehrerer hundert verschiedener Gene, die durch p53 up- und downreguliert werden (Zhao et al., 2000). Zusammenfassend ist der Schutz des Genoms die Hauptaufgabe von p53. Es wird als „Wächter über das Genom“ bezeichnet: p53 hilft der Zelle, chromosomale Schäden durch Zellzyklusarrest zu reparieren oder falls dies nicht möglich ist, die Zelle in die Apoptose zu führen (Lane, 1992; Hartwell und Kastan, 1994).

In dieser Eigenschaft als „Wächter des Genoms“ ist das p53-Gen eines der am häufigsten von genetischen Veränderungen betroffenen Gene in bösartigen Tumoren überhaupt. Je nachdem welcher Bereich des p53-Gens von genetischen Veränderungen betroffen ist, können zwei Arten von p53-Mutationen unterschieden werden, die DNA-Kontakt- und Strukturmutationen. Als eine Kontaktmutation werden Mutationen bezeichnet, die DNA-interagierende Bereiche betreffen und als Strukturmutationen solche Mutationen, die der Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur dienen. Die DNA-Kontaktmutationen korrelierten in einigen Studien mit einem schlechteren Ansprechen auf adjuvante Therapien und mit verkürzter rezidivfreier Überlebenszeit sowie verringerter Gesamtüberlebenszeit (Erber et al., 1998; Bosch et al., 1999).

1.3 Fragestellung

Aus den Erörterungen in der Einleitung über das Tumorsuppressorgen p53 und über Karzinome des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs ergeben sich folgende Fragestellungen, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind:

- Welches Mutationsspektrum an p53-Mutationen in Tumoren des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs ergibt sich in unserem Patientenkollektiv?
- Gibt es Unterschiede im p53-Mutationsspektrum zwischen den beiden Haupthistologien, den Plattenepithel- und Adenokarzinomen?
- Gibt es Assoziationen zwischen klinischen Parametern, wie Alkohol- und Nikotingenuss, und p53-Mutationen?
- Welchen Einfluss haben p53-Mutationen auf die Überlebenszeit und Prognose?

2. Material

2.1 Untersuchungsmaterial

Das gesamte Material für die vorliegende Arbeit entstammt von Patienten der Abteilung für Gastroenterologie der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Dabei wurde Biopsien von Patienten mit einem Karzinoms des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs (Typ I nach Siewert), die sich einer Gastroskopie unterzogen, entnommen. Die gewonnenen Tumorgewebeprobe wurden durch Dr. Frank Noack, Institut für Pathologie, mikroskopisch angeschaut und auf ihren Tumorzellanteil hin begutachtet. Des Weiteren wurden die klinischen Daten wie Alter, Geschlecht, Nikotin- und Alkoholkonsum, TNM-Klassifikation, Tumorlokalisation und – differenzierung, Histologie, Therapie und Überleben erfasst. Alle Patienten mussten über Studie und Design aufgeklärt werden und ihr Einverständnis geben. Das Studienprotokoll wurde mit dem Ethikvotum mit dem Aktenzeichen: 02-098 am 30.10.2002 genehmigt. Die entnommenen Tumorgewebeprobe wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Eine dauerhafte Lagerung in einer -80°C Kühltruhe schloss sich an. In einem zweiten Versuchsteil wurden Tumorgewebe verwendet, die in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet bei Raumtemperatur gelagert wurden.

2.2 Chemikalien

• Agarose I	Amresco, USA
• Aqua bidest	Delta Select, Pfullingen
• Borsäure	Sigma, Deisenhofen
• Chloroform	Merck, Darmstadt
• DEPC	Sigma, Deisenhofen
• DMSO	Sigma, Deisenhofen
• EDTA	Sigma, Deisenhofen
• Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck, Darmstadt
• Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
• Ethidiumbromid, Stock Solution	Amresco, USA
• Glycerin	Sigma, Deisenhofen
• Isopropanol p.a.	Merck, Darmstadt

• Magnesiumchlorid	Invitrogen, USA
• Methylenblau	Merck, Darmstadt
• Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
• Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
• SDS	Sigma, Deisenhofen
• Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
• TRIzol	Invitrogen, USA
• Tween 20	Merck, Darmstadt
• Xylol	Merck, Darmstadt

2.3 Lösungen und Puffer

- Probenauftragspuffer: 6*Loading Dye Solution (Invitrogen, USA)
- 10*PCR Reaction Buffer (Invitrogen, USA)
- 50*TAE: 2 M Tris-Base, 1 M Essigsäure, 0,5 M EDTA; pH 8
- 10*TBE: 1340 mM Tris-Base, 450 mM Borsäure, 25 mM EDTA; pH 8,3-8,7
- TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (Na₂, 2*H₂O); pH 8,0

2.4 Enzyme

• Taq DNA Polymerase	Invitrogen, USA
• Proteinase K	Invitrogen, USA
• Thermosteuerase	Amersham, Braunschweig

2.5 Primer

2.5.1 Auswahl der Oligonukleotide

Mit Ausnahme der Standardprimer M13Uni und M13Rev wurden alle Primer nach der bekannten genomischen Sequenz des humanen p53-Gens (Rozemuller et al., 2001, NCBI-Genbank, Accession No. U-94788) ausgewählt. Sie wurden bei der Firma MWG-Biotech, Ebersberg synthetisiert und nach den folgenden Kriterien ausgewählt:

- Die Primerpaare sollten annähernd einen gleichen Schmelzpunkt haben, damit bei

der PCR die optimale Annealing-Temperatur für beide Primer genutzt werden kann.

- Der CG-Gehalt sollte ungefähr gleich sein und zwischen 40-60 % liegen.
- Die Primer-Länge sollte ungefähr gleich sein, meist 18-21 mer.
- Alle Primer sollten im Intronbereich liegen.

Zur Auswahl der Primer wurden verschiedene Computerprogramme (Primer Design PRIDE 1.2, DKFZ Heidelberg und Oligo 4.1 Primer Analysis Software, National Biosciences, USA) benutzt.

Einige der Primer wurden am 5'-Ende mit der Sequenz der Standardprimer M13Uni und M13Rev gekoppelt („tailed“-Primer). Das hatte den Vorteil, dass die Standardbasenfolge als Primer für die anschließende Sequenzierung genutzt werden konnte.

Die Primer für die Sequenzierung wurden lyophilisiert (5'-IRD 800-Markierung) bestellt.

Im Folgenden sind die Basenfolgen der einzelnen Oligonukleotide aufgelistet. In Klammern ist die Lokalisation im p53 Gen (nach Rozemüller et al., 2001) angegeben.

2.5.2 Primer für die PCR

- 1. PCR: Exon 5-9

E5f1: 5'- TAT CTG TTC ACT TGT GCC CTG - 3' (13001-13021)

E9r1: 5'- CGG CAT TTT GAG TGT TAG AC - 3' (14815-14796)

- 2. PCR: Exon 5-6 „nested“

M13U-E5:5'-M13Uni-CAC TTG TGC CCT GAC TTT CAA C - 3' (13009-13030)

M13R-E6:5'-M13Rev-CCA CTG ACA ACC ACC CTT AAC - 3' (13487-13467)

- 2. PCR: Exon 7-9 „halfnested“

E7f1: 5'- GCT TGC CAC AGG TCT CCC CAA G - 3' (13940-13961)

E9r1: 5'- CGG CAT TTT GAG TGT TAG AC - 3' (14815-14796)

2.5.3 Primer für die Sequenzierung

- Exon 5 und 6:

M13Uni: 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3'

M13Rev: 5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC - 3'

- Exon 7:

E7f2: 5` - TCA TCT TGG GCC TGT GTT ATC - 3` (13973-13993)

E7r1: 5` - GCA CAG CAG GCC AGT GTG CAG - 3` (14150-14130)

- Exon 8 und 9:

E8f1: 5` - CCT TAC TGC CTC TTG CTT CTC - 3` (14413-14483)

E9r2: 5` - CCA CTT GAT AAG AGG TCC C - 3` (14785-14767)

2.5.4 Primer für die mikrodisektierten Proben

Erste PCR:

- Exon 5:

SE51: 5` - GCC GTG TTC CAG TTG CTT TAT - 3` (12983-13003)

AE51: 5` - AAT CAG TGA GGA ATC AGA GGC - 3` (13311-13291)

- Exon 6:

SE61: 5` - AGA GAC GAC AGG GCT GGT T - 3` (13257-13275)

AE61: 5` - AAA GCC CCC CTA CTG CTC A - 3` (13515-13497)

- Exon 7:

SE71: 5` - TTG CCA CAG GTC TCC CCA A - 3` (13942-13960)

AE71: 5` - AGA AAT CGG TAA GAG GTG GGC - 3` (14200-14180)

- Exon 8:

SE81: 5` - TTT CCT TAC TGC CTC TTG CTT - 3` (14410-14430)

AE81: 5` - TAA CTG CAC CCT TGG TCT CCT - 3` (14636-14616)

- Exon 9:

SE91: 5` - AAG GGT GCA GTT ATG CCT CAG - 3` (14624-14644)

AE91: 5` - ATG CCC CAA TTG CAG GTA AA - 3` (14851-14832)

„nested“-PCR:

- Exon 5:

SE52: 5` - M13Uni - TTG TGC CCT GAC TTT CAA CT - 3` (13012-13031)

AE52: 5` - M13Rev - AAC CAG CCC TGT CGT CTC T - 3` (13275-13257)

- Exon 6:

SE62: 5` - M13Uni - CCA GGC CTC TGA TTC CTC - 3` (13287-13304)

AE62: 5` - M13Rev - CCA CTG ACA ACC ACC CTT AA - 3` (13487-13468)

- Exon 7:

SE72: 5` - M13Uni - AGG CGC ACT GGC CTC ATC TT - 3` (13960-13979)

AE72: 5` - M13Rev - TGT GCA GGG TGG CAA GTG GC - 3` (14136-14117)

- Exon 8:

SE82: 5` - M13Uni - TCT TGC TTC TCT TTT CCT AT - 3` (14423-14442)

AE82: 5` - M13Rev - TTG TCC TGC TTG CTT ACC TC - 3` (14605-14586)

- Exon 9:

SE92: 5` - M13Uni - CTT TTA TCA CCT TTC CTT GC - 3` (14650-14669)

AE92: 5` - M13Rev - CGG CAT TTT GAG TGT TAG AC - 3` (14815-14796)

Sequenzierung:

- Standardprimer M13Uni: 5` - TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3`

- Standardprimer M13Rev: 5` - CAG GAA ACA GCT ATG ACC - 3`

2.6 Reagenzien für die Sequenzierung

• A, C Mixes	Amersham, Braunschweig
• Borsäure	Sigma, Deisenhofen
• Chill out wax	Biozym, Hess. Oldendorf
• DMSO	Sigma, Deisenhofen
• EDTA	Sigma, Deisenhofen
• Rapid gel XL (40%)	Amersham, Braunschweig
• Sequitherm excel	Biozym, Hess. Oldendorf
• SSB	Amersham, Braunschweig
• Stop/Loading Puffer	Amersham, Braunschweig
• Thermosteasenase	Amersham, Braunschweig
• TMAC	Sigma, Deisenhofen
• Tris	Sigma, Deisenhofen
• Urea	USB, USA
• 0,45 µm Filter, Milliex-HA	Millipore, Eschborn

2.7 Sonstige Materialien

- Glasküvetten Hassa, Lübeck
- Objektträger Super Frost Plus Menzel, Braunschweig
- Probenröhrchen:
 - 15 ml, 50 ml Sarstedt, Nürnberg
 - 1,5 ml Mikroschraubröhren Sarstedt, Nürnberg
 - Biosphere Microtubes 1,5/2 ml Sarstedt, Nürnberg
 - PCR-Streifen 0,2 ml Greiner, Frickenhausen
 - Deckelkette für 0,2 ml Gefäßkette Greiner, Frickenhausen
 - PCR Tubes 0,2 ml mit Deckel Eppendorf, Hamburg
- Pipettenspitzen:
 - 10 µl, 100 µl, 1000 µl Greiner, Frickenhausen
 - Biosphere Filter Tips 10/100/1000 µl Sarstedt, Nürnberg

2.8 Verwendete Geräte

- Analysenwaage: AK 160 (Mettler, Giessen)
- Flachbrett-Gelelektrophorese-Apparatur:
 - The Unbreakable Horizontal Minigel System (Owl Scientific Inc., USA)
- Gelschlitten EASY-CAST™ Electrophoresis System:
 - Modell #B2 und Modell#B1A (WTW, Weilheim)
- Mikroliterpipetten (Eppendorf Hamburg)
- Mikroskop BH 2 (Olympus, Hamburg)
- Sequenziergerät: DNA Sequencer model 4000L (LI-COR, USA)
- Spannungsquelle für die Gelelektrophorese:
 - Model 200/0.0 Power Supply (BIO-RAD, München)
- Thermoblock TB1 (Biometra, Göttingen)
- Thermocycler: T Gradient, T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen)
- UV-Photoanlage: FLX-20M (Vilber Loumat, Frankreich)
- Vortex: REAX 2000 (Heidolph, Schwabach)
- Wasserbad: SW-20C (Julabo, Seelbach)
- Wärmeschrank UT 6200 (Heraeus, Hannover)

- Zentrifugen:

Biofuge 22R und Biofuge A (Heraeus, Hannover),

4K10 (Sigma, Osterode)

2.9 Klinische Daten

In der folgenden Tabelle sind die gesammelten klinischen Daten der 103 Patienten mit einem Karzinom des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs aufgelistet:

Fall-Nr.	Biopsie-Nummer	Geschlecht	Alter bei ED	TNM-Klassifikation			Stadium	Histologie	Grading	Alkoholkonsum	Nikotingenuss	Verlauf	Mutation
				T	N	M							
1	Ös29Tu	1	71	3	1	0	3	1	3	3	1	1	2
2	Ös27Tu	1	50			1	4	1		4	1	1	2
3	Ös118Tu	2	70	3	1		3	1	2	1	1	0	2
4	Ös75Tu	2	55	3	1	0	3	1	3	1	1	1	2
5	Ös39Tu	1	61	3	1	0	3	1	2	1	1	2	2
6	Ös24Tu	1	57	3	1		3	1	3	1	1	1	2
7	Ös34Tu	2	62	4	1	1	4	2	3	1	1	1	2
8	Ös88Tu	1	61					1	3	3	1	1	1
9	Ös21Tu	1	60	1	0	0	1	1	2	2	3	2	1
10	Ös87Tu	1	68	3	1	0	3	1	2	1	1	1	1
11	Ös33Tu	2	84	2	1	0	2	2	3	4	2	1	1
12	Ös12Pa	1	65					1	2	1	1	1	1
13	Ös02Tu	2	45	3	1	1	4	1	3	1	1	1	1
14	Ös22Tu	2	65	2	1	0	2	1	2	2	1	2	0
15	Ös30Tu	1	53	4	1	0	3	1	3	1	3	1	0
16	Ös84Tu	1	64	3	1	1	4	2	3	1	1	1	1
17	Ös80Tu	1	46	4	1	0	3	1	3	2	1	1	1
18	Ös86Tu	2	78	1	2	1	4	2	2	3	1	0	1
19	Ös19Tu	1	72	2	2	0	2	1	2	3	1	2	1
20	Ös36Tu	2	45	4	1		3	1	2	3	1	2	1
21	Ös13Pa	1	66	4	1	1	4	1	3	1	1	1	2
22	Ös97Tu	1	78	4	0	0	3	1	3	3	2	1	1
23	Ös76Tu	1	70					2	3	4	3	1	1
24	Ös125Tu	2	59	4	1		3	1		2	1	2	1
25	Ös08Tu	2	58	3	1		3	2	2	3	1	2	1
26	Ös104Tu	1	53	3	1		3	1	2	2	1	2	0
27	Ös94Tu	1	62	3	0	0	2	2	2	3	2	2	1
28	Ös127Tu	2	78	3	1	1	4	1	2	3	3	2	1
29	Ös09Tu	1	60	3	2	1	4	2	2	3	3	1	1
30	Ös07Tu	1	68	4	1	0	3	1	2	1	2	2	1
31	Ös10Tu	1	81	3	1		3	2	2	4	3	1	1
32	Ös11Pa	1	58		1		3	1	3	1	1	1	1
33	Ös113Tu	2	74			1	4	1	3	3	1	1	1
34	Ös123Tu	1	80					2	3	3	2	0	1
35	Ös08Pa	1	53	4	1	0	3	1	2	3	1	2	1
36	Ös46Tu	1	70	4	1	0	3	1	2	1	1	1	1

Fall-Nr.	Biopsie-Nummer	Geschlecht	Alter bei ED	TNM-Klassifikation			Stadium	Histologie	Grading	Alkoholkonsum	Nikotingenuss	Verlauf	Mutation
				T	N	M							
37	Ös35Tu	1	90	1			1	2	3	4	2	0	1
38	Ös14Tu	1	51	1	0	0	1	2	3	2	1	2	1
39	Ös119Tu	1	45	3	1	0	3	1	3	2	1	2	1
40	Ös133Tu	1	69	3	1	1	4	1	3	3	1	2	0
41	Ös52Tu	1	65	3	1	0	3	1	3	2	1	1	1
42	Ös117Tu	1	66	4	1		3	1	2	1	1	1	1
43	Ös108Tu	1	66	3	1	1	4	1	3	3	3	1	0
44	Ös126Tu	1	47	4	1	0	3	1	2	1	1	2	0
45	Ös15Tu	1	69	4	1	0	3	1	3	1	3	1	0
46	Ös26Tu	1	59	4	1	1	4	1	3	1	1	1	0
47	Ös13Tu	1	41	4	1	0	3	2	3	1	1	1	0
48	Ös129Tu	1	61	3	1	1	4	2	2	1	1	2	0
49	Ös45Tu	1	67	3	1		3	2	3	1	3	2	0
50	Ös93Tu	1	64	4	1		3	1	3	1	1	2	0
51	Ös95Tu	1	72	4	0	1	4	2	3	3	3	1	0
52	Ös109Tu	1	72	3	1		3	1	3	3	1	2	0
53	Ös89Tu	2	56	4	1	0	3	1	2	1	1	1	0
54	Ös135Tu	1	69					1	3	2	3	2	0
55	Ös110Tu	1	65	4	2	1	4	2	3	3	3	2	0
56	Ös122Tu	1	56	2	0	0	2	2	2	3	2	2	0
57	Ös136Tu	1	66					1		1	1	2	0
58	Ös91Tu	2	45	4	1		3	1	2	2	1	1	0
59	Ös42Tu	1	74	2	2	0	2	1	3	1	3	1	0
60	Ös47Tu	1	55	4	2	0	3	1	2	1	1	0	0
61	Ös120Tu	1	67	3	1	0	3	2	3	3	1	2	0
62	Ös04Tu	1	63	3	1	1	4	1	2	1	1	1	0
63	Ös05Tu	1	54	4	1	1	4	2	2	3	2	1	0
64	Ös54Tu	2	69	3	2	1	4	1	3	1	3	1	0
65	Ös85Tu	2	55					1	3	1	1	1	0
66	Ös100Tu	2	62	3	0		2	2	3	3	3	2	0
67	Ös44Tu	1	72	3	2	0	3	2	3	2	2	0	0
68	Ös99Tu	1	63			1	4	2	3	3	3	1	0
69	Ös10Pa	1	64			1	4	1	3	4	1	1	0
70	Ös14Pa	1	49	3	1	0	3	1	2	4	2	1	0
71	Ös16Tu	1	66	3	1		3	1		1	3	1	0
72	Ös31Tu	1	76	3	1		3	1	3	2	1	1	0
73	Ös132Tu	2	79	3	0	0	2	1	2	3	2	2	0
74	Ös111Tu	1	43	3	1	0	3	1	3	1	1	2	0
75	Ös121Tu	1	65	3	1	0	3	1	2	1	3	2	0
76	Ös37Tu	2	77	4	1	0	3	1	3	4	2	2	0
77	Ös103Tu	1	62	3	1		3	1	3	1	1	0	0
78	Ös115Tu	1	77	3	1	1	4	1	3	2	3	2	0
79	Ös98Tu	2	60	4	1	0	3	1	2	2	1	2	0
80	Ös134Tu	2	76	3	1	0	3	1	3	1	1	2	0
81	Ös116Tu	1	63	3	1	1	4	1	3	2	3	2	0
82	Ös106Tu	1	62	4	1	0	3	1	3	2	1	1	0
83	Ös12Tu	1	68	2	1	1	4	1	3	1	1	1	0
84	Ös102Tu	1	55	4	1	1	4	2		2	2	2	0
85	Ös23Tu	1	67	3	1	1	4	2	3	1	3	2	0

Fall-Nr.	Biopsie-Nummer	Geschlecht	Alter bei ED	TNM-Klassifikation			Stadium	Histologie	Grading	Alkoholkonsum	Nikotingenuss	Verlauf	Mutation
				T	N	M							
86	Ös107Tu	1	66	2	0		2	2	2	3	3	2	0
87	Ös105Tu	1	76	3	1	0	3	2	3	2	1	1	0
88	Ös114Tu	1	48	2	1	0	2	2	3	3	3	2	0
89	Ös81Tu	1	79			1	4	2	3	3	3	1	0
90	Ös03Tu	1	55	2	3	0	2	2	3	3	3	1	0
91	Ös32Tu	1	82	3	1	0	3	2	1	3	1	1	0
92	Ös101Tu	1	47	4	1	1	4	1	2	1	1	1	0
93	Ös90Tu	1	44	4		0	3	1	3	1	1	1	0
94	Ös83Tu	1	80	4	1	0	3	2	2	3	3	1	0
95	Ös41Tu	1	59	3	1		3	1	3	1	1	0	0
96	Ös20Tu	1	58	3	1		3	1	2	1	1	1	0
97	Ös66Tu	2	74	4	1		3	1	3	1	2	0	0
98	Ös124Tu	1	41	3	1	0	3	1	3	4	1	2	0
99	Ös130Tu	1	72	2	0	0	2	2	3	2	1	2	0
100	Ös131Tu	1	74	3	1	0	3	2	3	2	2	2	0
101	Ös74Tu	1	66	4	1		3	1	2	2	1	1	0
102	Ös112Tu	2	64	3	1	0	3	2	3	2	1	1	0
103	Ös11Tu	1	62	4	1		3	1	3	1	1	1	0

Tabelle 2: Übersicht über die klinischen Daten.

