

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

**Untersuchung der Expression und biologischen Funktion der Cytochrom P 450  
Monooxygenase CYP 2C9 im Ösophaguskarzinom**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Levent Dizdar

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Stoecklein  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Bode

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einführung in die Thematik</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>1</b>
2.1 Das Ösophaguskarzinom	1
2.1.1 Epidemiologie	2
2.1.2 Ätiologie und Pathogenese	3
2.1.3 Diagnose und Staging	4
2.1.4 Therapie	6
2.1.5 Prognose	7
2.2 Cytochrom P450 Enzyme	8
2.2.1 Nomenklatur	8
2.2.2 Allgemeine Aufgaben	8
2.2.3 Cytochrom P450 und Karzinogenese	9
2.2.4 Cytochrom P450 2C9 und Epoxyeicosatriensäuren	12
2.3 Zielsetzung	14
<b>3. Material</b>	<b>15</b>
3.1 Tabelle Geräte	15
3.2 Tabelle Reagenzien	16
3.3 Tabelle Verbrauchsmaterial	17
3.4 Tabelle Antikörper und Kits	17
3.5 Patientenmaterial	17
3.5.1 Kryokonservierte Tumorproben	18
3.5.2 Ösophagus TMA	19
3.6 Zelllinien	20
<b>4. Methoden</b>	<b>21</b>
4.1 Molekulargenetische Untersuchungen	21
4.1.1 Präparation der kryokonservierten Tumorproben	21
4.1.2 RNA Isolation	21
4.1.3 Reverse Transkription	22
4.1.4 Grundlagen der Real- Time PCR	22
4.1.5 Durchführung der Real-Time PCR	23

4.1.6	Auswertung der Real-Time PCR	25
4.2	Immunhistochemische Untersuchungen	26
4.2.1	Der Tissue Microarray	26
4.2.2	Immunhistochemie	27
4.2.3	Das Prinzip der Avidin- Biotin- Komplexmethode	28
4.2.4	Die Durchführung der ICH am TMA	28
4.2.5	Optimierung der ICH für den TMA und Verwendung von Kontrollen	30
4.2.6	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	30
4.3	Zellkultur	31
4.3.1	CYP 2C9 Expressionsanalyse in Karzinomzelllinien	31
4.3.2	Nachweis von CYP 2C9 bei den Zelllinien K30 und PT1590 mittels Immunfluoreszenz	31
4.4	Der MTT-Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid)	32
4.4.1	Durchführung des MTT-Assay	32
4.4.2	Auswertung des MTT-Assay	33
4.5	Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse	33
4.5.1	Durchflusszytometrie (FACS)	33
4.5.2	BrdU und 7-AAD Markierung	34
4.5.3	Durchführung	34
4.5.4	Analyse und Auswertung	34
4.6	Statistische Auswertung	35
4.6.1	Mann-Whitney-U-Test	35
4.6.2	Spearman`s Rho Test	36
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
5.1	RT-PCR Analyse der CYP 2C9 Genexpression	37
5.1.1	CYP 2C9 Genexpression in Tumorproben und Normalmukosa	37
5.1.2	Korrelation der CYP 2C9 Expression mit klinisch-pathologischen Parametern	38

5.2	Immunhistochemische Analyse der CYP 2C9 Proteinexpression	40
5.2.1	CYP 2C9 Proteinexpression in Tumorproben und Normalmukosa	41
5.2.2	Korrelation des CYP 2C9 IRS mit klinisch-pathologischen Parametern	41
5.3	Korrelation der CYP 2C9 Expression (IRS) mit dem Proliferationsmarker Ki67	44
5.4	CYP 2C9 Expression in Ösophaguskarzinomzelllinien	47
5.4.1	RT- PCR	47
5.4.2	Immuncytochemische Färbung	47
5.5	Beeinflussung der Zellvitalität durch Sulfaphenazol	49
5.6	Reversibilität des Vitalitätsverlust durch 11,12- Epoxyeicosatriensäure	51
5.7	Beeinflussung des Zellzyklus durch Sulfaphenazol	52
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
6.1	CYP 2C9 Expression im Ösophaguskarzinom	56
6.2	Korrelation der CYP 2C9 Expression mit dem ki67 Proliferationsindex	57
6.3	CYP 2C9 Expression in Ösophaguskarzinomzelllinien	59
6.4	CYP 2C9 und seine Bedeutung für die Zellproliferation	59
6.5	Die Bedeutung von CYP 2C9 im Ösophaguskarzinom	61
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>63</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>10.</b>	<b>Publikationen</b>	<b>79</b>
<b>11.</b>	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>80</b>
<b>12.</b>	<b>Erklärung</b>	<b>81</b>
<b>13.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>82</b>