(Erläuterungen: fortlaufende Fall-Nummerierung; Biopsie-Identifikationsnummer; Geschlecht: 1= männlich, 2= weiblich; Alter bei Tumorerstdiagnose; TNM-Klassifikation: T= Primärtumorausdehnung, N0= keine Lymphknoten befallen, N1= Lymphknotenbefall, M0= keine Fernmetastasen, M1= Fernmetastasierung; Tumorstadium; Histologie: 1= Plattenepithelkarzinom, 2= Adenokarzinom; Grading: 1= gut, 2= mäßig, 3= gering differenziert; Lehrzeichen = keine Angaben vorhanden; Alkoholkonsum: 1= >100g/d, 2= 40 bis 100g/d, 3= <40g/d, 4= Nichttrinker; Nikotingenuss: 1= Raucher, 2= Nichtraucher, 3= Exraucher mehr als 2 Jahre; Verlauf: 0= unbekannt, 1= Patient verstorben, 2= Patient lebt; Mutationsstatus: 0= keine Mutation, 1= Patient mit einer Mutation und 2= Patienten mit mehreren Mutationen)

3. Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde DNA aus Biopsien aus Tumorgewebe von Patienten mit einem Karzinom des Ösophagus oder gastroösophagealen Übergangs extrahiert. Zunächst wurde die DNA aus den Proben isoliert. Dann wurden die Exons 5 bis 9 des p53-Gens mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend direkt sequenziert. In einem zweiten Versuchsteil wurde exemplarisch die Methodik auf archiviertes Gewebe von Ösophaguskarzinomen übertragen.

Insgesamt wurde die DNA von 103 Patienten mit einem Karzinom des Ösophagus oder gastroösophagealen Übergangs analysiert.

3.1 Isolation von Nukleinsäuren

Die Tumorbiopsien (50-100 mg Gewebe) wurden mit 1 ml TRIzol versetzt, homogenisiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 200 µl Chloroform dazu pipettiert. Das Gemisch wurde geschüttelt und bei Raumtemperatur für 2-3 min inkubiert. Dann wurde das Gemenge für 15 min mit 12000*g bei 4°C zentrifugiert. Dabei bildete sich ein farbloser Überstand, der die RNA, und eine rote untere Phase, die die DNA enthielt. Der Überstand wurde in ein anderes Röhrchen überführt, die RNA wurde isoliert und anschließend bei -70°C gelagert.

Die DNA enthaltende, untere Phase wurde bis zur weiteren Isolierung bei -70°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden zur unteren Phase 300 µl Ethanol abs. dazu gegeben. Nach Mischen durch Invertieren erfolgte eine Inkubation für 2-3 min bei Raumtemperatur. Nach der anschließenden Zentrifugation für 5 min mit 2000*g bei 4°C wurde die den Überstand bildende Phenol-/Ethanol-Phase verworfen.

Während einer Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurde das Pellet mit 1 ml 0,1 M Na-Citrat in 10 % Ethanol unter permanentem Schwenken gewaschen. Durch erneute Zentrifugation für 5 min bei 2000*g bei 4°C wurde das Pellet wieder von der flüssigen Phase abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde dann einmal wiederholt.

Nun wurden 1,5 ml 75 % Ethanol dazu pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 10-20 min unter häufigem Invertieren. Anschließend wurde für 5 min mit 2000*g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde für 5-10 min luftgetrocknet. Dann wurden 100 µl einer 8 mM Natronlauge zugefügt. Unter

Erwärmen auf 60°C (10 min im Wasserbad) wurde das Pellet gelöst. Die gelöste DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis.

3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.2.1 Das Prinzip der PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung sequenzspezifischer DNA-Fragmente. Sie wurde in den 80er Jahren von Karl Mullis erdacht (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988). Das Prinzip der PCR lässt sich wie folgt beschreiben: Man denaturiert zunächst die doppelsträngigen DNA-Templates (typischerweise für 5min bei 94°C/ 95°C). An die Templates lagern sich am 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereiches spezifische Oligonukleotidmoleküle (Primer) an (Annealing). Dabei ist der Primer I komplementär zum Plusstrang des Beginns des zu amplifizierenden Fragmentes, Primer II entspricht dem Ende des Plusstrangs, so dass sie an beiden freien Enden des interessierenden Fragmentes spezifisch an den jeweiligen komplementären DNA-Einzelstrang hybridisieren. Zur Anlagerung der Primer wird der Ansatz auf 40-60°C abgekühlt. Die optimale Annealing-Temperatur wird im Einzelfall experimentell ermittelt und liegt etwa 3°C unter der mittleren Schmelztemperatur (T_m -Werte) der Primer. Die Schmelztemperatur wird nach der folgenden Formel berechnet: $T_m = 4x (G+C) + 2x (A+T)$, wobei A, C, G und T die Anzahl der Basen im Primer darstellen. Sie ist die Temperatur, bei der die Hälfte der Primer an die einzelsträngige DNA binden würden. Die Primer werden nach Erhitzen auf 72°C von einer thermostabilen DNA-Polymerase (hier Taq DNA Polymerase) in Anwesenheit freier Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs) in 5'-3'-Richtung verlängert (Elongation). So entstehen zwei DNA-Doppelstränge (dsDNA). Anschließend wird die DNA wieder denaturiert, diesmal für 30 Sekunden. Der Zyklus von Denaturierung, Annealing und Elongation wird 20-35 mal wiederholt, wodurch sich die DNA-Fragmente exponentiell vermehren. Abschließend findet für 5-7 Minuten eine sogenannte terminale Elongation statt mit dem Ziel, alle Doppelstränge zu vervollständigen. Die PCR wird vollautomatisch in programmierbaren Thermocyclern durchgeführt.

Im Folgenden wird auf die Durchführung der PCR im Rahmen dieser Arbeit eingegangen. Nach der DNA-Extraktion aus den Tumorbiopsien wurde zunächst eine erste PCR durchgeführt. Aus diesem PCR-Produkt wurden zwei weitere PCR-Fragmente generiert.

3.2.2 Erste PCR

Fast alle in einem Tumor gefundenen Punktmutationen am p53-Gen findet man in den Exons 5-9. Aus diesem Grunde wurde ein 1814 bp großes DNA-Fragment des p53-Gens, das die Exons 5 bis 9 umfasst, amplifiziert. Dazu wurde folgender PCR-Ansatz auf Eis hergestellt:

10xReaktionspuffer	5,0 µl
MgCl ₂	2,0 µl
dNTP (10 mM)	1,0 µl
Primer E5f1 (20 µM)	2,5 µl
Primer E9r1 (20 µM)	2,5 µl
Taq DNA Polymerase (1,25 U)	0,25 µl
H ₂ O	31,75 µl

Es wurden 5,0 µl der hergestellten DNA (vergl. 3.1.) untergemischt und das Reaktionsgemisch wurde unter den folgenden Reaktionsbedingungen im Thermocycler inkubiert:

94°C	5 min
94°C	30 s)
62°C	30 s)
72°C	1 min) 35 Zyklen
72°C	7 min
4°C	halten

Anschließend wurde das PCR-Produkt auf einem 2-prozentigen Agarose-Gel mit einem Längenstandard verglichen und das Gel in einer UV-Lichtanlage dokumentiert (vergl. 3.3.).

Dieses PCR-Produkt diente als Template für zwei verschiedene „Sub-PCR“, eine „nested“ PCR (Exons 5 und 6, 478 bp) und eine „halfnested“ PCR (Exons 7-9, 875 bp).

Bei allen PCR-Reaktionen (erste PCR, „nested“-PCR und „halfnested“-PCR) wurden Kontrollen auf Kontaminationen mit Fremd-DNA angesetzt, indem ein Reaktionsansatz pipettiert wurde, bei dem die DNA durch aqua bidest ersetzt wurde (Negativkontrolle).

3.2.3 „nested“-PCR

Eine nested PCR basiert auf dem Prinzip zweier verschachtelter Polymerasekettenreaktionen. Aus der Zielsequenz der ersten PCR wird in der zweiten, der so genannten nested PCR, ein Teilstück des ersten PCR-Produktes amplifiziert. Dieses Vorgehen erhöht die Sensitivität und Spezifität der Methode.

Bei dieser PCR wurden Primer verwendet, an deren 5'-Ende eine Standardprimersequenz (M13Uni und M13Rev) angehängt wurde („tailed“ Primer). Diese Standardprimer kamen dann bei der Sequenzierung zum Einsatz (vergl. 3.4.).

Die beiden Primer M13UE5 und M13RE6 umfassen die Exons 5 und 6. Zur Generierung dieses 478 bp großen DNA-Fragmentes wurde folgender PCR-Ansatz auf Eis hergestellt:

10xTBE	5,0 µl
dNTP (10mM)	1,0 µl
Primer M13UE5 (20 µM)	0,75 µl
Primer M13RE6 (20 µM)	0,75 µl
Taq DNA Polymerase (1,25 U)	0,25 µl
H ₂ O	39,75 µl

Es wurden 2,5 µl des ersten PCR-Produktes (vergl. 3.2.2) untergemischt und das Reaktionsgemisch unter den folgenden Reaktionsbedingungen im Thermocycler inkubiert:

95°C	1 min	
95°C	30 s)
48+2°C	30 s)
72°C	1 min, 10 s) 3 Zyklen
95°C	30 s)
56°C	30 s)
72°C	1 min, 10 s) 12 Zyklen

72°C	5 min
4°C	halten

Anschließend wurde das PCR-Produkt auf einem 2-prozentigen Agarose-Gel mit einem Längenstandard verglichen und das Gel in einer UV-Lichtanlage dokumentiert (vergl. 3.3.).

3.2.4 „halfnested“-PCR

Im Unterschied zur „nested“-PCR binden bei der so genannten „halfnested“-PCR nicht beide Primer innerhalb des ersten PCR-Produktes, sondern nur einer der Primer. Der zweite Primer ist identisch mit einem der beiden aus der ersten PCR. In dieser Arbeit wurde der Primer E9r1 sowohl für die erste PCR, als auch für die „halfnested“-PCR eingesetzt. Der Primer E7f1 bindet innerhalb des ersten PCR-Produktes. Die Primer umfassen ein 875 bp großes Fragment, das die Exons 7-9 des p53-Gens enthält. Zur Generierung dieses DNA-Fragmentes wurde folgender PCR-Ansatz auf Eis hergestellt:

10xReaktionspuffer	5,0 µl
MgCl ₂	2,0 µl
dNTP (10 mM)	1,0 µl
Primer E7f1 (20 µM)	1,0 µl
Primer E9r1 (20 µM)	1,0 µl
Taq DNA Polymerase (1,25 U)	0,25 µl
H ₂ O	38,75 µl

Es wurden 1,0 µl des ersten PCR-Produktes (vergl. 3.2.2) untergemischt und das Reaktionsgemisch unter den folgenden Reaktionsbedingungen im Thermocycler inkubiert:

94°C	5 min
94°C	30 s)
65°C	30 s)
72°C	1 min) 20-35 Zyklen
72°C	7 min
4°C	halten

Anschließend wurde das PCR-Produkt auf einem 2-prozentigen Agarose-Gel mit einem Längenstandard verglichen und das Gel in einer UV-Lichtanlage dokumentiert (vergl. 3.3.).

3.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung von geladenen Teilchen (z.B. DNA) im elektrischen Feld. Sie ist abhängig von der Gesamtnettoladung, Größe und Gestalt der Moleküle. Die Gelelektrophorese wurde zur Kontrolle der richtigen DNA-Größe, des Reinheitsgrades und der Mengenbestimmung der PCR-Produkte genutzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Agarose-Gele mit einer Agarose-Konzentration von 2 % hergestellt. Zunächst wurde die Agarose eingewogen und dann in 1**TAE*-Puffer durch Aufkochen in einer handelsüblichen Mikrowelle gelöst. Die Lösung wurde auf ca. 60°C abgekühlt. Anschließend wurde pro 50 ml Lösung 1,0 µl Ethidiumbromid dazu pipettiert. Die Lösung wurde nun zum Gelieren in Gelschlitten mit einer Taschenschablone gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel mit 1**TAE*-Puffer übergossen.

Die PCR-Produkte wurden mit 6**Loading Dye Solution* im Verhältnis 6:1 gemischt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Die Laufzeit der Gele variierte zwischen 45 min bis zu 2,5 h, je nach zu erwartender Fragmentgröße.

Anschließend wurden die Gele in einer UV-Photoanlage bei 312 nm UV-Licht dokumentiert. Dazu nutzt man die Eigenschaft des Ethidiumbromids, zwischen die Basen der DNA zu interkalieren und nach Anregung durch UV-Licht sichtbare orangefarbene Strahlung zu emittieren. Die DNA-Banden wurden dann durch Vergleich mit einem DNA-Längestandard (Molekular Weight Marker VII und VIII, Fa. Boehringer Mannheim) identifiziert.

3.4 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde in Anlehnung an die Didesoxyukleotid-Methode von Sanger (Sanger et al., 1977) mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Primern (Smith et al., 1987) durchgeführt. Erstbeschreiber der Zyklus-Sequenzierung sind Sears (Sears et al., 1992) und Slatko (Slatko, 1994). Hierbei verlängert eine DNA-Polymerase die Primer mit den vier dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) entlang einer einzelsträngigen Matrize in einer Sequenzreaktion. Je einem von vier Ansätzen ist ein Didesoxynukleotid (ddATP,

ddCTP, ddGTP, ddTTP) zugesetzt. Der zufällige Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTP) anstelle von dNTPs führt zu einem Kettenabbruch. Es entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, die auf einem Gel mit getrennten Spuren für alle vier Nukleotide aufgetrennt und mit einem Automaten ausgewertet werden.

Im Folgenden wird auf die Durchführung der Sequenzierung im Rahmen dieser Arbeit eingegangen. Dazu wurde zunächst ein so genannter Mastermix mit 26 µl Gesamtvolumen, bestehend aus:

2-4 µl PCR-Produkt
2-4 µl Primer (0,5 mM)
1,0 ml DMSO
ad 26 µl aqua bidet,

hergestellt und durch kurzes Anzentrifugieren vermischt. Dann wurden in vier Mikroreaktionsgefäße je 2,0 µl ddA-, ddC-, ddG- oder ddT-Mix (Amersham) pipettiert. Dazu wurden je 5,6 µl des Mastermix pipettiert. Zum Schluss wurde der Reaktionsansatz mit einem Tropfen „Chill out wax“ überschichtet. Das Reaktionsgemisch mit den Primern M13Uni, M13Rev, E7f2 oder E7r1 wurde unter den folgenden Reaktionsbedingungen im Thermocycler inkubiert:

95°C	2 min, 45 s
95°C	15 s)
55°C	15 s)
70°C	15 s) 12 Zyklen
95°C	20 s)
54°C	20 s)
70°C	20 s) 13 Zyklen
95°C	40 s
4°C	halten

Für die Sequenzierung der Exons 8 und 9 (Primer E8f1 oder E9r2) wurde die PCR unter den folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

95°C	2 min, 45 s
95°C	15 s)
60°C	15 s)
70°C	15 s) 12 Zyklen
95°C	20 s)
59°C	20 s)
70°C	20 s) 13 Zyklen
95°C	40 s
4°C	halten

Am Ende wird die Reaktion mit 6,0 µl Stop-Solution beendet und bis zur Analyse auf Eis gekühlt.

Die Proben wurden auf einem denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde nach Anleitung (MWG-Biotech Europe) hergestellt (41 cm Rapid Gel XL, 0,25 mm):

Rapid Gel XL Sol 40%	7,5 ml
Urea	21,0 g
10*TBE, Long Run Buffer	5,0 ml
aqua bidest	28,0 ml
TEMED	75,0 µl
10% APS	350,0 µl

Das Gemisch wurde in einer großen Spritze aufgezogen, entlüftet und durch eine 0,2 µm Filtermembran zwischen zwei die Gelkammer bildenden Glasplatten gegossen, die zum so genannten „gel sandwich“ zusammengesetzt worden waren. Das Gel wurde mit einer Taschenschablone versehen und für zwei Stunden zum Polymerisieren horizontal gelagert. Dann wurde es in den DNA-Sequenzer (LI-COR) eingesetzt und mit 1*TBE (Long Run Buffer) übergossen. Nach der Kalibrierung des Lasers begann der Vorlauf zur Entfernung von Verunreinigungen, die die Sequenzierung stören könnten. Nach etwa 20 min wurde der Vorlauf unterbrochen und die Proben für die Sequenzierung wurden in der Basenfolge A-C-G-T in die Taschen des Gels pipettiert. Das Gel lief unter den folgenden Bedingungen über Nacht (ca. 12 Stunden):

Temperatur	45°C
Spannung	1500 V
Leistung	40 W
Stromstärke	35 mA

Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte zunächst automatisiert mit Hilfe des „Quick-Sequence-IR“-Programms (MWG Biotech Europe). Die Gele mit den DNA-Banden wurden photographiert und durch das Computerprogramm Image Analysis 4.0 (LI-COR) ausgewertet. Dabei wird die Fluoreszenzintensität der Basen verglichen und so die Basenfolge ermittelt.

Die Ergebnisse der automatischen Auswertung wurden überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Dazu wurde ein Modus des Computerprogramms genutzt, bei dem die Basenfolge in Form eines Chromatogramms vorliegt. Dabei wird die Intensität der Fluoreszenz als Peak dargestellt und jeder Base wird eine andere Farbe zugeordnet. Zuerst wurde die Sequenz der beiden komplementären Einzelstränge miteinander verglichen. Anschließend wurden die beiden Einzelstränge mit der Originalsequenz aus der Genbank abgeglichen.

3.5 PCR und Sequenzierung von mikrodisektierten Proben

In einem zweiten Versuchsteil wurde exemplarisch DNA aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Blöcken von Patienten mit einem Karzinom des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs isoliert. Dafür wurde nur Tumormaterial verwendet, das einen Tumoranteil von mehr als 70 % aufwies. Es wurde ebenfalls die Exons 5-9 des p53-Gens sequenziert.

3.5.1 Aufbereitung der Gewebe vor der PCR

Zur besseren Ausbeute der DNA-Menge wurden Schnitte mit einer Dicke von 10 µm verwendet; auf eine Fixierung wurde verzichtet. Zur Entparaffinisierung wurden die Objektträger mit den anhaftenden Gewebeschnitten zunächst in einen Trockenschrank bei 60°C für 2 h gestellt. Anschließend wurden sie für 10 min in Xylol gelegt. Danach kamen die Schnitte für nochmals 2 min in ein zweites Glas mit Xylol. Anschließend wurden sie nacheinander für jeweils 2 min in 100 % Ethanol abs., in nochmals 100 % Ethanol abs., in

96 % Ethanol abs. und in 70 % Ethanol abs. gelegt. Nach 2 min in aqua bidest wurden die Objektträger in Methylenblau für 5-8 min gefärbt und anschließend in aqua bidest bis zur Mikrodissektion gelagert. Unter einem Mikroskop wurden dann die interessierenden Tumoreale eingestellt und diese wurden mit einer feinen Nadel ausgekratzt. Die Zellen wurden in eine Lösung aus 30 µl TE-Puffer und 0,5 µl 0,5 % Tween 20 überführt, die zusätzlich 0,5 µl 100 µg/ml Proteinase K enthielt. In diesem Gemisch wurden die Zellen für 1 h im Thermoblock bei 56°C verdaut. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde der Zellverdau für 10 min im Wasserbad gekocht. Nach abschließendem Abzentrifugieren wurde der Zellverdau für die erste PCR eingesetzt.

3.5.2 Erste PCR der mikrodisektierten Proben

Im Unterschied zur der in 3.2.2. beschriebenen ersten PCR wurde nicht der gesamte Bereich von der Exons 5-9 amplifiziert, sondern jedes Exon wurde einzeln amplifiziert, so dass pro Tumorprobe fünf der folgenden Ansätze hergestellt wurde:

10xReaktionspuffer	5,0 µl
MgCl ₂	2,0 µl
dNTP (10 mM)	1,0 µl
Primer I (20 µM)	2,5 µl
Primer II (20 µM)	2,5 µl
Taq DNA Polymerase (1,25 U)	0,25 µl
H ₂ O	31,75 µl

Es wurden 5,0 µl des hergestellten Zellverdaus (vergl. 3.5.1.) untergemischt und das Reaktionsgemisch wurde unter den folgenden Reaktionsbedingungen im Thermocycler inkubiert:

94°C	5 min
94°C	30 s)
61° bzw. 65°C	30 s)
72°C	1 min) 35 Zyklen
72°C	7 min
4°C	halten

Für die Amplifikation der Exons 5, 8 und 9 wurde ein Annealingtemperatur von 61°C, für die Exons 6 und 7 von 65°C gewählt. Im Anschluss an die PCR wurde das PCR-Produkt auf einem zweiprozentigen Agarose-Gel mit einem Längenstandard verglichen und das Gel in einer UV-Lichtanlage dokumentiert (vergl. 3.3.).

Es wurde eine zweite PCR („nested“-PCR) unter Verwendung von „tailed“-Primer durchgeführt.

3.5.3 „nested“-PCR der mikrodisektierten Proben

Es wurde folgender PCR-Ansatz auf Eis hergestellt:

10xTBE	5,0 µl
dNTP (10mM)	1,0 µl
Primer I (20 µM)	0,75 µl
Primer II (20 µM)	0,75 µl
Taq DNA Polymerase (1,25 U)	0,25 µl
H ₂ O	39,75 µl

Es wurden 2,5 µl des ersten PCR-Produktes (vergl. 3.5.2.) untergemischt. Die PCR wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen, wie in 3.2.3. beschrieben, durchgeführt.