# **1. Einführung in die Thematik**

Seit den 1960er Jahren werden Cytochrom P450 Enzyme (CYPs) vornehmlich als in der Leber lokalisierte Enzyme beschrieben, welche Medikamente und andere Xenobiotica verstoffwechseln. Heute wissen wir jedoch, dass CYPs zusätzlich an vielfältigen zellulären Funktionen wie etwa dem Metabolismus von Eicosanoiden, Steroidhormonen oder Gallensäuren beteiligt sind und in nahezu allen Organen des menschlichen Körpers exprimiert werden [Nebert DW et al. 2006, Enayetallah AE et al. 2004]. In den vergangenen Jahren rückten CYPs zunehmend ins Zentrum des wissenschaftlichen Interesses, da sie auf vielfältige Art und Weise den Prozess der Karzinogenese im menschlichen Organismus beeinflussen [Nebert DW et al. 2006] und damit potentielle Ansatzpunkte für neue Therapiestrategien darstellen [Bruno RD et al. 2007]. So führte die zentrale Bedeutung der Isoformen CYP17 im Prostatakarzinom, bzw. CYP19 im Mammakarzinom zur Entwicklung der ersten in der Krebstherapie genutzten CYP Inhibitoren [Bruno RD et al. 2007, Reid AH et al. 2008, Hiscox S et al 2009]. Nach diesem Vorbild könnte in Zukunft die Inhibition weiterer Cytochrom P450 (CYP) Isoformen für die Therapie onkologischer Erkrankungen wie z.B. dem Ösophaguskarzinom genutzt werden. Das Ösophaguskarzinom weist mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 10-20% eine sehr schlechte Prognose auf, welche auch durch aggressive multimodale Therapiekonzepte und Weiterentwicklungen der chirurgischen Technik in den vergangenen Jahrzehnten nicht entscheidend verbessert werden konnte [Parkin DM et al. 2005, Mariette C et al. 2007, RKI 2008]. Im Rahmen dieser Arbeit soll zunächst das Expressionsverhalten sowie die biologische Funktion der CYP Isoform 2C9 analysiert werden und anschließend dessen Potential als neue Zielstruktur in der Therapie des Ösophaguskarzinoms evaluiert werden.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Das Ösophaguskarzinom**

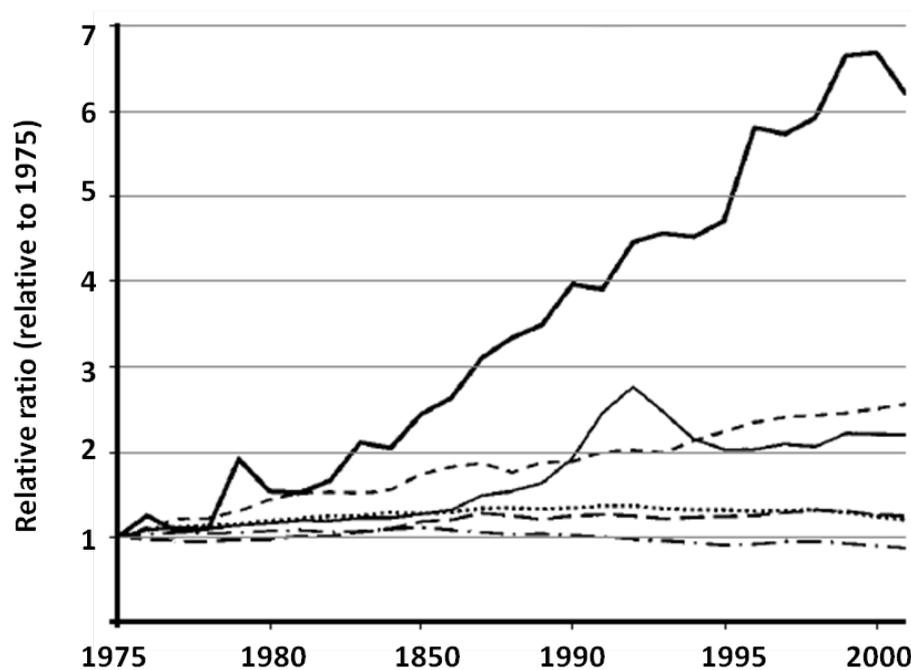
Weltweit liegt das Ösophaguskarzinom mit mehr als 450.000 neu diagnostizierten Fällen pro Jahr an Position acht der häufigsten Neoplasien. Gleichzeitig ist es mit 350.000 Todesfällen pro Jahr die sechsthäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit [Parkin DM 2005]. Da Symptome erst im späten Krankheitsverlauf auftreten und bereits frühe Tumorstadien häufig mit lymphogener Metastasierung einhergehen, wird die Diagnose in der Mehrzahl der