Anschließend wurde das PCR-Produkt auf einem 2-prozentigen Agarose-Gel mit einem Längenstandard verglichen und das Gel in einer UV-Lichtanlage dokumentiert (vergl. 3.3.).

3.5.4 Sequenzierung der mikrodisektierten Proben

Die Sequenzierung wurde, wie unter 3.4. beschrieben, durchgeführt. Allerdings wurden im Unterschied zur in 3.4. beschriebenen Methode nur zwei Primer verwendet: M13Uni und M13Rev.

3.6 Statistik

Alle klinischen Daten (Geschlecht, Alter, Histologie, TNM-Klassifikation, Grading, Alkohol- und Nikotinkonsum) wurden mit dem p53-Mutationsprofil verglichen. Die

Mutationshäufigkeiten wurden mit dem 95 %-Confidenzintervall angegeben. Mit Hilfe des Fishers Exakt-Testes wurden mögliche Assoziationen zwischen binären Variablen untersucht. Der Effekt von p53-Mutationen und klinischen Daten auf das Überleben wurden durch das Cox proportional Hazard-Model untersucht und das Überleben wurde mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Des Weiteren wurden die Daten unserer Studie mit denen der p53-Mutationsdatenbank der International Agency for Research on Cancer (IARC) verglichen. Diese Datenbank ist die weltweit größte Sammlung von p53-Mutationen. Beim Ösophaguskarzinom sind 1279 Fälle über p53-Mutationen beim Plattenepithelkarzinom und 260 Fälle beim Adenokarzinom aus der ganzen Welt beschrieben. Aufgrund der geringen Fallzahlen in den Untergruppen unserer Studie wurde auf die Verwendung von multivariaten Analysen verzichtet. Die statistischen Analysen erfolgten nach einer eingehenden Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck durch Fr. Dr. I. König, die einen Teil der Analysen dankenswerterweise selber durchgeführt hat.

4. Ergebnisse

4.1 Allgemeine Bemerkungen

Bei 103 Patienten mit einem Karzinom des Ösophagus und des gastroösophagealen Übergangs wurden Tumorgewebeproben und klinischen Daten gesammelt. Aus den Tumorbiopsien wurde die DNA isoliert. Die Exons 5 bis 9 des p53-Gens wurden amplifiziert, anschließend sequenziert und auf Mutationen hin untersucht. Im folgenden Teil werden die Ergebnisse der PCR und der Sequenzierung dargestellt und die klinischen Daten der Patienten ausgewertet.

4.2 PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion wurden die Exons 5 bis 9 des p53-Gens amplifiziert. Die genaue Zusammensetzung der Reaktionsgemische, die optimalen Temperatur- und Programmschritte der PCR sind im Methodenteil nachzulesen.

In den folgenden Abbildungen sind die für diese Arbeit genutzten PCR-Produkte beispielhaft in zwei Agarosegelen zu sehen:

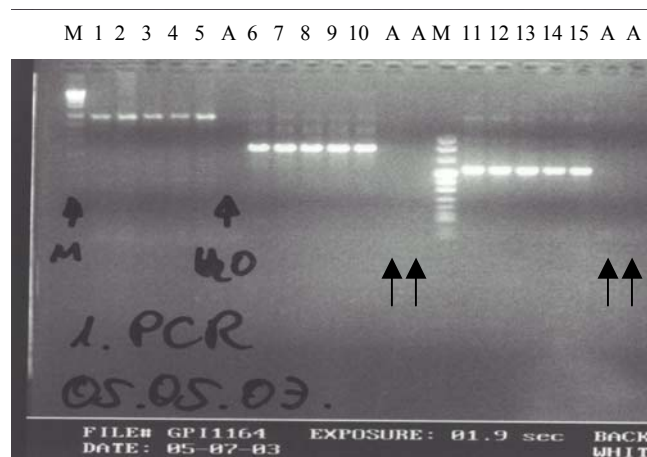


Abbildung 3: PCR-Produkte vom p53-Gen im 2-prozentigen Agarosegel.

Spuren von links nach rechts: DNA-Längenmarker VII (= M; Fa. Böhlinger), Spuren 1-5 mit den Exons 5-9 von verschiedenen Tumorbiopsien (1814 bp; erste PCR;), Negativkontrolle der ersten PCR (A = aqua), Spuren 6-10 mit den Exons 7-9 (875 bp; Sub-PCR „halfnested“, bei der die in den Spuren 1-5 dargestellten PCR-Produkte als Templates dienten), zwei Negativkontrollen der halfnested PCR (A, Doppelpfeile), DNA-Längenmarker VIII (M, Fa. Böhlinger), Spuren 11-15 mit den Exons 5-6 (478 bp; Sub-PCR „nested“, bei der die in den Spuren 1-5 dargestellten PCR-Produkten als Template dienten) und zwei Negativkontrollen der nested PCR

(A, Doppelpfeile). Bei den Negativkontrollen der Sub-PCR wurde im ersten Ansatz die Negativkontrolle der ersten PCR verwendet. In der zweiten Negativkontrolle der Sub-PCR wurde aqua bidest zum Reaktionsansatz gegeben.

Das zweite Agarosegel (Abbildung 4) zeigt unter anderem die PCR-Produkte einer mikrodissektierten Tumorbiopsie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde exemplarisch die DNA aus in Paraffin eingebetteten Tumorbiopsien des Ösophagus isoliert. Anschließend wurden die Exons 5-9 des p53-Gens amplifiziert und sequenziert. Einzelheiten dazu sind dem Abschnitt 3.5. zu entnehmen.

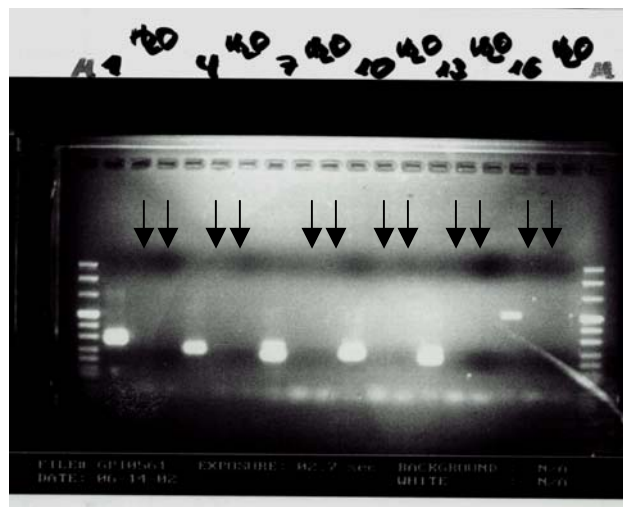


Abbildung 4: PCR-Produkte vom p53-Gen im 2-prozentigen Agarosegel.

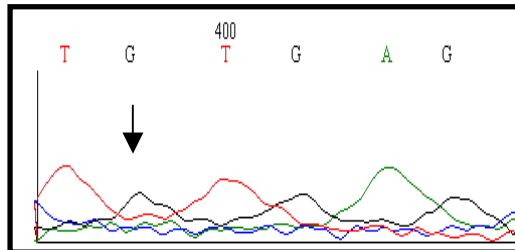
Spurenauftrag von links nach rechts. In den Spuren rechts und links außen (M) ist jeweils der DNA-Längenmarker (VIII, Fa. Böhlinger; 0,037-1,114 kbp) aufgetragen. In den Spuren 1, 4, 7, 10 und 13 wurden die PCR-Produkte der Sub-PCR („nested PCR“) einer mikrodissektierten Probe aufgetragen. Diese PCR-Produkte wurden dann direkt für die Sequenzierung verwendet. Spur 1: Nested-PCR-Produkt, welches das Exon 5 umfasst (263 bp). Spur 4: Exon 6 (200 bp). Spur 7: Exon 7 (176 bp). Spur 10: Exon 8 (182 bp). Spur 13: Exon 9 (165 bp). In der Spur 16 ist die amplifizierte DNA einer Tumorbiopsie aus Frischgewebe aufgetragen (Nested-PCR-Produkt, Exons 5-6, 478 bp). Mit den Pfeilen sind die jeweils zur Tumorprobe gehörenden Negativkontrollen gekennzeichnet. In der ersten Negativkontrolle diente die Negativkontrolle der ersten PCR als „Template“. Bei der zweiten Negativkontrolle wurde aqua bidest zu dem Mastermix der Sub-PCR dazu gegeben.

4.3 Sequenzierung

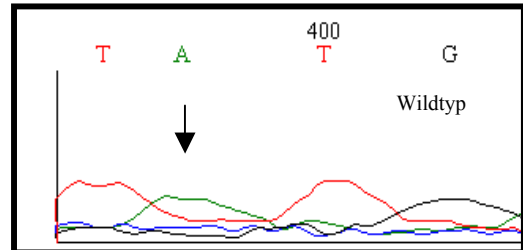
Durch die direkte DNA-Sequenzierung wurden in jeder untersuchten Tumorgewebeprobe die Exons 5-9 des p53-Gens komplett durchsequenziert. Dazu wurden verschiedene Primer benutzt. Eine Übersicht über die verwendeten Primer und deren Nukleinsäuresequenz sind

den Abschnitten 2.4.3. und 2.4.4. zu entnehmen. Jedes Exon wurde von beiden Seiten sequenziert. In jedem der Fälle mit einer gefundenen Mutation ließ sich diese in beiden komplementären Einzelsträngen nachweisen.

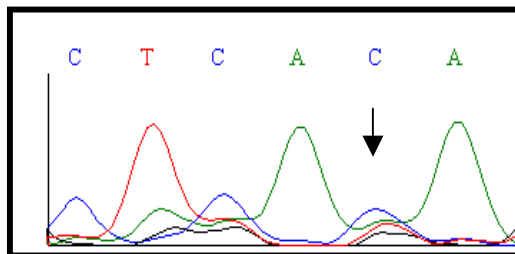
Die nachfolgenden Abbildungen 5 bis 7 zeigen beispielhaft die Chromatogramme einiger gefundener Punktmutationen im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz des p53-Wildtyps:



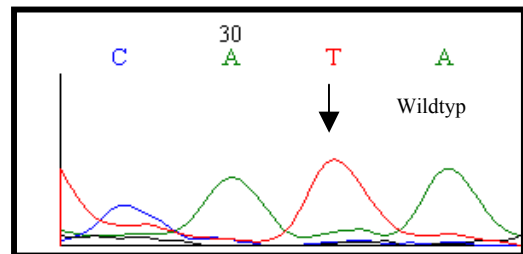
5.a.



5.b.



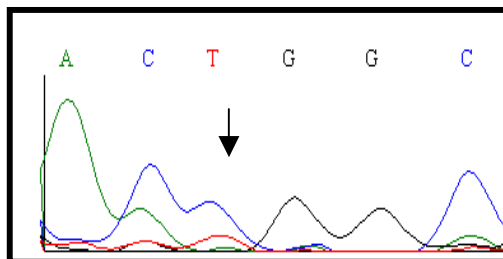
5.c.



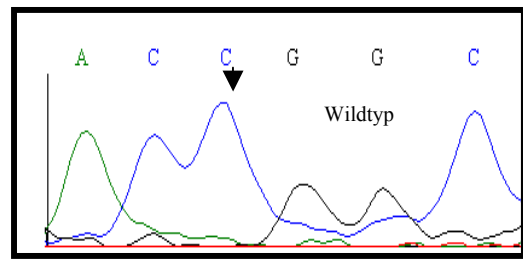
5.d.

Abbildung 5: A:T/G:C - Punktmutation im Codon 220, Exon 6.

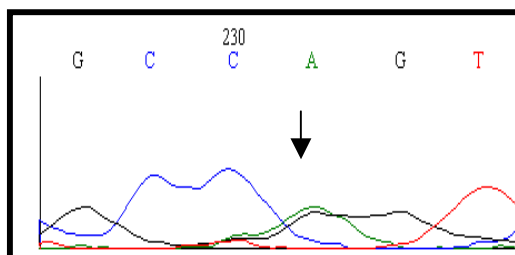
Die Abkürzungen A, C, G und T beziehen sich auf die jeweiligen Nukleotide. Links sind die beiden komplementären Einzelstränge mit einer p53-Mutation zu sehen (5.a. = Hin- und 5.c. = Gegenstrang). Auf der rechten Seite in den Bildern 5.b. (Hinstrang) und 5.d. (Gegenstrang) ist die ursprüngliche Basenfolge des p53-Wildtyps dargestellt. Es resultiert ein Basenaustausch im Codon 220 von ursprünglich TAT zu TGT; dieser wurde mit Hilfe von Pfeilen markiert.



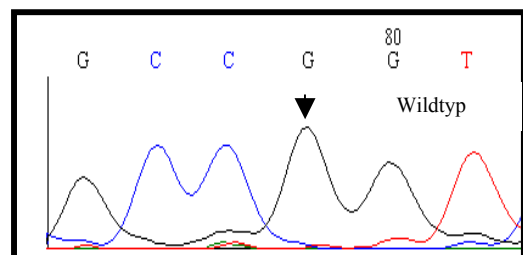
6.a.



6.b.



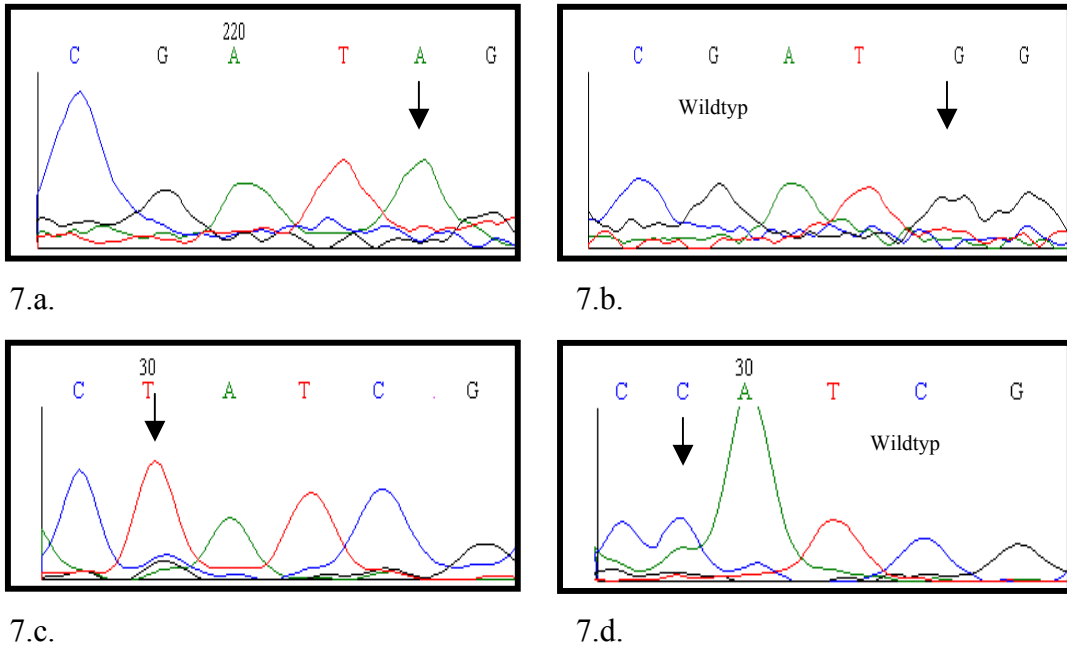
6.c.



6.d.

Abbildung 6: C:G/T:A - Punktmutation im Codon 282, Exon 8.

In den beiden oberen Bildern 6.a. und 6.b. sind die beiden Hinstränge dargestellt, wobei in 6.a. die Mutation und in 6.b. das ursprüngliche Wildtyp-Nukleotid zu sehen ist. Die Bilder 6.c. (p53-Mutation) und 6.d. (p53-Wildtyp) entsprechen den jeweiligen komplementären Gegensträngen. Es resultiert im Codon 282 ein Basenaustausch von ursprünglich CGG zu TGG, dieser wurde mit Pfeilen markiert. Die Abkürzungen A, C, G und T beziehen sich auf die jeweiligen Nukleotide.

**Abbildung 7:** G:C/A:T - Punktmutation im Codon 187, Exon 5.

Die Bilder 7.a. und 7.c. zeigen die Mutation in den beiden komplementären Einzelsträngen. Der entsprechende Hin- und Gegenstrang eines p53-Wildtyps ist in 7.b. bzw. 7.d. zu sehen. Das von dem Basenaustausch betroffene Nukleotid wurde mittels Pfeil markiert. Es ergab sich im Codon 187 ein Basenaustausch von GGT zu AGT.

In der folgenden Tabelle sind alle gefundenen Mutationen in den Exons 5-8 des p53-Gens aufgelistet:

Biopsie-Nummer	Exon	Codon	Mutationstyp	Nukleotid-Austausch	Aminosäuren-Austausch	Mutations-art
Ös10Tu	5	136	A:T/C:G	CAA > CCA	Gln > Pro	
Ös34Tu	5	152	C:G/T:A	CCG > CTG	Pro > Leu	2
Ös104Tu	5	154	C:G/A:T	GGC > GGA	Gly > Gly	4
Ös117Tu	5	155	A:T/C:G	ACC > CCC	Thr > Pro	
Ös 13Pa	5	157	G:C/T:A	GTC > TTC	Val > Phe	
Ös75Tu	5	161	C:G/A:T	GCC > GAC	Ala > Asp	
Ös08Tu	5	175	G:C/A:T	CGC > CAC	Arg > His	1,2
Ös76Tu	5	175	G:C/A:T	CGC > CAC	Arg > His	1,2
Ös39Tu	5	176	G:C/A:T	TGC > TAC	Cys > Thr	1
Ös39Tu	5	185	A:T/C:G	AGC > CGC	Ser > Arg	
Ös11Pa	5	187	G:C/A:T	GGT > AGT	Gly > Ser	

Biopsie-Nummer	Exon	Codon	Mutationstyp	Nukleotid-Austausch	Aminosäuren-Austausch	Mutations-art
Ös94Tu	6	190	C:G/T:A	CCT > CTT	Pro > Leu	
Ös80Tu	6	192	C:G/T:A	CAG > TAG	Glu > stop	
Ös125Tu	6	195	T:A/A:T	ATC > AAC	Ile > Asn	
(Ös22Tu)	6	196	A:T/C:G	CGA > CGC	Arg > Arg	4
Ös36Tu	6	204	A:T/C:G	GAG > GCG	Glu > Ala	
(Ös75Tu)	6	213	A:T/G:C	CGA > CGG	Arg > Arg	4
(Ös133Tu)	6	213	A:T/G:C	CGA > CGG	Arg > Arg	4
Ös07Tu	6	220	A:T/G:C	TAT > TGT	Thr > Cys	
Ös12Pa	6	224	G:C/T:A	GAG > TAG	Glu > stop	
Ös24Tu	7	233	A:T/T:A	CAC > CTC	His > Leu	
Ös84Tu	7	239	C:G/G:C	AAC > AAG	Asn > Lys	
Ös52Tu	7	242	T:A/A:T	TGC > AGC	Cys > Ser	
Ös02Tu	7	245	G:C/T:A	GGC > GTC	Gly > Val	1
Ös29Tu	7	245	G:C/T:A	GGC > GTC	Gly > Val	1
Ös21Tu	7	247	A:T/T:A	AAC > ATC	Asn > Ile	
Ös75Tu	7	257	T:A/A:T	CTG > CAG	Leu > Gln	
Ös27Tu	7	261	A:T/ T:A	AGT > TGT	Ser > Cys	
Ös118Tu	8	266	G:C/C:G	GGA > GCA	Gly > Ala	
Ös19Tu	8	267	C:G/G:C	CGG > GGG	Arg > Gly	
Ös88Tu	8	272	T:A/C:G	GTG > GCG	Val > Ala	
Ös86Tu	8	273	C:G/T:A	CGT > TGT	Arg > Cys	1,2,3
Ös118Tu	8	273	G:C/T:A	CGT > CTT	Arg > Leu	1,3
Ös08Pa	8	273	G:C/A:T	CGT > CAT	Arg > His	1,2,3
Ös13Pa	8	275	G:C/A:T	TGT > TAT	Cys > Tyr	3
Ös119Tu	8	278	C:G/A:T	CCT > CAT	Pro > His	3
Ös127Tu	8	279	G:C/A:T	GGG > GAG	Gly > Glu	3
Ös 09Tu	8	281	G:C/C:G	GAC > CAC	Asp > His	3
Ös46Tu	8	282	C:G/T:A	CGG > TGG	Arg > Trp	1,2,3
Ös97Tu	8	282	C:G/T:A	CGG > TGG	Arg > Trp	1,2,3
Ös123Tu	8	296	C:G/T:A	CAC > TAC	His > Tyr	
Ös14Tu	8	298	A:T/T:A	GAG > GTG	Glu > Val	
Ös27Tu	8	303	A:T/C:G	AGC > CGC	Ser > Arg	
Ös113Tu	8	303	A:T/C:G	AGC > CGC	Ser > Arg	
Ös87Tu	8	305	A:T/T:A	AAG > TAG	Lys > stop	
Ös34Tu	9	314	T:A/G:C	TCC > GCC	Ser > Ala	
Ös35Tu	9	314	T:A/G:C	TCC > GCC	Ser > Ala	
Ös33Tu	9	314	T:A/G:C	TCC > GCC	Ser > Ala	
Ös29Tu	9	314	T:A/G:C	TCC > GCC	Ser > Ala	
Ös24Tu	9	328	C:G/G:C	TTC > TTG	Phe > Leu	
(Ös29Tu)	9	329	C:G/T:A	ACC > ACT	Thr > Thr	4
(Ös30Tu)	9	329	C:G/T:A	ACC > ACT	Thr > Thr	4

Tabelle 3: Übersicht der gefundenen p53-Mutationen

Die Biopsienummer gibt die fortlaufende Nummerierung der gesammelten Proben an, wobei mit dem Zusatz „Tu“ die Frischgewebstumore und mit „Pa“ die mikrodisssektierten Proben gekennzeichnet sind. Bei der Mutationsart stehen die Ziffern 1-4 für: 1 = hot spot-Mutation, 2 = Mutation im CpG-Loci (CpG sind Bereiche, die spontan in C>T- bzw. G>A-Mutationen resultieren können), 3 = Kontaktmutation, 4 = wobble, wo ein Basenaustausch nicht zur Änderung der Aminosäure führte.)

Bei der Sequenzierung wurden 46 Mutationen, davon 9 Kontaktmutationen und 37 Strukturmutationen, und 6 sogenannte wobbles, bei denen ein Basenaustausch nicht zu einer Veränderung der Aminosäure führt, gefunden.

Es ergab sich folgende Mutationsverteilung in den untersuchten Exons 5 bis 9 des p53-Gens:

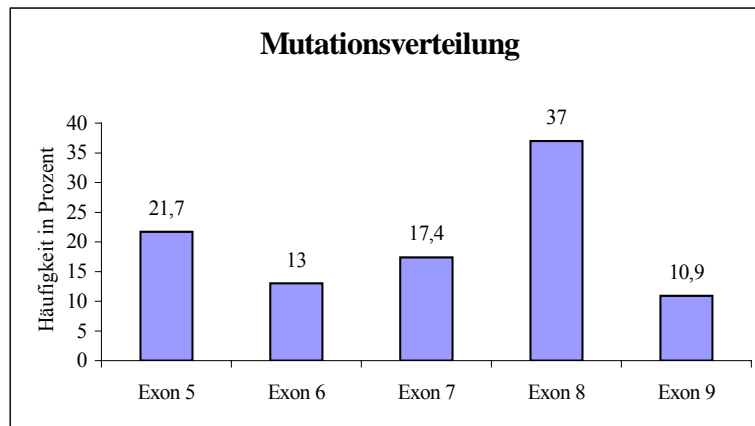


Abbildung 8: p53-Mutationsverteilung in den Exons 5-9.

Die Mutationen waren zu 65,2 % Transversionen (30 von 46) und zu 34,8 % Transitionen (16 von 46). Unter einer Transversion versteht man eine Punktmutation, bei der ein Purin- (A, G) durch einen Pyrimidin-Baustein (C, T) in der DNA ersetzt wird oder umgekehrt. Bei der Transition kommt es zu einem Austausch zwischen Purin-Nukleotiden oder zwischen Pyrimidin-Nukleotiden.

Es ließen sich jeweils zwei gleiche Mutationen in den Codons 175, 245, 282 und 303 nachweisen und im Codon 314 vier gleiche. Drei unterschiedliche Mutationen wurden im Codon 273 gefunden. Im Codon 213 zeigten sich zwei stille Mutationen (sogenannte wobbles), die als Polymorphismen bekannt sind (Bhatia et al., 1992). Zehn Mutationen betrafen Codons, die als hot spot-Mutationen gelten (Hainaut und Hollstein, 2000; Bullock und Fersht, 2001). Die meisten der hot spot-Mutationen liegen in CpG-Bereichen. Diese CpG-Bereiche sind bestimmte Stellen in der Aminosäuresequenz, an denen spontan eine Methylierung stattfinden kann. Dabei können Cytosin und 5-Methylcytosin spontan in Thymin und Uracil durch oxidative Deaminierung ausgetauscht werden, was zu einer C>T- bzw. G>A-Mutation führen kann (Hainaut und Hollstein, 2000). Nur eine Mutation (Ös34Tu, Exon 5, Codon 152) ist eine CpG-Mutation, die nicht in einem hot spot-Codon liegt.

4.4 Auswertung der klinischen Daten

Von den 103 untersuchten Patienten hatten 68 Patienten ein Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (66,0 %) und 35 ein Adenokarzinom des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs (34,0 %).

Bei acht Patienten ließen sich zwei Mutationen (Fälle 1-7 und 21, siehe Tabelle 2 im Abschnitt 2.9) und bei 30 Patienten jeweils eine Mutation nachweisen. Bei 65 Patienten wurden keine Mutationen im untersuchten p53-Abschnitt gefunden. Die Mutationsfrequenz betrug 36,9 %.

Von den 38 Patienten, die eine Mutation im p53-Gen haben, waren 27 Männer (71,0 %). Elf waren Frauen (29,0 %). Die Geschlechterverteilung bei allen 103 Patienten war ähnlich: 80 waren männlichen und 23 weiblichen Geschlechts (77,7 % versus 22,3 %). Vom Mutationsmuster her ließen sich bei den Frauen keine A>T- und C>G-Transversionen nachweisen, während sich bei den Männern 5 A>T- (15,6 %) und 3 C>G-Transversionen (9,4 %) fanden.

Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose des Karzinoms unterschied sich nicht zwischen Patienten mit und ohne p53-Mutation. Es betrug 63,6 Jahre für alle Patienten und 64,4 Jahre für Patienten mit p53-Mutation. Beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus betrug das Durchschnittsalter bei Tumorerstadiagnose 61,8 Jahre für Patienten mit und 62,1 Jahre ohne p53-Mutation. Das mittlere Durchschnittsalter der Patienten mit einem Adenokarzinom betrug 70,0 Jahre bei Patienten mit und 65,1 Jahre bei Patienten ohne p53-Mutation.

Zwölf von insgesamt 35 Patienten mit einem Adenokarzinom hatten eine Mutation im p53-Gen (34,3 %). Beim Plattenepithelkarzinom war der Anteil der p53-Mutationen ähnlich: 26 von 68 Patienten (38,2 %). In den Abbildungen 9 und 10 wurde das gefundene Mutationsmuster getrennt nach der Histologie dargestellt:

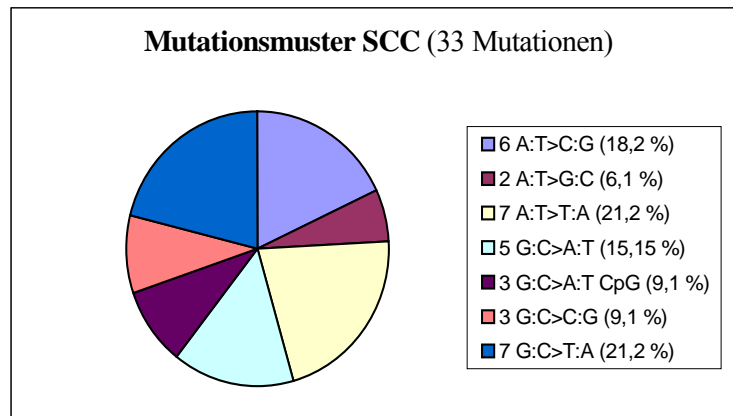


Abbildung 9: Mutationsmuster beim Plattenepithelkarzinom (SCC). Gezeigt werden die verschiedenen gefundenen Mutationsarten beim Plattenepithelkarzinom mit absoluten und relativen (%) Angaben. So fand sich beispielsweise in 18,2 % der 33 gefundenen Mutationen ein Basenaustausch von Adenin zu Cytosin (A:T>C:G-Mutation). Ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin fand sich in 9,1 % innerhalb eines CpG-Bereiches und in 15,15 % außerhalb eines CpG-Bereiches. Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen (Abschnitt 4.4).

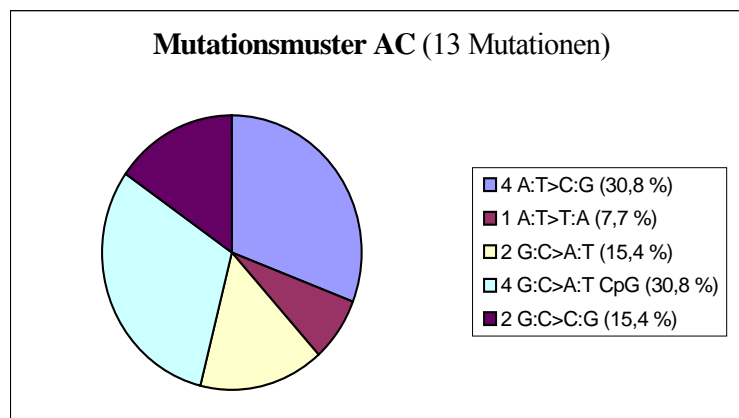


Abbildung 10: Mutationsmuster beim Adenokarzinom (AC). Die 13 gefundenen Mutationen beim Adenokarzinom wurden mit absoluten und relativen (%) Zahlen nach den einzelnen, verschiedenen Mutationstypen aufgeschlüsselt, siehe auch Text, Abschnitt 4.4.

Bei den Adenokarzinomen fanden sich keine G>T-, T>A- und C>A-Transversionen, während sich bei den Plattenepithelkarzinomen 5 G>T- (15,15 %), 3 T>A- (9,1 %) und 2 C>A-Transversionen (6,1 %) nachweisen ließen. Die C>T-Transitionen machten den größten Anteil an Mutationen beim Adenokarzinom aus (30,8 %), während dieser Anteil beim Plattenepithelkarzinom 9,1 % betrug. Den zweitgrößten Anteil beim Adenokarzinom hatten die T>G-Transversionen (23,1 % vs. 3,0 % beim Plattenepithelkarzinom). An dritter Stelle standen die G>A-Transitionen (15,4 %), die beim Plattenepithelkarzinom gleich häufig vorkamen (15,15 %).

Siebzehn der Tumore mit p53-Mutation (44,7 %) waren mäßig differenziert (G2) und 19 (50,0 %) waren gering differenziert. In der gesamten Patientengruppe gab es einen hochgradig differenzierten Tumor (G1), 36 G2-Tumore und 61 G3-Tumore. Undifferenzierte Tumore (G4) fanden sich nicht und bei 5 Patienten waren keine Angaben verfügbar.

Bezüglich der Risikofaktoren für ein Ösophaguskarzinom sind hauptsächlich der Genuss von Tabak und Alkohol zu nennen. Diese spielen vor allem bei der Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms (SCC) eine wichtige Rolle. Fünfzig von 68 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom waren Raucher (73,5 %). Beim Adenokarzinom (AC) waren es signifikant weniger ($p=0,0002$): Nur 34,3 % waren Raucher (12 von 35 Patienten). Die Verteilung zwischen Rauchern und Nichtrauchern getrennt nach den beiden Haupthistologien, Plattenepithel- und Adenokarzinome, zeigt Abbildung 11:

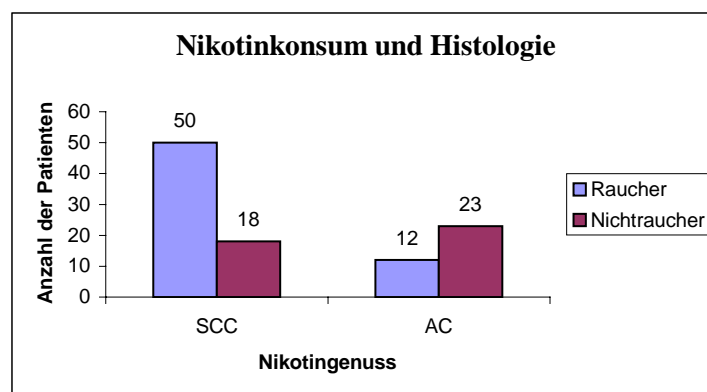


Abbildung 11: Vergleich des Nikotinkonsums mit der Histologie.

Es wurden die absoluten Zahlen der Raucher und Nichtraucher getrennt nach Histologie dargestellt (SCC = Plattenepithelkarzinome, AC = Adenokarzinome). Es zeigten sich signifikant mehr Raucher bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Vergleich zu Patienten mit einem Adenokarzinom ($p=0,0002$).

Von den 38 Patienten mit einer p53-Mutation waren 27 Raucher (71,1 %) und 11 Nichtraucher (28,9 %); bei den Patienten ohne p53-Mutation betrug das Verhältnis zwischen Rauchern und Nichtrauchern 53,85 % zu 46,15 % (Odds Ratio: 2,1; 95% Confidence Intervall: 0,90-4,94), siehe Abbildung 12.

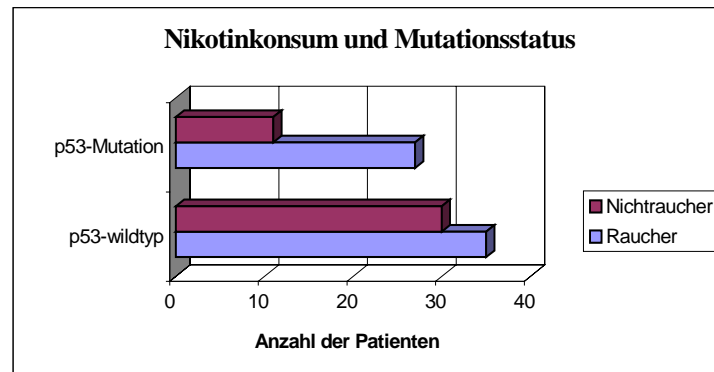


Abbildung 12: Vergleich des Nikotingenusses mit dem Mutationsstatus. Von den 38 Patienten mit einer p53-Mutation rauchten 27, bei den 65 Patienten ohne p53-Mutation waren es 35.

Patienten mit einer Kontaktmutation waren zu 66,7 % Raucher; bei den Strukturmutationen waren 78,4 % Raucher. DNA-Strukturmutationen sind Mutationen, die der Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur dienen. Als DNA-Kontaktmutation werden solche Mutationen bezeichnet, die DNA-interagierende Bereiche betreffen. Eine Korrelation zum Nikotinkonsum fand sich nicht. Zehn Transitionen und 25 Transversionen wurden bei den Rauchern gefunden; bei den Nichtrauchern waren es sechs und fünf. Vom Mutationsmuster her ließen sich bei den Nichtrauchern keine G>T-, T>A-, C>G-, und C>A-Transversionen finden, während sich bei den Rauchern 5 G>T- (14,3 %), 3 T>A- (8,6 %), 3 C>G- (8,6 %) und 2 C>A-Transversionen (5,7 %) nachweisen ließen. Die C>T-Transitionen fanden sich zu 11,4 % bei Rauchern und zu 27,3 % bei den Nichtrauchern.

Der zweite untersuchte Risikofaktor war der Alkoholkonsum. Auch der übermäßige Genuss von Alkohol (mehr als 40 g/d) war signifikant häufiger bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom (51 Trinker, 75,0 % und 17 Nicht-Trinker, 25,0 %). Dreizehn von 35 Patienten mit einem Adenokarzinom tranken mehr als 40 g Alkohol pro Tag (37,1 %), während 62,9 % Nicht-Trinker waren ($p=0,0003$). Als Nicht-Trinker wurden hierbei Patienten mit einem moderatem (< 40 g/d) bzw. keinem Alkoholkonsum bezeichnet. Abbildung 13 zeigt den Alkoholkonsum in Abhängigkeit von den beiden Haupthistologien, den Plattenepithel- und Adenokarzinomen:

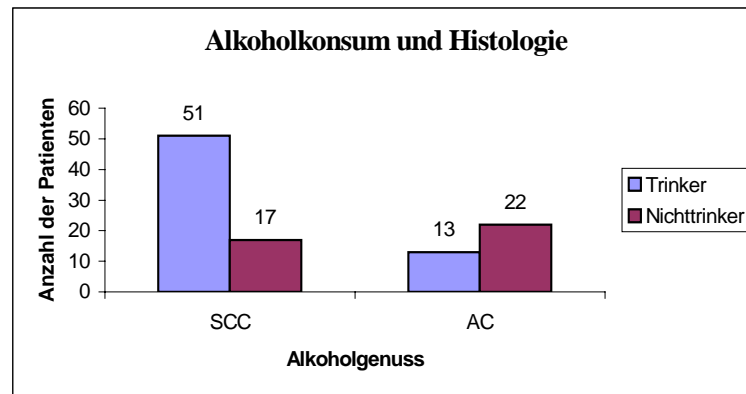


Abbildung 13: Vergleich des Alkoholkonsums mit der Histologie.

Dargestellt wurden die absoluten Zahlen an Patienten mit einem Alkoholkonsum > 40 g/d (Trinker) und mit moderatem/ keinem Alkoholkonsum von < 40 g/d (Nicht-Trinker) aufgeschlüsselt nach Histologie (SCC = Plattenepithelkarzinom, AC = Adenokarzinom). Es zeigte sich ein signifikant häufigerer Alkoholkonsum bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Vergleich zum Adenokarzinom ($p=0,0003$).

Von den 38 Patienten mit einer p53-Mutation waren 20 Trinker (52,6 %) und 18 Nicht-Trinker (47,4 %). Bei den Patienten ohne Veränderung im p53-Gen betrug das Verhältnis 67,7 % Trinker zu 32,3 % Nicht-Trinker (Odds Ratio: 0,53; 95% Confidence Intervall: 0,23-1,21), siehe Abbildung 14.

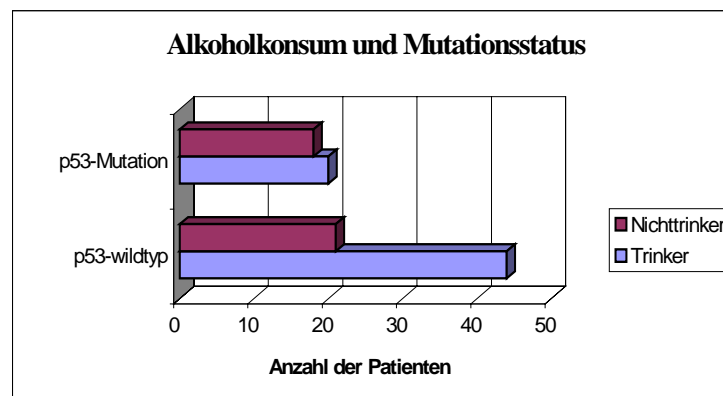


Abbildung 14: Vergleich des Alkoholkonsums mit dem Mutationsstatus.

Von den Patienten mit einer p53-Mutation tranken 20 Patienten mehr als 40 g/d Alkohol, bei den Patienten ohne p53-Mutation waren es 44 Patienten. Einen moderaten (< 40 g/d) bzw. keinen Alkoholkonsum (Nicht-Trinker) hatten 18 Patienten mit und 21 Patienten ohne eine p53-Mutation.

Die Strukturmutationen fanden sich zu 59,5 % bei Trinkern (22 Patienten) und zu 40,5 % bei den Nicht-Trinkern (15 Patienten), bei den Kontaktmutationen waren es 44,45 % zu 55,55 % (4 vs. 5 Patienten). Die Patienten mit einem Alkoholkonsum von mehr als 40 g/d ließen zu 26,9 % eine Transition (7 von 26) und zu 73,1 % eine Transversion (19 von 26)

nachweisen. Bei den Patienten mit einem moderatem (<40 g/d) bzw. keinem Alkoholkonsum waren es 45,0 % zu 55,0 % (9 Transitionen und 11 Transversionen).

Die Risikofaktoren Rauchen und Alkohol wurden zusammen mit den Kriterien Alter, TNM-Stadien, Grading und Histologie zur Bestimmung der Überlebenszeit von Patienten berücksichtigt. Dabei zeigte sich, dass das Stadium bzw. die Tumorgöße (T) die einzige dieser Variablen ist, die die Überlebenszeit vorhersagt (Schätzer: 0,800; SE: 0,239; Hazard Ratio: 2,227). Aufgrund der geringen Fallzahlen wurden dabei die Stadien I und II zusammengefasst. Es wurden 88 Fälle berücksichtigt, von denen 49 Patienten verstorben waren. In der folgenden Abbildung ist die Wahrscheinlichkeit des Überlebens in Abhängigkeit vom Stadium dargestellt:

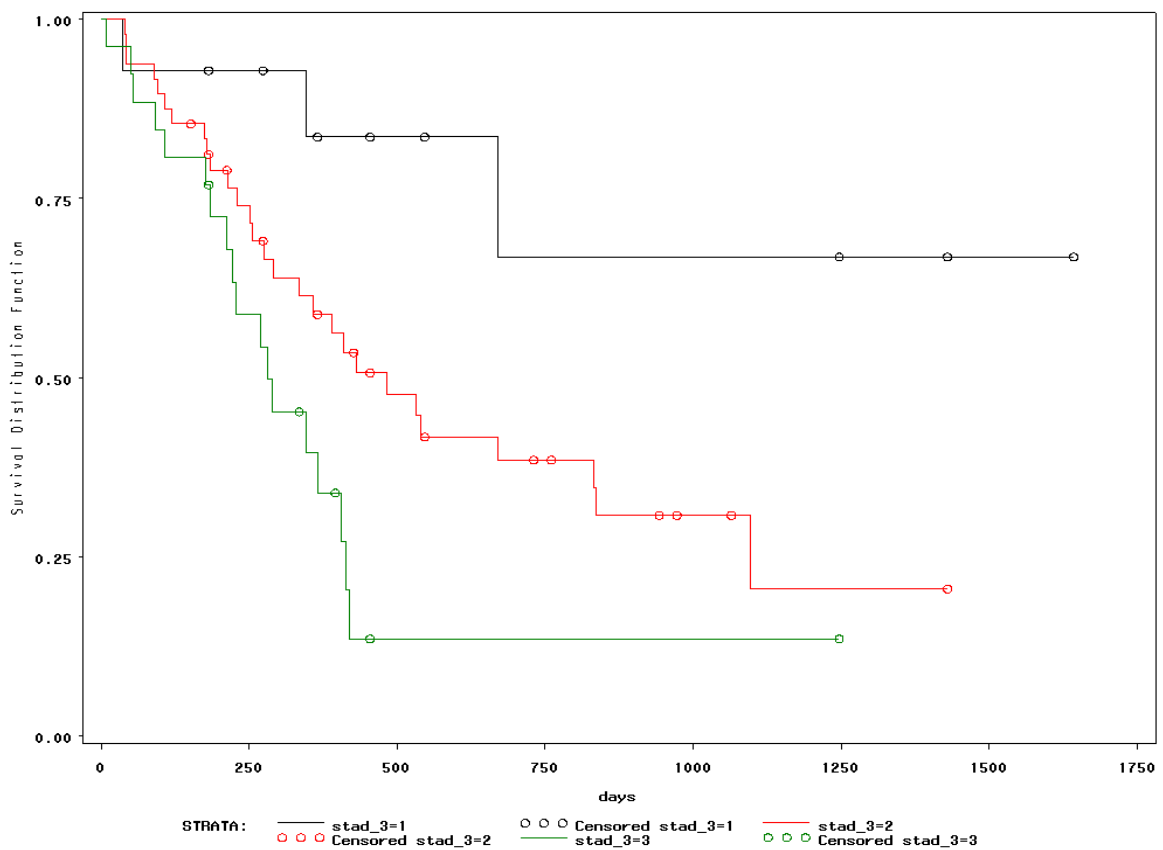


Abbildung 15: Vergleich der Überlebenszeit von Patienten mit den drei Stadiengruppen 1 (entspricht Stadium I+II, schwarze Kurve), 2 (entspricht Stadium III, rote Kurve) und 3 (entspricht Stadium 4, grüne Kurve) mit den dazugehörigen Kaplan-Meier-Kurven. (vertikale Achse: Überlebenswahrscheinlichkeit; horizontale Achse: Überleben in Tagen ab Erstdiagnose)

Das Vorhandensein einer p53-Mutation brachte keinen zusätzlichen Effekt zur Vorhersage der Überlebenszeit. Der Mutationsstatus sagte somit keine Überlebenszeit vorher ($p=0,63$).

4.5 Vergleich mit der IARC-Datenbank

In der weltweit größten p53-Datenbank der International Agency for Research on Cancer (www.iarc.fr) betrug die Mutationsfrequenz der Ösophaguskarzinome 43,1 %. Im Rahmen dieser Arbeit lag die Mutationsfrequenz bei 36,9 %.

In der IARC-p53-Datenbank waren 1279 p53-Mutationen bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und 260 bei Adenokarzinomen verzeichnet. In der folgenden Tabelle wurden für die Plattenepithel- und Adenokarzinome das Mutationsmuster der p53-Mutationen, die in dieser Studie gefunden wurden, sowie die weltweit gesammelten Daten der p53-Mutationen des IARC aufgelistet:

	p53-Mutationen beim SCC		p53-Mutationen beim AC	
	n=33	IARC (n=1279)	n=13	IARC (n=260)
Transitionen	30,30 %	48,0 %	46,15 %	72,5 %
A:T>G:C	6,1 %	10,8 %	0 %	10,3 %
G:C>A:T	15,15 %	18,2 %	15,4 %	16,9 %
G:C>A:T CpG	9,1 %	19,0 %	30,8 %	45,3 %
Transversionen	69,70 %	35,94 %	53,85 %	18,06 %
A:T>C:G	18,2 %	3,51 %	30,8 %	2,69 %
A:T>T:A	21,2 %	7,42 %	7,7 %	4,23 %
G:C>C:G	9,1 %	5,31 %	15,4 %	2,3 %
G:C>T:A	21,2 %	19,7 %	0 %	8,84 %
davon C>A	5,7 %	3,4 %		1,15 %
G>T	15,5 %	16,3 %		7,69 %
Deletionen	0 %	9,53 %	0 %	5 %
Insertionen	0 %	4,76 %	0 %	4,23 %
Tandemmutation	0 %	1,32 %	0 %	0 %

Tabelle 4: Vergleich des p53-Mutationsmusters mit der weltweiten p53-Mutationsdatenbank des IARC getrennt nach der Histologie.

Die Tabelle zeigt für die Plattenepithel- (SCC) und Adenokarzinome (AC) den relativen Anteil der weltweit gefundenen p53-Mutationsarten (aus www.iarc.fr) sowie die entsprechenden Anteile unserer gefundenen p53-Mutationen.

In unserer Studie fanden sich im Gegensatz zu den Daten der p53-Datenbank des IARC weder bei den Plattenepithel- noch bei den Adenokarzinomen Deletionen oder Insertionen. Tandemmutationen bei Adenokarzinomen wurden weder in dieser Arbeit noch weltweit detektiert. Auch bei den Plattenepithelkarzinomen zeigten sich bei uns keine Tandemmutationen, weltweit fanden sich 1,32 %.

Bei den Plattenepithelkarzinomen waren 30,3 % der gefundenen Punktmutationen Transitionen und 69,7 % Transversionen. Weltweit zeigten sich anhand der Daten des IARC etwas häufiger Transitionen als Transversionen (48 % und 35,9 %). Transitionen

fanden sich in 72,5 % aller Adenokarzinome weltweit, bei den Transversionen waren es 18,1 %. In unserer Studie zeigten sich bei den Adenokarzinomen ähnlich viele Transversionen (53,85 %) und Transitionen (46,15 %).

Sowohl in unserer Arbeit als auch in der IARC-Datenbank hatten die für das Rauchen typischen G>T-Transversionen bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus einen fast gleichen Anteil (15,5 % vs. 16,3%). Bei den Adenokarzinomen war weltweit der Anteil an G>T-Mutationen über die Hälfte weniger, während sich anhand unserer Daten keine G>T-Transversionen bei Patienten mit einem Adenokarzinom nachweisen ließen (7,7 % vs. 0 %).

5. Diskussion

Die Ziele der Arbeit waren,

- das Mutationsspektrum von p53-Mutationen in Tumoren des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs in unserem Patientenkollektiv aufzuzeigen,
- auf mögliche Beziehungen zwischen klinischen Parametern, wie Nikotin- und Alkoholgenuss, und p53-Mutationen einzugehen und
- zu untersuchen, ob p53-Mutationen möglicherweise einen Einfluss auf die Überlebenszeit und Prognose haben.

5.1 Methodische Aspekte

In dieser Arbeit wurden verschiedene methodische Aspekte verwendet, um das p53-Mutationsmuster in Patienten mit einem Karzinom des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs zu identifizieren. Aus Frischgewebsbiopsien, die im Rahmen einer Gastroskopie gewonnen wurden, wurde die DNA isoliert, das p53-Gen mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. In einem zweiten Versuchsteil wurde versucht, diese Methode auf in Formalin fixiertes und Paraffin eingebettetes Material zu übertragen. Im nachfolgenden soll auf die PCR und Sequenzierung sowie den Problemen bei der Durchführung eingegangen werden.

5.1.1 PCR

Die Polymerasekettenreaktion wurde von Mullis et al., 1986 und Saiki et al., 1988 entwickelt. Hierbei handelt es sich um eine selektive und sensitive Methode zur In-vitro-Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente.

In dieser Arbeit wurde die DNA aus Frischgewebsbiopsien gewonnen. Zur Mutationsanalyse wurden die Exons 5-9 des p53-Gens mittels PCR amplifiziert. Um eine ausreichende Menge und genügend spezifische DNA zu synthetisieren, wurde eine „nested“ PCR (zweite PCR mit zwei internen Primern) für die Exons 5-6 sowie eine „halfnested“ PCR (zweite PCR mit einem internen Primer und einem Primer der ersten PCR) für die Exons 7-9 durchgeführt.

In einem zweiten Versuchsteil wurde versucht, diese Methode auf Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material zu übertragen. Dazu wurde eine Mikrodisektion von

Tumorgewebe, das einen Tumoranteil von mindestens 70 % aufwies, durchgeführt. Es konnte allerdings nur in 6 von 20 Fällen eine ausreichende Menge an DNA der Exons 5-9 des p53-Gens per PCR gewonnen werden. Ein möglicher Grund für die geringe DNA-Ausbeute könnte sein, dass die DNA in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material häufig in kleinere Sequenzen degradiert ist. Im Gegensatz zu den Frischgewebeproben wurden deshalb auch die Exons 5 bis 9 jeweils einzeln mittels PCR amplifiziert.

Um eine Kontamination mit Fremd-DNA auszuschließen, wurden bei allen PCR-Reaktionen Negativkontrollen mitgeführt. Dazu wurde eine Reaktion mit allen Reagenzien zusammen pipettiert, wobei die DNA durch aqua bidest ersetzt wurde. Des Weiteren wurden die Ergebnisse mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

5.1.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung ist die Methode der Wahl zur Mutationsanalyse. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine direkte Sequenzierung der PCR-Produkte durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Auswertung mit Hilfe von Chromatogrammen der beiden komplementären Einzelstränge im Vergleich zur Originalsequenz. Eigentlich würde man bei den mutierten Proben eine komplett neue Bande an der Stelle im Chromatogramm erwarten, wo der Basenaustausch stattgefunden hat: Im Sinne der Rekombination müsste eigentlich das Wildtyp-Gen verloren gehen (Bullock und Fersht, 2001). Jedoch nur selten war ein komplettes Verschwinden der Wildtyp-Bande zu bemerken. Ein Grund dafür könnte sein, dass einige nicht-maligne Zellen (z.B. normale Ösophagusschleimhautzellen, umgebene Bindegewebszellen oder Zellen des Immunsystems) mit präpariert wurden. Auch kann vor allem in undifferenzierten und sehr weit in der Progression fortgeschrittenen Tumoren eine genetische Heterogenität für die Persistenz des Wildtyp-Gens verantwortlich sein. Des Weiteren ist es ebenfalls möglich, dass in diesen Tumoren nur ein Allel mutiert und das andere Allel noch einen p53-Wildtyp aufweist. Als weiterer Pathomechanismus ist bekannt, dass dominant-negative Aspekte des mutierten Proteins existieren, die zu einem funktionell inaktiven Hetero-Oligomer zwischen Wildtyp und Mutantenprotein führen. Bei den in Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Proben wurde unter mikroskopischer Vergrößerung und Sichtkontrolle gezielt versucht, die Tumorzellen zu gewinnen und die DNA daraus zu isolieren. Dadurch konnte die Präparation nicht-maligner Zellen minimiert werden. In den dazugehörigen Chromatogrammen waren die Wildtyp-Banden auch

deutlich schwächer ausgeprägt (siehe Abbildung 7 im Ergebnisteil mit einer G:C/A:T-Mutation einer mikrodisssektierten Probe im Vergleich zu den Frischgewebsbiopsien in den Abbildungen 5 und 6), so dass die Wildtypbanden am ehesten Ausdruck mitpräparierter nicht-maligner Zellen sind. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der PCR und Sequenzierung der mikrodisssektierten Proben und aufgrund der Tatsache, dass wir auch in den Präparationen der Frischgewebsbiopsien immer genügend Mutationen entdecken konnten, wurde diese Methode nicht auf alle Biopsien angewendet.

5.2 Das Tumorsuppressorgen p53: Seine Funktionen und Veränderungen in menschlichen Tumoren

Bei der Karzinogenese einer Vielzahl von Tumoren, wie zum Beispiel den Ösophaguskarzinomen, spielen Störungen in der Kontrolle von Zellproliferation und Zelldifferenzierung sowie beim kontrollierten Zelltod (Apoptose) auf zellulärer Ebene eine Rolle. Unter den genetischen Veränderungen sind die Überexpression von Protoonkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen entscheidende molekulare Ereignisse, die einen selektiven Wachstumsvorteil sowie eine klonale Expansion während des Mehrstufenprozesses der Karzinogenese ermöglichen. Bekannte Onkogene sind beispielsweise der Epidermal Growth Factor Receptor, Cyclin D1 und die Telomerase. Tumorsuppressorgene, die beim Ösophaguskarzinom eine Rolle spielen, sind beispielsweise p53, p16 und das Retinoblastomgen (Alidina et al., 2004; Olivier et al., 2004). Eines der am besten untersuchten Tumorsuppressorgene ist das p53-Gen, das in fast der Hälfte aller menschlichen Tumore Mutationen aufweist. Im nachfolgenden Teil werden zunächst die Funktionen des p53-Gens beschrieben. Anschließend sollen Ursachen und Mechanismen für Veränderungen im p53-Gen beschrieben werden.

5.2.1 Funktionen von p53

P53 ist ein Transkriptionsfaktor mit vielfältigen Funktionen. Es hat eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation des Zellzyklus, des programmierten Zelltods (Apoptose), der Seneszenz, der Differenzierung und Entwicklung, der DNA-Replikation und -Reparatur und ist an der Stabilität des Genoms beteiligt (Hainaut und Hollstein, 2000; Vousden und Lu, 2002).

P53 in seiner Funktion als Schlüsselprotein liegt inmitten eines komplexen Regelkreises aus Botenstoffen und Effektoren. Unter zellulärem Stress, beispielsweise durch DNA-Schädigung in Form von z.B. Röntgen-, Gamma- oder UV-Strahlung, durch zytotoxische Substanzen und Onkogenaktivierung, kommt es zur zellulären Akkumulation und zur Aktivierung von p53 (Kuerbitz et al., 1992; Nelson und Kastan, 1994). P53 beeinflusst seine oben erwähnten Funktionen durch Regulation der Transkription von so genannten „downstream“-Genen, den p53-Zielgenen (Hainaut und Hollstein, 2000; Bullock und Fersht, 2001; Bykov und Wiman, 2003).

P53 wird auf zellulärer Ebene durch einen negativen Feedback-Mechanismus kontrolliert: Das p53-Zielgen MDM-2 (murine double minute 2) reguliert den p53-Umsatz. In normalen Zellen fördert die p53-abhängige Transkription von MDM-2 die Degradation von p53 (Momand et al., 1992; Oliner et al., 1993).

Durch Onkogenaktivierung (z.B. c-myc) wird das p14ARF (alternative reading frame) Protein induziert. Dieses bindet MDM-2, wodurch die p53-Degradation gehemmt wird. DNA-Schädigung und Chemotherapeutika aktivieren Proteinkinasen, wie z.B. ATM und ATR. Diese bewirken mit Hilfe der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) und der Casein-Kinase II (CKII) einerseits die Phosphorylierung des N-terminalen Endes von p53 und verhindern so die Bindung von MDM-2. Andererseits wird das Carboxyl-Ende von p53 phosphoryliert und dadurch die DNA-spezifische Bindung gesteigert. Auf diese Weise kommt es zur Erhöhung des p53-Gehalts und somit zur Aktivierung der Transkription von p53-Zielgenen. Zu diesen zählen beispielsweise p21WAF1, 14-3-3 σ , FAS, BAX, PUMA, GADD45 und MDM2. P21WAF1 (wild type activating fragment 1) und 14-3-3 σ fördern den Proliferationsarrest in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus durch Inhibition der einiger Cyclin-abhängiger Proteinkinasen (CDK) (el-Deiry et al., 1993; Xiong et al., 1993; Chan et al., 1999). FAS, BAX (Bcl2-associated protein X) und PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) fördern die Apoptose, falls eine DNA-Reparatur nicht mehr möglich ist (Vogelstein et al., 2000). GADD45 (growth arrest and DNA damage-inducible) spielt eine entscheidende Rolle bei der DNA-Reparatur (Kastan et al., 1992). Eine vereinfachte Übersicht der p53-Funktionen zeigt Abbildung 16.

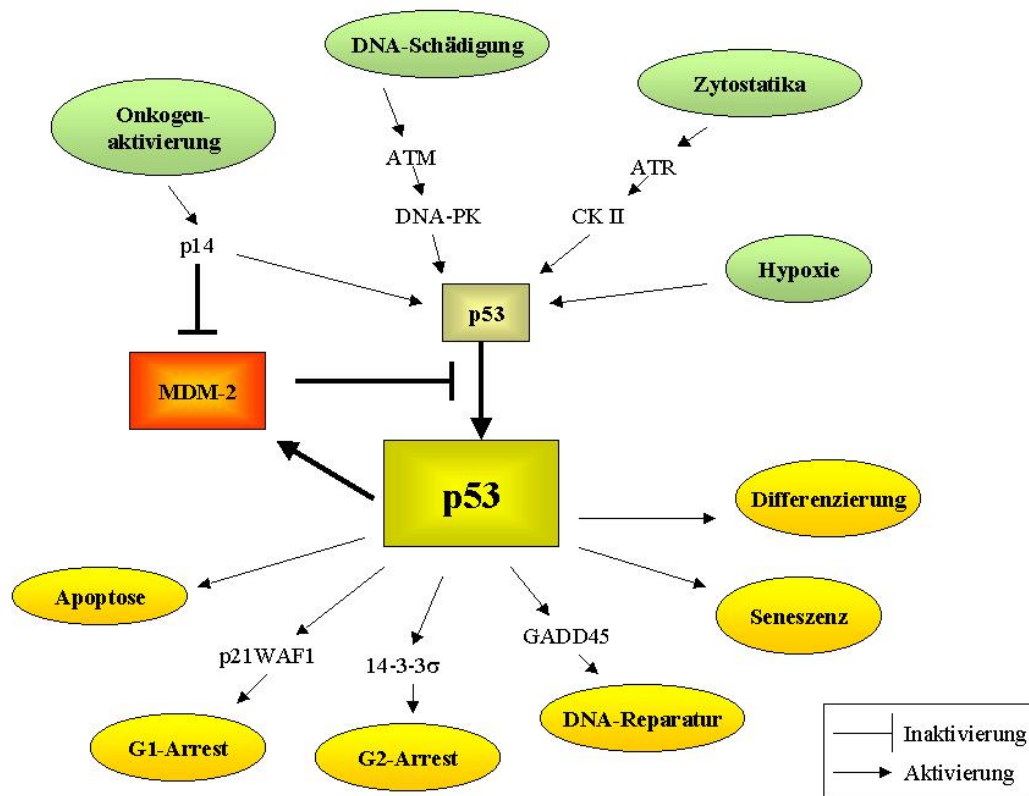


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Aktivierung von p53 und seiner Funktionen. (zur genaueren Erklärung siehe Text, Abschnitt 5.2.1.)

Es ist vermutlich das Zusammenspiel einer ganzen Reihe von Genen, die durch p53 up- und downreguliert werden, die die biologische Antwort triggern. DNA-Mikroarray-Studien haben gezeigt, dass p53 an der Regulation mehrerer hundert verschiedener Gene beteiligt ist (Zhao et al., 2000).

Zusammenfassend liegt die Hauptaufgabe von p53 im Schutz des Genoms, indem es der Zelle hilft, chromosomale Schäden entweder durch Zellzyklusarrest zu reparieren oder die Zelle, wenn sie für den Gesamtorganismus schädlich sein könnte, in die Apoptose führt. Das p53-Gen wird somit zu Recht als „Wächter über das Genom“ bezeichnet (Lane, 1992; Hartwell und Kastan, 1994). Die molekularbiologische Forschung über p53 erbringt grundlegende wissenschaftliche Erkenntnisse. Betrachtet man den p53-Signalweg angefangen vom zellulären Stress bis zum Wachstumsarrest, Apoptose, Seneszenz, Differenzierung, DNA-Reparatur, so enthält dieser interessante Möglichkeiten für die Entwicklung von neuen Pharmaka, die in Zukunft für die onkologische Prävention und Therapie eingesetzt werden könnten (Bykov et al., 2003; Woods und Lane, 2003).

5.2.2 P53-Veränderungen in humanen Tumoren

In seiner Eigenschaft als „Wächter des Genoms“ ist p53 in bösartigen Tumoren eines der am häufigsten von genetischen Veränderungen betroffenen Gene überhaupt. Diese Veränderungen, die entweder zu einer Funktionseinschränkung oder zum kompletten Funktionsverlust führen, beruhen auf unterschiedlichen Mechanismen und Ursachen:

Durch Komplexbildung des Wildtyp-p53-Proteins mit viralen, onkogenen Proteinen kann es zu einem Funktionsverlust kommen. Diese Eigenschaft wurde zuerst für das Simianvirus SV40 beschrieben. In Kopf- und Halstumoren wurde ein anderes virales Protein gefunden, das humane Papillomavirus E6 (Scheffner et al., 1990). Inaktivierungen des p53-Proteins sind auch durch das Adenovirus-E1B-Protein und das EBNA-Antigen des Epstein-Barr-Virus bekannt (Sarnow et al., 1982; Crook et al., 1991; Szekely et al., 1993).

Ein weiterer Mechanismus ist die Überexpression von MDM-2. MDM-2 verhindert normalerweise eine ungeschützte, durch p53-induzierte Apoptose. Wird das MDM-2-Gen nun vermehrt amplifiziert, so ist eine normale Funktion des p53-Gens nicht mehr möglich (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997).

Auch eine Deletion im p14ARF-Gen bewirkt eine Funktionseinschränkung von p53. Durch die Deletion wird MDM-2 fehlerhaft inhibiert und p53 wird vermehrt degradiert (Vogelstein et al., 2000).

Die häufigste Ursache für die Inaktivierung von p53 ist jedoch die Mutation des Gens selbst. Bei diesen Mutationen handelt es sich vor allem um Punktmutationen, bei denen ein Basentriplett so verändert wird, dass statt der ursprünglichen Aminosäure eine andere kodiert wird („Missense-Mutationen“). Dadurch kommt es meist zur Strukturveränderung des p53-Proteins und somit zur Fehlfunktion. Seltener gibt es so genannte „Nonsense-Mutationen“, die zur Entstehung eines Stopcodons führen, durch die es zum Kettenabbruch der Proteinbiosynthese kommt. Ebenfalls selten kommt es zu einem Verlust von einer oder mehreren Basen (Deletion) oder zur Einfügung zusätzlicher Basen (Insertion). Diese führen zu einer Verschiebung des Leserasters („frame-shift-Mutation“), so dass während der Translation kein oder ein stark verändertes Protein entsteht (Levine et al., 1994; Hainaut und Hollstein, 2000).

Circa 95 % aller nachgewiesenen Mutationen in menschlichen Tumoren liegen im DNA-bindenden Teil, beschränkt auf die Exons 5-9. In dieser Domäne sind sechs „hot-spot-Mutationen“ (Codons 175, 245, 248, 249, 273 und 282) beschrieben: zwei, die die DNA direkt binden [R248 (lokalisiert in der Schleife L3) und R273 (S10 in LSH)] und vier, die

die Ringstruktur stabilisieren [R175 (L2), G245 (L3), R249 (L3) und R282 (H2 in LSH)]. Demnach kann man zwei Arten von p53-Mutationen unterscheiden: DNA-Kontaktmutationen und Strukturmutationen (Bullock und Fersht, 2001). In den Ösophaguskarzinomen nahe stehenden Kopf- und Hals-Tumoren konnte man beispielsweise feststellen, dass Kontaktmutationen mit einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie, mit verkürzter Gesamtüberlebenszeit und rezidivfreien Überleben assoziiert waren (Bosch et al., 1999).

Das Spektrum der Mutationen im p53-Gen kann durch Karzinogene aus der Umwelt und durch endogene Prozesse in der Entwicklung menschlicher Tumore beeinflusst werden. Bei einigen Karzinogenen ist der Mechanismus der DNA-Schädigung und die daraus resultierende, für dieses Karzinogen spezifische p53-Mutation bekannt. Beispielsweise führt bei Leberzelltumoren die Exposition mit Aflatoxin B zu typischen Punktmutationen im Codon 249. Beim Hautkrebs findet man die für UV-Licht typische C>T-Transitionen inklusive der CC>TT-Tandemmutationen. Durch Zigarettenrauchen entstehen die charakteristischen G>T-Transversionen beim Bronchialkarzinom (Olivier et al., 2004; Hainaut und Hollstein, 2000)

Im Nachfolgenden soll nun speziell auf p53-Mutationen in Karzinomen des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs eingegangen werden.

5.3 P53-Mutationen beim Ösophaguskarzinom: Assoziation zur Pathogenese, klinischen Verlauf und Prognose

P53-Genmutationen sind die häufigsten genetischen Veränderungen in menschlichen Tumoren und können als Marker in molekularen Krebsstudien fungieren (Hollstein et al., 1991 b; Olivier et al., 2002). In Rahmen dieser Arbeit haben wir das Mutationsmuster des p53-Gens in Karzinomen des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs untersucht unter Berücksichtigung einer möglichen Assoziation zur Pathogenese, klinischen Verlauf und Prognose.

5.3.1 P53-Mutationsanalyse

Die Ösophaguskarzinome sind die neunthäufigste Krebserkrankung weltweit (Pisani et al., 1999). In bis zu 50 % aller Ösophaguskarzinome können p53-Mutationen nachgewiesen werden. Eine der weltweit größten Datenbanken über p53-Mutationen wurde durch die

International Agency for Research on Cancer (IARC) veröffentlicht. In den nachfolgenden Abbildungen werden anhand der IARC-Datenbank aus den weltweit zusammengetragenen p53-Studien die Mutationsspektren und -verteilungen bei Ösophaguskarzinomen unter Berücksichtigung der Histologie dargestellt (www.iarc.fr):

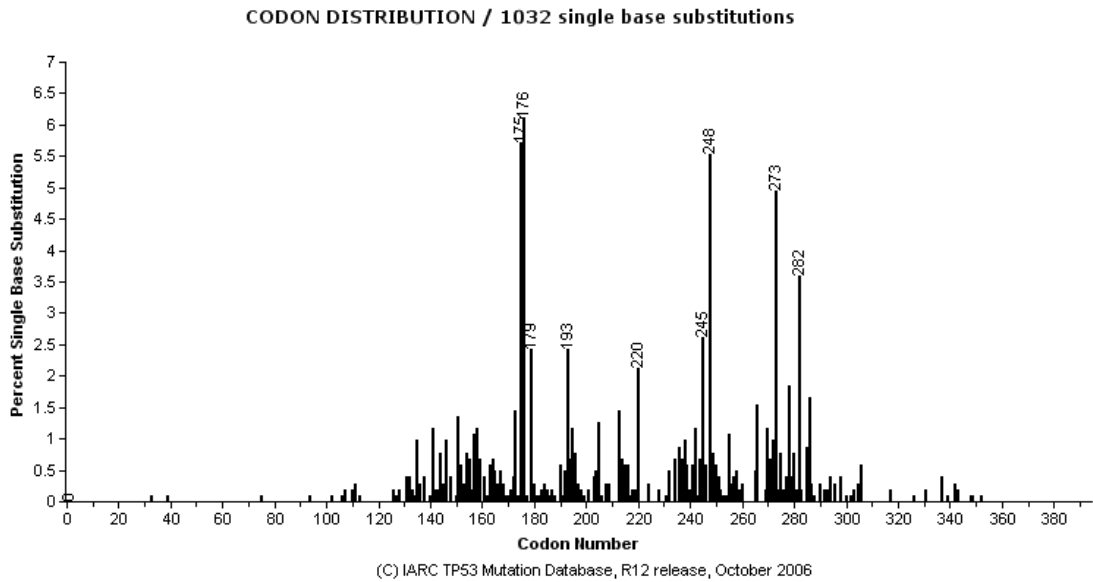


Abbildung 17: Mutationsverteilung beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.

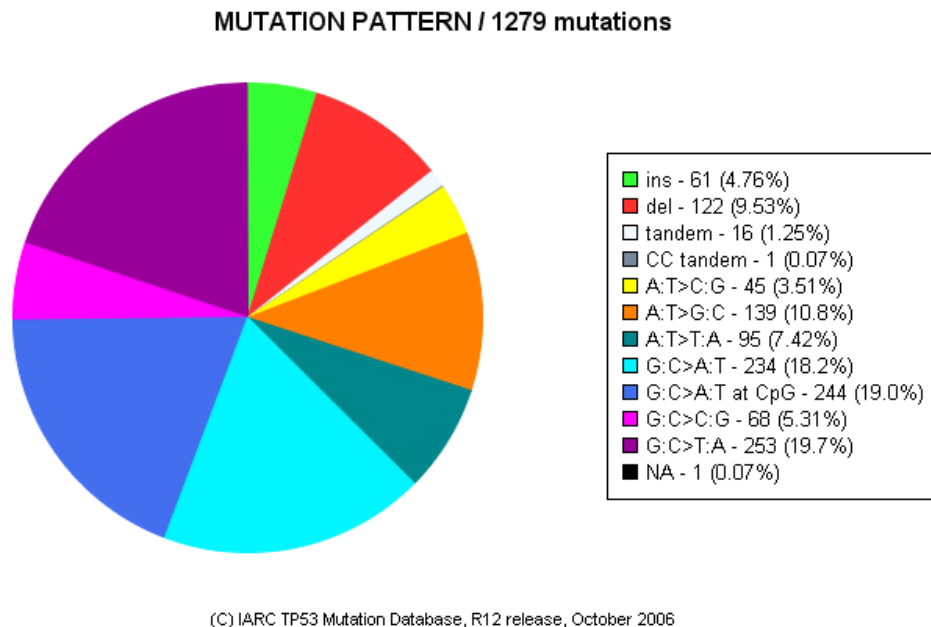


Abbildung 18: Mutationsarten beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.

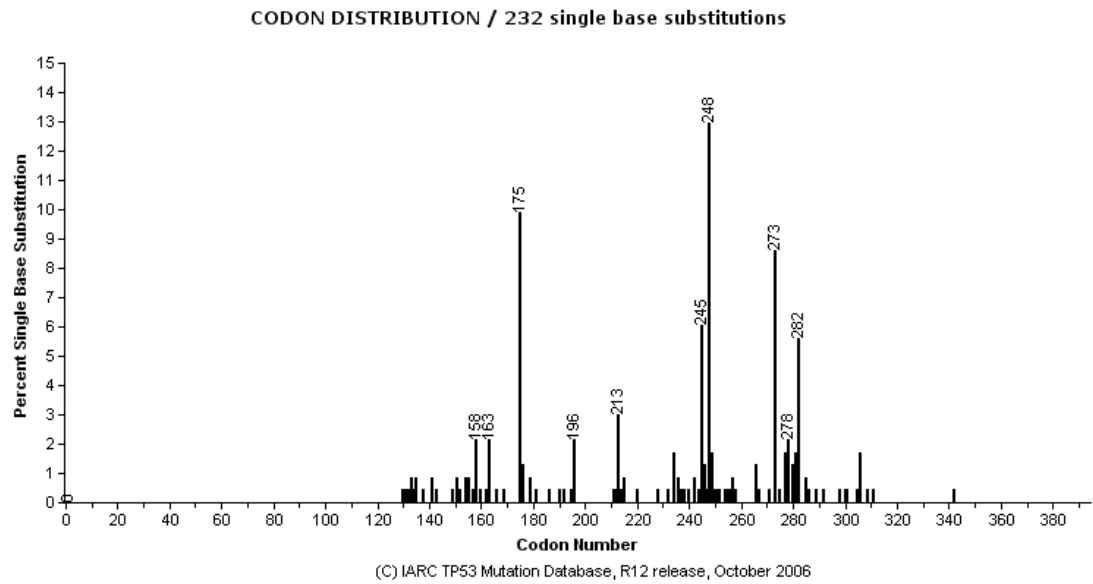


Abbildung 19: Mutationsverteilung beim Adenokarzinom des Ösophagus.

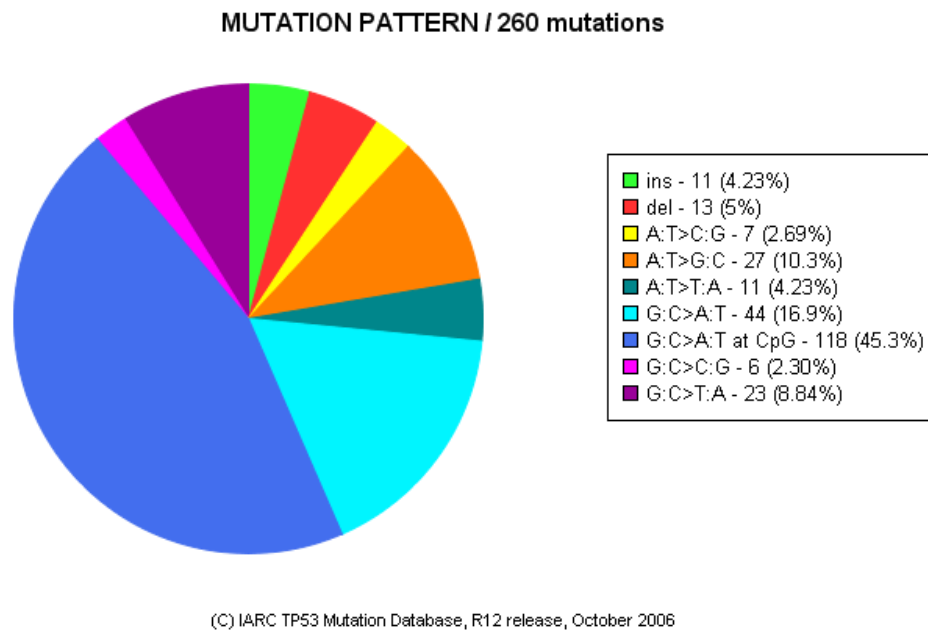


Abbildung 20: Mutationsarten beim Adenokarzinom des Ösophagus.

Die p53-Mutationen sind über alle Exons verteilt, wobei die meisten in den Exons 5-9 gefunden werden. Diese Region kodiert für Aminosäuren in der DNA bindenden Domäne des Proteins (Hainaut und Hollstein, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Exons 5 bis 9 des p53-Gens analysiert. Bezogen auf die Patientenzahl haben wir p53-Mutationen in 38 von 103 Patienten (36,9 %) identifiziert, davon 8 Patienten mit 2 Mutationen und 30 mit 1 Mutation. Die Mutationsfrequenz unserer Studie ist mit 36,9 % niedriger als die Rate von 43,1 %, die in der IARC-Datenbank angegeben wird. Unsere Mutationshäufigkeit ist allerdings ähnlich der aus einer thailändischen (Taniere et al., 2000) und einer japanischen

Studie (Kobayashi et al., 1999). In Bezug auf die beiden Haupthistologien war die Mutationsfrequenz in unserer Studie ähnlich: 38,2 % bei Plattenepithelkarzinomen und 34,3 % bei Adenokarzinomen. Dabei wurden 46 Mutationen, davon 43 Missense- und 3 Nonsense- Mutationen, und 6 sogenannte stille Mutationen (wobbles) ohne Aminosäureaustausch gefunden. Über 30 % aller Mutationen fanden sich in den „hot spot“-Codons (175, 176, 245, 273, 282). Allerdings fanden wir keine Mutation im „hot spot“-Codon 248 im Gegensatz zur IARC-Sammlung mit 5,6 %. Die „hot spot“-Mutationen liegen vor allem in sogenannten CpG-Loci. Das sind Bereiche, in denen methylierte Cytosingruppen deaminieren können und die so zu einem Austausch von Cytosin zu Thymin bzw. Guanosin zu Adenin führen. Nur eine Mutation war eine CpG-Mutation, die nicht in einem „hot spot“-Codon lokalisiert war (Exon 5, Codon 152). Die meisten unserer identifizierten Mutationen waren Transversionen (65,2 % vs. 34,8 % Transitionen), während die Mehrheit der Mutationen in der IARC-Datensammlung Transitionen waren. Des Weiteren konnten in dieser Arbeit keine Deletionen, Insertionen und Tandem-Mutationen detektiert werden (jeweils 0 % in Plattenepithelkarzinome vs. 9,53 %, 4,76 % and 1,32 % in der IARC-Datenbank, sowie jeweils 0 % in Adenokarzinome vs. 5,0 %, 4,23 %, and 0 % beim IARC). Zusammenfassend zeigen sich in unserem Patientenkollektiv einige, aber nicht-signifikante Unterschiede im p53-Mutationsspektrum im Vergleich zu den weltweit zusammengetragenen Daten des IARC. Einige der Unterschiede können Ausdruck der unterschiedlichen Risikofaktoren auf die Entstehung des Plattenepithel- bzw. Adenokarzinoms sein. Auf diese Unterschiede und auch auf die p53-Mutationen und deren Bedeutung bei der Pathogenese, dem klinischen Verlauf und der Prognose soll im Folgenden näher eingegangen werden.

5.3.2 P53-Mutationen und die Bedeutung bei der Pathogenese

Die Entwicklung eines Ösophaguskarzinoms ist ein multifaktorieller Prozess, bei dem eine ganze Reihe von Risikofaktoren eine Rolle spielt. Aufgrund der unterschiedlichen pathogenetischen Prinzipien ist hier das p53-Gen wahrscheinlich abhängig von den beiden häufigsten Histologien, den Plattenepithel- und den Adenokarzinomen, unterschiedlich beeinträchtigt bzw. es können unterschiedliche Mutationsmuster vorgefunden werden.

Als Risikofaktoren für Ösophaguskarzinome vom Plattenepitheltyp sind insbesondere der übermäßige Nikotin- und Alkoholgenuss zu nennen (Brown et al., 2001; Wu et al., 2001). Die Karzinogenese des Plattenepithelkarzinoms ist ein Mehrstufenprozess: Von einer

Basalzellhyperplasie über eine milde bis schwere Dysplasie kommt es zur Entwicklung eines Carcinoma in situ und schließlich zum invasiven Karzinom (Lehrbach et al., 2003; Kuwano et al., 2005).

Die beiden Hauptrisikofaktoren des Plattenepithelkarzinoms, der Nikotinkonsum und der Alkoholabusus, sind bei der Entwicklung des Adenokarzinoms deutlich schwächer assoziiert (Vaughan et al., 1995; Castellsaque et al., 1999; Wu et al., 2001). Ein Hauptrisikofaktor für ein Adenokarzinom ist der gastroösophageale Reflux mit der oft daraus resultierenden, präkanzerogenen Umwandlung in einen Barrett-Ösophagus (Lagergren et al., 1999; Romero et al., 2002). Der Barrett-Ösophagus ist eine intestinale Metaplasie, bei der das Plattenepithel des distalen Ösophagus durch Zylinderepithel ersetzt wird. Die Entwicklung eines Adenokarzinoms auf dem Boden eines Barrett-Ösophagus ist als Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz anzusehen (McManus et al., 2004; Koppert et al., 2005; Kuwano et al., 2005).

In dieser Studie zeigte sich ein signifikant häufigerer Tabakgenuss bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom gegenüber Patienten mit einem Adenokarzinom (73,5 % vs. 34,3%; $p=0,0002$). Auch übermäßiger Alkoholgenuss (mehr als 40 g/d) war signifikant häufiger bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (75 % vs. 37,1 % beim Adenokarzinom; $p=0,0003$). So ließen sich in der Tat in unserem Kollektiv die beiden beschriebenen Hauptrisikofaktoren für ein Plattenepithelkarzinom, Rauchen und Alkoholkonsum, sich häufiger bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom nachweisen. Trotzdem war auch bei unseren Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus im Vergleich zu anderen Studien ein eher höherer Anteil an Rauchern und insbesondere an Patienten mit einem Alkoholabusus (Anteil Raucher 34,3 % vs. 30,1 % in der Normalbevölkerung und Anteil an Patienten mit übermäßigem Alkoholgenuss 37,1 % vs. 11,2 % in der Normalbevölkerung) zu verzeichnen (Haenle et al., 2006).

Unter Berücksichtigung des Mutationsstatus zeigten sich bei Patienten, die rauchen, etwas häufiger eine Mutation im p53-Gen (Odds Ratio: 2,1; 95% Confidence Intervall: 0,9-4,9). Vom Mutationsspektrum her kamen bei Rauchern typischerweise G>T-Transversionen vor. Pfeifer et al. berichtete, dass die Prävalenz der G>T-Transversionen 30 % in Patienten mit einem Lungenkarzinom, die rauchen, betrug. Aber nur zu 12 % kamen G>T-Transversionen in Lungenkarzinomen von Nicht-Rauchern vor (Pfeiffer et al., 2002). Zwei wichtige Substanzen, die als Karzinogene durch Nikotingenuss eine Rolle spielen, sind die polycyclischen aromatischen Hydrocarbone (PAH) und die Nitrosamine (Hoffmann et al., 2001). Verschiedene Studien wiesen darauf hin, dass eine starke Coinzidenz zwischen

G>T-Transversionen in „hot spot“-Codons beim Lungenkarzinom und den Stellen am p53-Gen, wo die meisten PAH-Addukte gebildet werden, besteht. Zu der Gruppe der PAH gehören die Benzo(a)pyrene (BaP). Das Benzo(a)pyren 7,8-diol-9,10-epoxid bindet bevorzugt an Guanosine, die neben einem methylierten Cytosin liegen. Das ist eine Erklärung, warum die G>T-Transversionen beim Lungenkarzinom hauptsächlich in den CpG-Loci liegen. Obwohl die BaP nur eine Gruppe von vielen Tabakkarzinogenen sind, gelten sie als hauptverantwortlich für die G>T-Transversionen bei Rauchern (Bartsch et al., 1998; Hainaut und Hollstein, 2000; Pfeiffer et al., 2002). Wir haben G>T-Transversionen in 10,9 % aller unserer Mutationen gefunden. Diese wurden ausschließlich bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom identifiziert (15,5 % in Plattenepithel- und 0 % in Adenokarzinomen). Allen diesen Patienten war ein Nikotinabusus gemeinsam. Wir fanden keine G>T-Transversionen bei Nichtrauchern, so dass auch bei uns p53 als genetischer Fingerabdruck für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und Nikotingenuss nachweisbar war.

In Ergänzung zum Tabakkonsum wurden in den Hochrisikogebieten andere Risikofaktoren, wie zum Beispiel spezielle Nahrungsmittel, identifiziert, die vermutlich signifikant zu einem Anstieg der Inzidenz von Karzinomen führen. In einer Studie aus Indien wurde darauf hingewiesen, dass somatische Chromosomenmutationen, insbesondere in Exon 6 des p53-Gens, eng mit dem kontinuierlichen Genuss von verschiedenen Lebensmitteln, beispielsweise heißer salziger Tee, Fleisch, gebackenes Brot und „Hakh“, die reich an Nitrosamine sind, assoziiert sind (Murtaza et al., 2006).

Im Rahmen dieser Studie war der übermäßige Alkoholgenuss ein zweiter untersuchter Risikofaktor. Der Konsum von Alkohol ist ein starker Risikofaktor für Karzinome des oberen Aero-Digestivtraktes (Mundhöhle, Oropharynx, Larynx und Ösophagus). Auch das Risiko für Leber-, Kolon- und Brustkrebs wird durch vermehrten Alkoholgebrauch erhöht (Seitz et al., 1998). Ethanol an sich hat dabei keine karzinogene Wirkung: Tierexperimente an Nagetieren haben gezeigt, dass auch Tiere nach einer lebenslangen Exposition mit Alkohol nicht häufiger als die Kontrollgruppe Karzinome entwickelten (Ketcham et al., 1963). Alkohol ist vielmehr als Tumorpromoter und/oder Kokarzinogen anzusehen. Viele verschiedene Mechanismen und Faktoren verstärken die alkoholassoziierte Krebsentstehung. Die Verstoffwechslung von Ethanol durch Alkoholdehydrogenasen (ADH) und Cytochrom P450 2E1 (CYP 2E1) führt zur Bildung von Karzinogenen, wie Azetaldehyd und freien Radikalen. Abbildung 21 zeigt eine schematische Darstellung des Alkoholabbaus.

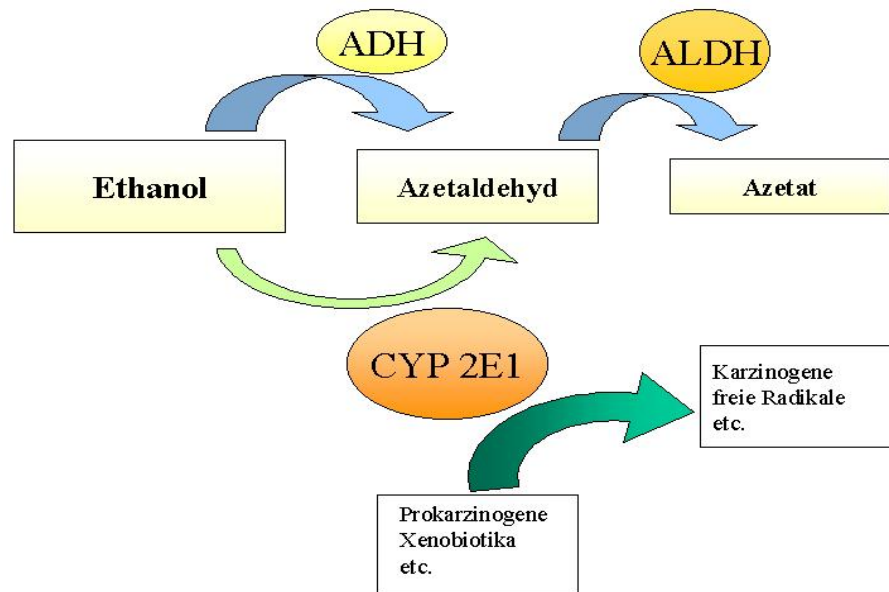


Abbildung 21: Vereinfachte schematische Darstellung des Alkoholabbaus. Ethanol wird durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) und Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) zu Azetaldehyd oxidiert. Dieses wird durch die Azetaldehyddehydrogenasen (ALDH) zu Azetat metabolisiert. CYP 2E1 wird durch chronischen Alkoholkonsum induziert. Es führt zu einer vermehrten Ethanolmetabolisierung, steigert die Bildung freier Radikale und katalysiert die Umwandlung einiger Prokarzinogene in ihre aktiven Formen. Mutationen im ALDH 2-Gen führen zu einem verminderten Azetaldehydabbau. (für Details auch siehe Text)

Azetaldehyd hat eine Vielzahl gut untersuchter toxischer, mutagener und karzinogener Eigenschaften und ist vermutlich für einen Großteil der alkoholassoziierten Karzinogenese verantwortlich. Es beeinflusst die DNS-Reparatur (z.B. durch Hemmung der O₆-Methyl-Guanyl-Transferase, ein Enzym, das für die DNA-Reparatur von Schäden durch Alkylanzien wichtig ist), führt zur Verzögerung im Zellzyklus, zur Verstärkung der Apoptose, zum Zellschaden mit übersteigter Zellproliferation und umfasst metaplastische und entzündliche Umbauvorgänge am Kehlkopf und die Entstehung von malignen Larynxkarzinomen im Tierexperiment (Seitz et al., 2004). Der Azetaldehyd-Spiegel kann beispielsweise durch Polymorphismen der Alkoholdehydrogenase 1C (ADH 1C) moduliert werden. Die ADH 1C*1-Transkription führt zu einem ADH-Isoenzym mit einer zweieinhalbfach höheren Aktivität als das der ADH 1C*2. Bei diesen Patienten kommt es

zur vermehrten Akkumulation von Azetaldehyd, so dass bei Einnahme von sehr hohen Alkoholmengen bei diesen Patienten ein erhöhtes Krebsrisiko im oberen Verdauungstrakt nachzuweisen ist (Homann et al., 2006). Auch durch Mutationen im Gen der Azetaldehyddehydrogenase 2 (ALDH 2), ein Enzym, das für den Abbau von Azetaldehyd zu Azetat benötigt wird, kann es zur Akkumulation von Azetaldehyd mit einem konsekutiv erhöhten Krebsrisiko durch die Bildung eines ineffektiven Enzyms kommen (Yokoyama et al., 2001; Asakage et al., 2007). Azetaldehyd kann auch durch Bakterien in der Mundschleimhaut produziert werden. Dieses wird vor allem durch schlechte Mundhygiene und zusätzliches Rauchen bei Alkoholikern verstärkt (Homann et al., 2000 b). Des Weiteren wird Ethanol auch durch Cytochrom P450 2E1 (CYP 2E1) zu Azetaldehyd metabolisiert. Chronischer Alkoholkonsum führt zu einer Induktion von mikrosomalem CYP 2E1 in der Leber und auch im Gastrointestinaltrakt. Durch die Induktion von CYP 2E1 kommt es auch zu einer vermehrten Umwandlung verschiedener Xenobiotika und Prokarzinogene (z.B. Nitrosamine, Aflatoxin, Vinylchlorid) zu ihren potentiell toxischen Metaboliten sowie zur Bildung freier Radikale (Seitz et al., 2004; Homann et al., 2005). Gleichzeitig kommt es durch chronischen Alkoholkonsum zu einer Mangelernährung. Die Unterversorgung mit Vitamin A, Vitamin E und Zink kann die Karzinogenese stimulieren. Durch Folsäure und Methylgruppenmangel kommt es zur Hypomethylierung der DNA. Schließlich kann Alkohol auch zu einer Hemmung der Immunantwort führen und kann die Progression eines malignen Tumors stimulieren (Homann et al., 2000 a). Aufgrund der vielen unterschiedlichen Mechanismen und Faktoren, die bei der alkoholassoziierten Karzinogenese eine Rolle spielen, ist im Gegensatz zum Tabakrauch ein bestimmtes Mutationsmuster nicht zu erwarten. In der Tat wurde zwar teilweise eine erhöhte Inzidenz an p53-Mutationen, jedoch kein bestimmtes Cluster beschrieben (Ronchetti et al., 2004; Bongaerts et al., 2007). Auch wir konnten im Rahmen unserer Studie kein bestimmtes Muster an p53-Mutationen bei Patienten mit einem übermäßigem Alkoholkonsum nachweisen.

5.3.3 P53-Mutationen und die Bedeutung beim klinischen Verlauf und der Prognose

Der Erwerb von p53-Mutationen ist ein kritischer Schritt in der Entstehung von Tumoren, es erlaubt den Tumorzellen ein leichteres Wachstum und Überleben. P53-Mutationen können Tumorzellen auch resistent gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung machen (Bristow et al., 1996; Wallace-Brodeur et al., 1999). Es gibt aber auch Studien, die

berichten, dass p53-Mutationen die Sensitivität des Tumors für diese Therapie erhöhen (Bertheau et al., 2002). Wir haben Gewebeproben von Tumoren des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs in den Stadien I-IV gesammelt. Die Patienten erhielten je nach Stadium, Allgemeinzustand und Begleiterkrankungen entweder eine Operation, eine Radio- und/oder Chemotherapie, eine multimodale Therapie mit OP oder eine symptomatische Therapie. Allein die unterschiedlichen Therapieformen beeinträchtigen die Prognose des Patienten in vielfältiger Art und Weise. So ist beispielsweise bei Patienten mit neoadjuvanter Radiochemotherapie eine deutlich erhöhte perioperative Mortalität beschrieben, so dass sich alleine hier vielfältige konfluierende Variablen auf die Prognose des Patienten ergeben (Fiorica et al., 2004). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit bei Prognoseanalysen je nach gewählter Therapie und auch nach Alter und dem Tumorstadium zu stratifizieren. Aufgrund der daraus resultierenden zu geringen Fallzahlen sind anhand unserer Daten keine Aussagen zu einem möglichen Therapieansprechen in Bezug auf eine Chemotherapie und/oder Radiatio und /oder multimodales Vorgehen möglich.

Die Beziehung zwischen genetischen Veränderungen im p53-Gen und der Tumorprognose wird in der Literatur über Ösophaguskarzinome unterschiedlich dargestellt. Kobayashi beispielsweise zeigte, dass die 5-Jahres-Überlebensrate von kurativ behandelten Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus im Stadium II-III, die einen p53-Wildtyp aufwiesen, signifikant höher war (Kobayashi et al., 1999). Das Überleben von Patienten mit einem Stadium III eines ösophagealen Plattenepithelkarzinoms und p53 Mutation war in einer Studie von Lam ohne signifikanten Unterschied kürzer (Lam et al., 1997). Ribeiro berichtete, dass das Vorhandensein einer p53-Mutation in Plattenepithel- oder Adenokarzinomen mit einem schlechteren Überleben korreliert (Ribeiro et al., 1998). Patienten mit einem ösophagealen Adenokarzinom hatten in einer Studie von Casson eine signifikant reduzierte 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Nachweis von p53-Veränderungen (Casson et al., 2003). Keine prädiktive Rolle spielten p53-Mutationen in Plattenepithelkarzinomen in einer Studie von Ito (Ito et al., 2001). Die Gründe für diesen Konflikt können beispielsweise in nicht einheitlichen Tumorstadien und pathologischen Befunden liegen. Auch unterschiedliche Methoden zur Entdeckung der genetischen Veränderungen im p53-Gen (z.B. Immunhistochemie, Sequenzierung mittels Klonierung und direkte Sequenzierung) können dabei eine große Rolle spielen. In unserer Studie war die einzige Variable, die die Überlebenszeit von Patienten vorhersagte, das Tumorstaging. Das Vorhandensein oder das Fehlen einer p53-Mutation zeigte keinen zusätzlichen Effekt. Der Mutationsstatus war somit kein prognostischer Faktor für die Überlebenswahrschein-

lichkeit der Patienten. Gründe dafür könnten die oben bereits erwähnten konfluierenden Variablen Alter, unterschiedliche Therapie und unterschiedliche Komorbidität sein.

Zusammenfassend zeigte sich anhand dieser Studie, dass Rauchen und ein übermäßiger Alkoholgenuss signifikant häufiger bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus im Vergleich zu den Adenokarzinomen vorkamen. Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose, die Geschlechtsverteilung, das Grading und Staging zeigten keinen Unterschied zwischen Patienten mit und ohne p53-Mutation. Die Mutationshäufigkeit unterschied sich nicht wesentlich zwischen den beiden Haupthistologien, zwischen Rauchern und Nichtrauchern, zwischen Trinkern und Nichttrinkern. In Bezug auf das Mutationsspektrum ließen sich die für das Rauchen typischen G>T-Transversionen ausschließlich bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom, die rauchen, nachweisen. Anhand unserer Daten war der Mutationsstatus kein prognostischer Faktor für die Überlebensrate der Patienten.

6. Zusammenfassung

Verschiedene Studien zeigten, dass das p53-Gen als ein biologischer Fingerabdruck für Krebs induzierende Substanzen fungieren kann und die verschiedenen p53-Mutationen unterschiedliche biologische Eigenschaften haben. Karzinome des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs bieten eine interessante zu untersuchende Tumorentität aufgrund ihrer zwei unterschiedlichen Haupthistologien, den Plattenepithel- (SCC) und Adenokarzinomen (AC). Die Inzidenz dieser Tumore ist steigend. Insbesondere die Rate der Adenokarzinome hat zugenommen. Ätiologisch sind für die Plattenepithelkarzinome vor allem Nikotinkonsum und ein erhöhter Alkoholgenuss zu nennen, während bei den Adenokarzinomen die Refluxerkrankung mit konsekutivem Barrett-Syndrom als Risikofaktor gilt.

Im Rahmen dieser Studie wurde das p53-Mutationsspektrum in 103 Karzinomen des Ösophagus und gastroösophagealen Übergangs untersucht (68 Plattenepithel- und 35 Adenokarzinome). Dazu wurde aus gastroscopisch gewonnenen und frisch eingefrorenen Tumorbiopsien die DNA isoliert und mittels PCR Exon 5-9 des p53-Gens amplifiziert und anschließend direkt sequenziert. Exemplarisch wurde diese Methode auch auf Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Biopsiematerial übertragen. Die Patienten wurden weiter beobachtet und die klinischen und histopathologischen Daten wurden mit den Mutationsdaten verglichen. P53-Mutationen wurden in 26 von 68 (38,2 %) Plattenepithel- und in 12 von 35 (34,5 %) Adenokarzinomen gefunden. Acht Patienten zeigten mehrere Mutationen (7 SCC/ 1 AC) und in 30 Patienten ließ sich eine Mutation nachweisen. Die Mutationsfrequenz betrug 36,9 %. Die Mehrheit der Mutationen waren Transversionen (65,2 %). Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom waren signifikant häufiger Raucher (73,5 %) und Alkoholtrinker (75 %) als Patienten mit einem Adenokarzinom (34,3% Raucher, $p=0,0002$; 37,1 % Trinker, $p=0,0003$). Etwas häufiger, aber nicht signifikant, waren p53-Mutationen bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern festzustellen (71,1 % Raucher mit p53-Mutation vs. 53,85% Nichtraucher mit p53-Mutation, Odds Ratio 2,1, 95 % Confidence Intervall 0,9-4,9). Die für bestimmte Karzinogene des Tabakrauches typischen G>T-Transversionen fanden sich in dieser Studie nur bei Patienten, die ein Plattenepithelkarzinom haben und Raucher waren (15,5 % in Plattenepithelkarzinomen vs. 0 % in Adenokarzinomen). Im Gegensatz zum Nikotinabusus war weder eine erhöhte Frequenz noch ein bestimmtes Mutationsmuster bei Patienten mit einem Alkoholabusus nachweisbar. Bezüglich der Prognose war das TNM-Stadium der einzige prädiktive

Überlebensfaktor. Die Überlebensrate von Patienten mit und ohne p53-Mutation war nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,63$). Auch spielte es keine Rolle, ob die Patienten Mutationen in den DNA-Kontakt- oder Strukturdomänen hatten.

Zusammenfassend war in unserer Studie unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Risikofaktoren in Patienten mit einem Adeno- oder Plattenepithelkarzinom die Mutationsfrequenz in beiden Gruppen ähnlich. Unsere Daten zeigen keine Evidenz für ein Ansteigen der p53-Mutationsfrequenz in Patienten mit übermäßigem Alkohol- und Nikotingenuss. Das Vorhandensein einer p53-Mutation zeigte keinen zusätzlichen Effekt auf die Überlebensrate.

7. Literaturverzeichnis

Ajani JA.

Current status of new drugs and multidisciplinary approaches in patients with carcinoma of the esophagus. *Chest*. 1998 Jan; 113(1 Suppl): 112-119

Alidina A, Siddiqui T, Burney I, Jafri W, Hussain F, Ahmed M.

Esophageal cancer – a review. *J Pak Med Assoc*. 2004 Mar; 54(3): 136-141

Asakage T, Yokoyama A, Haneda T, Yamazaki M, Muto M, Yokoyama T, Kato H, Igaki H, Tsujinaka T, Kumagai Y, Yokoyama M, Omori T, Watanabe H.

Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases, and drinking, smoking and diet in Japanese men with oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2007 Apr; 28(4): 865-874

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B.

Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989 Apr 14; 244(4901): 217-221

Bartsch H, Rojas MN, Alexandrov K, Risch A.

Impact of adduct determination on the assessment of cancer susceptibility. *Recent Results Cancer Res*. 1998; 154:86-96

Bertheau P, Plassa F, Espie M, Turpin E, de Roquancourt A, Marty M, Lerebours F, Beuzard Y, Janin A, de The H.

Effect of mutated TP53 on response of advanced breast cancers to high dose chemotherapy. *Lancet* 2002 Sep 14; 360(9336): 852-854

Bhatia K, Gutierrez MI, Huppi K, Magrath IT.

PCR detection of a neutral CGA/CGG dimorphism in exon 6 of the human p53 gene. *Nucl Acids Res*. 1992 Feb 25; 20(4): 928

Blot WJ.

Epidemiology and genesis of esophageal cancer. In: Roth JA, Ruckdeschel JC, Weisenburger TH, eds. *Thoracic oncology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995, p. 278

Blot WJ, McLaughlin JK.

The changing epidemiology of esophageal cancer. *Semin Oncol*. 1999 Oct; 26(5 Suppl 15): 2-8

Bongaerts BW, de Goeij AF, de Vogel S, van de Brandt PA, Goldbohm RA, Weijenberg MP.

Alcohol consumption and distinct molecular pathways to colorectal cancer. *Br J Nutr*. 2007 Mar; 97(3): 430-434

Bosch FX, Homann N, Conradt C, Dietz A, Erber R.

P53 mutations/p53 protein overexpression. Differential significance for the progression of head-neck carcinomas. *HNO*. 1999 Sep; 47(9): 833-843

Brenner B, Ilson DH, Minsky BD.

Treatment of localized esophageal cancer. *Semin Oncol*. 2004 Aug; 31(4): 554-65

Bristow RG, Benchimol S, Hill RP.

The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiother Oncol* 1996 Sep; 40(3): 197-223

Brown LM, Hoover R, Silverman D, Baris D, Hayes R, Swanson GM, Schoenberg J, Greenberg R, Liff J, Schwartz A, Dosemeci M, Pottern L, Fraumeni JF Jr.

Excess incidence of squamous cell esophageal cancer among US Black men: role of social class and other risk factors.

Am J Epidemiol. 2001 Jan 15; 153(2): 114-122

Bullock AN, Fersht AR.

Rescuing the function of mutant p53.

Nat Rev Cancer 2001 Oct; 1(1): 68-76

Bykov VJ, Selivanova G, Wiman KG.

Small molecules that reactivate mutant p53.

Eur J Cancer 2003 Sep; 39(13): 1828-1834

Bykov VJ, Wiman KG.

Novel cancer therapy by reactivation of the p53 apoptosis pathway.

Ann Med. 2003; 35(7): 458-465

Casson AG, Evans SC, Gillis A, Porter GA, Veugelers P, Darnton SJ, Guernsey DL, Hainaut P.

Clinical implications of p53 tumor suppressor gene mutation protein expression in esophageal adenocarcinomas: results of a ten year prospective study.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 May; 125(5): 1121-31

Castellsague X, Munoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolon PA, Quintana MJ.

Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women.

Int J Cancer. 1999 Aug 27; 82(5): 657-64

Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B.

14-3-3sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage.

Nature 1999 Oct 7; 401(6753): 616-620

Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP.

Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations.

Science 1994 Jul 15; 265(5170): 346-355

Chow WH, Blaser MJ, Blot WJ, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Perez-Perez GI, Schoenberg JB, Stanford JL, Rotterdam H, West AB, Fraumeni JF Jr.

An inverse relation between cagA+ strains of Helicobacter pylori infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma.

Cancer Res. 1998 Feb 15; 58(4): 588-90; a

Chow WH, Blot WJ, Vaughan TL, Risch HA, Gammon MD, Stanford JL, Dubrow R, Schoenberg JB, Mayne ST, Farrow DC, Ahsan H, West AB, Rotterdam H, Niwa S, Fraumeni JF Jr.

Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia.

J Natl Cancer Inst. 1998 Jan 21; 90(2):150-5; b

Cook-Mozaffari PJ, Azordegan F, Day NE, Ressicaud A, Sabai C, Aramesh B.

Oesophageal cancer studies in the Caspian Littoral of Iran: results of a case-control study.

Br J Cancer. 1979 Mar; 39(3): 293-309

Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD.

Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer

Int J Cancer 1982 Oct 15; 30(4): 403-408

Crook T, Tidy JA, Vousden KH.

Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation.

Cell 1991 Nov 1; 67(3): 547-556

Csikos M, Horvath O, Petri A, Petri I, Imre J.

Late malignant transformation of chronic corrosive oesophageal strictures.
Langenbecks Arch Chir. 1985; 365(4):231-238

Daly JM, Fry WA, Little AG, Winchester DP, McKee RF, Stewart AK, Fremgen AM.

Esophageal cancer: results of an American College of Surgeons Patient Care Evaluation Study.
J Am Coll Surg. 2000 May; 190(5): 562-572

DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ.

Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse
Proc Natl Acad Sci USA 1979 May; 76(5): 2420-2424

DeMeester SR.

Adenocarcinoma of the esophagus and cardia: a review of the disease and its treatment.
Ann. Surg. Oncol. 2006; 13(1): 12-30

De Stefani E, Barrios E, Fierro L.

Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco and cancer risk. III: Oesophageal cancer.
Eur J Cancer. 1993; 29A(5): 763-766

De Stefani E, Munoz N, Esteve J, Vasallo A, Victora CG, Teuchmann S.

Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay.
Cancer Res. 1990 Jan 15; 50(2): 426-431

Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr.

Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States.
Cancer. 1998 Nov 15; 83(10): 2049-2053

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr., Butel JS, Bradley A.

Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours
Nature 1992 Mar 19, 356(6366): 215-221

el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B.

Definition of a consensus binding site for p53.
Nat Genet 1992 Apr; 1(1): 45-49

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B.

WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.
Cell 1993 Nov 19; 75(4): 817-825

Enzinger PC, Ilson DH, Kelsen DP.

Chemotherapy in esophageal cancer.
Semin Oncol. 1999 Oct; 26(5 Suppl 15): 12-20

Erber R, Conradt C, Homann N, Enders C, Finckh M, Dietz A, Weidauer H, Bosch FX.

TP53 DNA contact mutations are selectively associated with allelic loss and have a strong clinical impact in head and neck cancer.
Oncogene 1998 Apr 2; 16(13): 1671-1679

Erkal HS, Mendenhall WM, Amdur RJ, Villaret DB, Stringer SP.

Synchronous and metachronous squamous cell carcinomas of the head and neck mucosal sites.
J Clin Oncol. 2001 Mar 1; 19(5):1358-1362

Fiorica F, Di Bona D, Schepis F, Licata A, Shahied L, Venturi A, Falchi AM, Craxi A, Camma C.

Perioperative chemoradiotherapy for oesophageal cancer: a systemic review and meta-analysis.
Gut. 2004 Jul; 53(7): 925-930

Gao H, Wang LD, Zhou Q, Hong JY, Huang TY, Yang CS.

p53 tumor suppressor gene mutation in early esophageal precancerous lesions and carcinoma among high-risk populations in Henan, China.

Cancer Res. 1994 Aug 15; 54(16): 4342-4346

Garidou A, Tzonou A, Lipworth L, Signorello LB, Kalapothaki V, Trichopoulos D.

Life-style factors and medical conditions in relation to esophageal cancer by histologic type in a low-risk population.

Int J Cancer. 1996 Nov 4; 68(3): 295-299

Ghavamzadeh A, Moussavi A, Jahani M, Rastegarpanah M, Irvani M.

Esophageal cancer in Iran.

Semin Oncol. 2001 Apr; 28(2): 153-157

GebSKI V, Burmeister B, Smithers BM, Foo K, Zalberg J, Simes J, Australasian Gastro-Intestinal Trials Group.

Survival benefits from neoadjuvant chemotherapy or chemotherapy in oesophageal carcinoma: a meta-analysis.

Lancet Oncol. 2007 Mar; 8(3): 226-234.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M (Eds.)

AJCC cancer staging manual.

6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002, XV, p. 469

Haenle MM, Brockmann SO, Kron M, Bertling U, Mason RA, Steinbach G, Boehm BO, Koenig W, Kern P, Piechotowski I, Kratzer W and the EMIL-Study group.

Overweight, physical activity, tobacco and alcohol consumption in a cross-sectional random sample of German adults.

BMC Public Health 2006; 6: 233

Hainaut P, Hollstein M.

P53 and human cancer: The first ten thousand mutations.

Adv Cancer Res 2000; 77: 81-137

Hartwell LH, Kastan MB.

Cell cycle control and cancer.

Science 1994 Dec 16; 266(5192): 1821-1828

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M.

Mdm2 promotes the rapid degradation of p53.

Nature 1997 May 15; 387(6630): 296-299

Headrick JR, Nichols FC 3rd, Miller DL, Allen MS, Trastek VF, Deschamps C, Schleck CD, Thompson AM, Pairolero PC.

High-grade esophageal dysplasia: long-term survival and quality of life after esophagectomy.

Ann Thorac Surg. 2002 Jun; 73(6): 1697-1702

Hinds P, Finlay CA, Levine AJ.

Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation.

J Virol 1989 Feb; 63(2): 739-746

Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K.

The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder.

Chem Res Toxicol 2001 Jul; 14(7): 767-790

Hollstein MC, Peri L, Mandard AM, Welsh JA, Montesano R, Metcalf RA, Bak M, Harris CC.

Genetic analysis of human esophageal tumors from two high incidence geographic areas: frequent p53 base substitutions and absence of ras mutations.

Cancer Res. 1991 Aug 1; 51(15): 4102-4106; a

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC.

P53 mutations in human cancers.
Science 1991 Jul 5; 253(5015): 49-53; **b**

Homann N, Seitz HK, Wang XD, Yokoyama A, Singletary KW, Ishii H.

Mechanisms in alcohol-associated carcinogenesis.
Alcohol Clin Exp Res 2005 Jul; 29(7): 1317-1320

Homann N, Simanowski UA, Maier H, Tisch M, Seitz HK.

Alkohol und Krebs. In: Seitz HK, Lieber CS, Simanowski UA (Hrsg).
Handbuch Alkohol, Alkoholismus, alkoholbedingte Organschäden.
Barth Verlag Heidelberg, 2. Auflage 2000, Seite 397-421; **a**

Homann N, Stickel F, König IR, Jacobs A, Jungshanns K, Benesova M, Schuppan D, Himsel S, Zuber-Jerger I, Hellerbrand C, Ludwid D, Caselmann WH, Seitz HK.

Alcohol dehydrogenase 1C*1 allele is a genetic marker for alcohol-associated cancer in heavy drinkers.
Int J Cancer. 2006 Apr. 15; 118(8): 1998-2002

Homann N, Tillonen J, Meurman JH, Rintamäki H, Lidqvist C, Rautio M, Jousimies-Somer H, Salaspuro M.

Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer.
Carcinogenesis. 2000 Apr; 21(4): 663-668; **b**

Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM.

Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13.
Nature 1986 Mar 6-12; 320(6057): 84-85

Ito T, Kaneko K, Makino R, Ito H, Konishi K, Kurahashi T, Kitahara T, Mitamura K.

Prognostic value of p53 mutations in patients with locally advanced esophageal carcinoma treated with definitive chemoradiotherapy.
J. Gastroenterol. 2001 May; 36(5): 303-311

Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M.

Cancer statistics, 2002.
CA Cancer J Clin. 2002 Jan-Feb;52(1):23-47. Erratum in: CA Cancer J Clin 2002 Mar-Apr;52(2):119. CA Cancer J Clin 2002 May-Jun; 52(3): 181-182.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ.

Cancer statistics, 2006.
CA Cancer J Clin. 2006 Mar-Apr; 56(2): 106-130

Kabat GC, Ng SK, Wynder EL.

Tobacco, alcohol intake, and diet in relation to adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia.
Cancer Causes Control. 1993 Mar; 4(2): 123-132

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valet A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D.

Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers.
Cell 1997 Aug 22; 90(4): 809-819

Kastan MB, Zhan Q, elDeiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr.

A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia.
Cell 1992 Nov 13; 71(4): 587-597

Kato H, Yoshikawa M, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y, Tajima K, Masuda N, Tsukada K, Fukuda T, Nakajima T, Kuwano H.

Expression of p53 protein related to smoking and alcoholic beverage drinking habits in patients with esophageal cancers.
Cancer Lett. 2001 Jun 10; 167(1): 65-72

Ketcham AS, Wexler H, Mantel N.

Effects of alcohol in mouse neoplasia.
Cancer Res 1963; 23: 667-670

Kobayashi S, Koide Y, Endo M, Isono K, Ochiai T.

The p53 gene mutation is of prognostic value in esophageal squamous cell carcinoma patients in unified stages of curability.
Am J Surg. 1999 Jun; 177(6): 497-502

Koppert LB, Wijnhoven BP, van Dekken H, Tilanus HW, Dinjens WN.

The molecular biology of esophageal adenocarcinoma.
J Surg Oncol. 2005 Dec 1; 92(3): 169-190

Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH.

Regulation of p53 stability by mdm2.
Nature 1997 May 15; 387(6630): 299-303

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB.

Wildtype-p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation.
Proc Natl Acad Sci USA 1992 Aug 15; 89(16): 7491-7495

Kuwano H, Kato H, Miyazaki T, Fukuchi M, Masuda N, Nakajima M, Fukai Y, Shoda M, Kimura H, Faried A.

Genetic alterations in esophageal cancer.
Surg Today. 2005; 35(1): 7-18

Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O.

Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma.
N Engl J Med. 1999 Mar 18; 340(11): 825-831

Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O.

The role of tobacco, snuff and alcohol use in the aetiology of cancer of the oesophagus and gastric cardia.
Int J Cancer 2000 Feb 1; 85(3): 340-346

Lam KY, Tsao SW, Zhang D, Law S, He D, Ma L, Wong J.

Prevalence and predictive value of p53 mutation in patients with esophageal squamous cell carcinomas: a prospective clinico-pathological study and survival of 70 patients.
Int J Cancer 1997 Apr 22; 74(2): 212-219

Lamb P, Crawford L.

Characterization of the human p53 gene.
Mol Cell Biol 1986 May; 6(5): 1379-1385

Lane DP.

Cancer. P53, guardian of the genom.
Nature 1992 Jul 2; 358(6381): 15-16

Lane DP, Crawford LV.

T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells.
Nature. 1979 Mar 15; 278(5701): 261-263

Lehrbach DM, Nita ME, Ceconello I.

Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis.
Arq Gastroenterol 2003 Oct-Dec; 40(4): 256-261

Levine MS.

Esophageal cancer. Radiologic diagnosis.
Radiol Clin North Am. 1997 Mar; 35(2): 265-79

Levine MS, Halvorsen RA.

Carcinoma of the esophagus. In: Gore RM, Levine MS, editors. Textbook of gastrointestinal radiology. Philadelphia : Saunders; 2000, p. 403-433

Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D.

The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis.
Br J Cancer 1994 Mar; 69(3): 409-416

Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner Wa, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW.

A cancer family syndrome in twenty-four kindreds.
Cancer Res 1988 Sep 15; 48(18): 5358-5362

Linzer DI, Levine AJ.

Charakterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells.
Cell. 1979 May; 17(1): 43-52

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friens SH.

Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms.
Science 1990 Nov 30; 250(4985): 1233-1238

McBride OW, Merry D, Givol D.

The gene for human p53 cellular tumor antigens is located on chromosom 17 short arm (17p13)
Proc Natl Acad Sci USA 1986 Jan; 83(1): 130-134

McManus DT, Oлару A, Meltzer SJ.

Biomarkers of esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus.
Cancer Res. 2004 Mar 1; 64(5): 1561-1569

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ.

The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation.
Cell 1992 Jun 26; 69(7): 1237-1245

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1986; 51 Pt 1: 263-273

Munoz N, Victora CG, Crespi M, Saul C, Braga NM, Correa P.

Hot mate drinking and precancerous lesions of the oesophagus: an endoscopic survey in southern Brazil.
Int J Cancer. 1987 Jun 15; 39(6): 708-709

Murtaza I, Mushtaq D, Margoob MA, Dutt A, Wani NA, Ahmed I, Bhat ML.

A study on p53 gene alterations in esophageal squamous cell carcinoma and their correlation to common dietary risk factors among population of the Kashmir valley.
World J Gastroenterol. 2006 Jul 7; 12(25): 4033-4037

Nelson WG, Kastan MB.

DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways.
Mol Cell Biol 1994 Mar; 14(3): 1815-1823

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B.

Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types.
Nature 1989 Dec 7; 342(6250): 705-708

Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B.

Oncoprotein mdm-2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53.
Nature 1993 Apr 29; 362(6423): 857-860

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P.

The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users.
Hum Mutat 2002 Jun; 19(6): 607-614

Olivier M, Hussein SP, Caron de Fromentel C, Hainaut P, Harris CC.

TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer.
IARC Sci Publ. 2004; 157: 247-270

Oren M.

p53: the ultimate tumor suppressor gene?
FASEB J 1992 Oct; 6(13): 3169-3176

Oren M, Bienz B, Givol D, Rechavi G, Zakut R.

Analysis of recombinant DNA clones specific for the murine p53 cellular tumor antigen.
EMBO J 1983; 2(10):1633-1639

Pera M, Trastek VF, Carpenter HA, Allen MS, Deschamps C, Pairolero PC.

Barrett's esophagus with high-grade dysplasia: an indication for esophagectomy?
Ann Thorac Surg. 1992 Aug; 54(2):199-204.

Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P.

Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers.
Oncogene 2002 Oct 21; 21(48): 7435-7451

Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J.

Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990.
Int J Cancer. 1999 Sep 24; 83(1): 18-29. Erratum in: Int J Cancer 1999 Dec 10; 83(6): 870-873

Reed CE.

Surgical management of esophageal carcinoma.
Oncologist. 1999; 4(2): 95-105.

Ribeiro U Jr., Finkelstein SD, Safatle-Ribeiro AV, Landreneau RJ, Clarke MR, Bakker A, Swalsky PA, Gooding WE, Posner MC.

p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal cancer.
Cancer 1998 Jul 1; 83(1):7-18

Rice TW, Zuccaro G Jr, Adelstein DJ, Rybicki LA, Blackstone EH, Goldblum JR.

Esophageal carcinoma: depth of tumor invasion is predictive of regional lymph node status.
Ann Thorac Surg. 1998 Mar; 65(3):787-792

Risk JM, Evans KE, Jones J, Langan JE, Rowbottom L, McRonald FE, Mills HS, Ellis A, Shaw JM, Leigh IM, Kelsell DP, Field JK.

Characterization of a 500 kb region on 17q25 and the exclusion of candidate genes as the familial Tylosis Oesophageal Cancer (TOC) locus.
Oncogene. 2002 Sep 12; 21(41): 6395-6402

Romero Y, Cameron AJ, Schaid DJ, McDonnell SK, Burgart LJ, Hardtke CL, Murray JA, Locke GR 3rd.

Barrett's esophagus: prevalence in symptomatic relatives.
Am J Gastroenterol. 2002 May; 97(5): 1127-1132

Ronchetti D, Neglia CB, Cesana BM, Carboni N, Neri A, Pruneri G, Pignataro L.

Association between p53 gene mutations and tobacco and alcohol exposure in laryngeal squamous cell carcinoma.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2004 Mar; 130(3): 303-306

Rotter V, Boss MA, Baltimore D.

Increased concentration of an apparently identical cellular protein in cells transformed by either Abelson murine leukaemia virus or other transforming agents.
J Virol 1981 Apr; 38(1): 336-346

Rotter V, Witte ON, Coffmann R, Baltimore D.

Abelson murine leukaemia virus-induced tumors elicit antibodies against a host cell protein, p50.
J Virol 1980 Nov; 36(2): 547-555

Rozemuller EH, Kropfeld A, Kreyveld E, Leppers FG, Scheidel KC, Slootweg PJ, Tilanus MG.

Sensitive detection of p53 mutation: analysis by direct sequencing and multisequence analysis.
Cancer Detect Prev. 2001; 25(2): 109-116

Saidi F, Sepehr A, Fahimi S, Farahvash MJ, Salehian P, Esmailzadeh A, Keshoofy M, Pirmoazen N, Yazdanbod M, Roshan MK.

Oesophageal cancer among the Turkomans of northeast Iran.
Br J Cancer. 2000 Nov; 83(9): 1249-1254

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 1988 Jan 29; 239(4839): 487-491

Sandler RS, Nyren O, Ekblom A, Eisen GM, Yuen J, Josefsson S.

The risk of esophageal cancer in patients with achalasia. A population-based study.
JAMA. 1995 Nov 1; 274(17): 1359-1362

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci USA 1977 Dec; 74(12): 5463-5467

Sarnow F, Ho YS, Williams J, Levine AJ.

Adenovirus E1b-58 kD tumour antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kD cellular protein in transformed cells
Cell 1982 Feb; 28(2): 387-394

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM.

The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53.
Cell 1990 Dec 21; 63(6): 1129-1136

Schrump D, Altorki N, Forastiere A.

Cancer of the esophagus. In: De Vita VT Jr, Hellmann S, Rosenberg SA, eds. Cancer: Principles and practice of Oncology. Sixth Edition.
Philadelphia PA: Lippincott, Williams and Wilkins, 2001: 1051-1091

Sears LE, Moran LS, Kissinger C, Creasey T, Perry O, Keefe H, Roskey M, Sutherland E, Slatko BE.

CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase
Biotechniques 1992 Okt; 13(4): 626-633

Seitz HK, Pöschl G, Simanowski UA.

Alcohol and cancer. In: Galanter M, ed. Recent developments in alcoholism, the consequences of alcoholism.
New York, London: Plenum Press, 1998. p. 67-96

Seitz HK, Stickel F, Homann N.

Pathogenetic mechanisms of upper aerodigestive tract cancer in alcoholics.
Int J Cancer 2004 Feb 10; 108(4): 483-487

Shah MA, Schwartz GK.

Treatment of metastatic esophagus and gastric cancer.
Semin Oncol. 2004 Aug; 31(4): 574-587

Shaheen N, Ransohoff DF.

Gastroesophageal reflux, Barrett esophagus, and esophageal cancer: clinical applications.
JAMA. 2002 Apr 17; 287(15): 1982-1986

Siewert JR, Stein HJ.

Adenocarcinoma of the gastroesophageal junction: Classification, pathology and extent of resection.
Dis Esoph 1996; 9: 173-182

Siewert JR, Stein HJ, Feith M, Bruecher BL, Bartels H, Fink U.

Histologic tumor type is an independent prognostic parameter in esophageal cancer: lessons from more than 1,000 consecutive resections at a single center in the Western world.
Ann Surg. 2001 Sep; 234(3): 360-367

Slatko, B.E.

Thermal cycle dideoxy DNA sequencing
Methods Mol Biol. 1994; 31: 35-45

Smith LM, Kaiser RJ, Sanders JZ, Hood LE.

The synthesis and use of fluorescent oligonucleotides in DNA sequence analysis
Methods Enzymol. 1987; 155: 260-301

Szekely L, Selivanova G, Magnusson KP, Klein G, Wiman KG.

EBNA-5, Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins.
Proc Natl Acad Sci USA 1993 Jun 15; 90(12): 5455-5459

Taniere P, Martel-Planche G, Puttawibul P, Casson A, Montesano R, Chanvitan A, Hainaut P.

Tp53 mutations and MDM2 gene amplification in squamous-cell carcinomas of the esophagus in South Thailand.
Int J Cancer 2000 Oct 15; 88(2): 223-227

Tavani A, Negri E, Franceschi S, LaVecchia C.

Risk factors for oesophageal cancer in lifelong nonsmokers.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1994; 3: 387-392

Tavani A, Negri E, Franceschi S, LaVecchia C.

Tabacco and other risk factors for esophageal cancer in alcohol non-drinkers.
Eur J Cancer Prev. 1996 Oct; 5 (5): 313-318

Thomas P, Doddoli C, Lienne P, Morati N, Thirion X, Garbe L, Giudicelli R, Fuentes P.

Changing patterns and surgical results in adenocarcinoma of the oesophagus.
Br J Surg. 1997 Jan; 84(1): 119-125

Vaughan TL, Davis S, Kristal A, Thomas DB.

Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1995 Mar; 4(2): 85-92

Vicari JJ, Peek RM, Falk GW, Goldblum JR, Easley KA, Schnell J, Perez-Perez GI, Halter SA, Rice TW, Blaser MJ, Richter JE.

The seroprevalence of cagA-positive Helicobacter pylori strains in the spectrum of gastroesophageal reflux disease.
Gastroenterology. 1998 Jul; 115(1): 50-57

Victoria CG, Munoz N, Day NE, Barcelos LB, Peccin DA, Braga NM.

Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: a case-control study.
Int J Cancer. 1987 Jun 15; 39(6): 710-716

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ.

Surfing the p53 network.
Nature 2000 Nov 16; 408(6810): 307-310

Vousden KH, Lu X.

Live or let die: the cells response to p53.
Nat Rev Cancer 2002 Aug; 2(8): 594-604

Wallace-Brodeur RR, Lowe SW.

Clinical implications of p53 mutations.
Cell Mol Life Sci 1999 Jan; 55(1): 64-75

Warburton-Timms VJ, Charlett A, Valori RM, Uff JS, Shepherd NA, Barr H, McNulty CA.

The significance of cagA(+) *Helicobacter pylori* in reflux oesophagitis.

Gut. 2001 Sep; 49(3): 341-346

Woods YL, Lane DP.

Exploiting the p53 pathway for cancer diagnosis and therapy.

Hematol J 2003; 4(4): 233-247

Wu AH, Crabtree JE, Bernstein L, Hawtin P, Cockburn M, Tseng CC, Forman D.

Role of *Helicobacter pylori* CagA+ strains and risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus.

Int J Cancer. 2003 Mar 1; 103(6): 815-521

Wu AH, Wan P, Bernstein L.

A multiethnic population-based study of smoking, alcohol and body size and risk of adenocarcinomas of the stomach and esophagus (United States).

Cancer Causes Control. 2001 Oct; 12(8): 721-732

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D.

P21 is a universal inhibitor of cyclin kinases.

Nature 1993 Dec 16; 366(6456): 701-704

Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F.

P63, a p53 homolog at 3q27-28, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities.

Mol Cell 1998 Sep; 2(3): 305-316

Yokoyama A, Muramatsu T, Omori T, Yokoyama T, Matsushita S, Higuchi S, Maruyama K, Ishii H.

Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms and oropharyngolaryngeal, esophageal and stomach cancers in Japanese alcoholics.

Carcinogenesis. 2001 Mar; 22(3): 433-439

Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Nottermann D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ.

Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays.

Genes Dev 2000 Apr 15; 14(8): 981-993

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin oder Adenosin
A	Ampere
abs.	Absolut
AC	Adenokarzinom
bp	Basenpaare
C	Celsius
C	Cytosin oder Cytidin
ddA	Didesoxyadenosin
ddC	Didesoxycytidin
ddG	Didesoxyguanosin
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ddT	Didesoxythymidin
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
DEPC	Diethylcarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin oder Guanosin
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
M	mol*l ⁻¹
min	Minute
mRNA	Messenger-RNA, Boten-Ribonukleinsäure
p.a.	Pro Analysisi
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCC	squamous cell cancer, Plattenepithelkarzinom
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SSB	Single-stranded DANN binding protein
T	Thymin oder Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus, thermophiles Bakterium
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit, Aktivitätseinheit eines Enzyms
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt

8.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Die Einteilung des Adenokarzinoms des gastroösophagealen Übergangs nach Siewert	10
Abbildung 2: Lineare Darstellung der fünf strukturellen und funktionellen Domänen des p53-Proteins	13
Abbildung 3: PCR-Produkte vom p53-Gen im 2-prozentigen Agarosegel	37
Abbildung 4: PCR-Produkte vom p53-Gen im 2-prozentigen Agarosegel	38
Abbildung 5: A:T/G:C - Punktmutation im Codon 220, Exon 6	39
Abbildung 6: C:G/T:A - Punktmutation im Codon 282, Exon 8	39
Abbildung 7: G:C/A:T - Punktmutation im Codon 187, Exon 5	40
Abbildung 8: p53-Mutationsverteilung in den Exons 5-9	42
Abbildung 9: Mutationsmuster beim Plattenepithelkarzinom (SCC)	44
Abbildung 10: Mutationsmuster beim Adenokarzinom (AC)	44
Abbildung 11: Vergleich des Nikotinkonsums mit der Histologie	45
Abbildung 12: Vergleich des Nikotingenusses mit dem Mutationsstatus	46
Abbildung 13: Vergleich des Alkoholkonsums mit der Histologie	47
Abbildung 14: Vergleich des Alkoholkonsums mit dem Mutationsstatus	47
Abbildung 15: Vergleich der Überlebenszeit von Patienten	48
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Aktivierung von p53 und seiner Funktionen	55
Abbildung 17: Mutationsverteilung beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	58
Abbildung 18: Mutationsarten beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	58
Abbildung 19: Mutationsverteilung beim Adenokarzinom des Ösophagus	59
Abbildung 20: Mutationsarten beim Adenokarzinom des Ösophagus	59
Abbildung 21: Vereinfachte schematische Darstellung des Alkoholabbaus	63

8.3. Verzeichnis der Tabellen:

Tabelle 1: Die TNM-Klassifikation der Ösophaguskarzinome anhand der Richtlinien des American Joint Committee on Cancer	10
Tabelle 2: Übersicht über die klinischen Daten	22
Tabelle 3: Übersicht der gefundenen p53-Mutationen	40
Tabelle 4: Vergleich des p53-Mutationsmusters mit der weltweiten p53-Mutationsdatenbank des IARC	49