Fälle bei lokal und regional fortgeschrittenen Befunden gestellt [Siewert JR et al 2001, Collard JM et al. 2001]. Über 50% der Patienten zeigen bei Erstdiagnose einen nicht resezierbaren oder bereits metastasierten Tumor [Enziger PC et al. 2003]. Durch aggressive multimodale Therapiekonzepte und Weiterentwicklungen der chirurgischen Technik konnte zwar eine Verbesserung der Prognose des Ösophaguskarzinoms erzielt werden, mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 10-20% [Parkin DM et al. 2005, Mariette C et al. 2007, RKI 2008] ist die Prognose allerdings nach wie vor sehr schlecht. Ein besseres Verständnis der Tumorbiologie ist von essentieller Bedeutung um neue Strategien zur Prävention und Therapie des Ösophaguskarzinoms zu entwickeln.

### **2.1.1 Epidemiologie**

In Deutschland gehört das Ösophaguskarzinom mit etwa 4.930 Neuerkrankungen pro Jahr (Platz 17 der häufigsten Krebserkrankungen), was einer Inzidenz von etwa 6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr entspricht, zu den selteneren Krebserkrankungen [RKI Krebs in Deutschland 6. Auflage 2008, Bareiss D et al. 2002]. Weltweit gesehen unterliegt die Inzidenz des Ösophaguskarzinoms starken geographischen Schwankungen [Corley DA, Buffler PA 2001]. So variiert sie in Europa zwischen 2,2/100.000 Einwohnern in Griechenland und 17/100.000 in Frankreich. Die höchsten Inzidenzen finden sich mit bis zu 199 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern in Südostasien, insbesondere in einigen Provinzen Chinas [Bray F et al. 2002, Parkin MD et al 1999, Hou J et al. 1998]. In der Geschlechterverteilung des Ösophaguskarzinoms besteht eine ausgeprägte männliche Dominanz. Das Verhältnis von Mann zu Frau beträgt je nach Publikation von 3:1 bis zu 7:1 [Parkin DM et al. 2005, Crew KD, Neugut AI 2004, RKI 2008]. Das mittlere Erkrankungsalter der Männer liegt bei 65, das der Frauen bei 70 Jahren [RKI 2008]. Histologisch lässt sich das Ösophaguskarzinom in erster Linie in Plattenepithel- und Adenokarzinome unterteilen. Diese beiden histomorphologischen Ausprägungen repräsentieren über 90% aller Karzinome des Ösophagus [Daly JM et al. 2000]. Noch in den 1970er Jahren ließen sich in über 90 Prozent der Fälle Plattenepithelkarzinome nachweisen, nur 0,8 bis 3,7 Prozent aller Ösophagustumore waren Adenokarzinome [Crew KD, Neugut AI 2004]. Dieses Verhältnis hat sich in den letzten Jahrzehnten allerdings deutlich verschoben. Vor allem in Amerika und im westlichen Europa ist das Adenokarzinom des Ösophagus durch einen drastischen Anstieg der Inzidenz zum häufigsten Tumor des Ösophagus geworden [Daly JM et al. 2000, Blot WJ

et al. 1999, Devesa SS et al. 1998, Pera M et al. 1993, Wijnhoven BP et al. 2002, Blaser MJ et al. 2002, Bollschweiler E et al. 2001]. In der Gruppe der weißen Männer ab dem fünften Lebensjahrzehnt hat sich die Inzidenz des Adenokarzinoms mehr als versechsfacht [Pohl H, Welch G 2005]. Zumindest ein Teil dieses Inzidenzanstieges lässt sich durch den in der westlichen Welt steigenden Lebensstandard mit den damit einhergehenden Zivilisationskrankheiten Adipositas und gastroösophagealer Refluxkrankheit erklären [Lagergren J et al. 1999, Lagergren J et al. 2000].



**Abb. 2.1.1 Relative Veränderung der Inzidenz von Adenokarzinomen des Ösophagus und anderen Tumoren.** Die Daten entstammen dem „National Cancer Institute’s Surveillance, Epidemiology, and End Results Program“ orientiert an der amerikanischen Standardbevölkerung von 2002. **Fette schwarze Linie:** Adenokarzinom des Ösophagus. **Kurz gestrichelte Linie:** Melanome. **Feine schwarze Linie:** Prostata-CA. **Gestrichelte Linie:** Brustkrebs. **Gepunktete Linie:** Lungenkrebs. **Punkt-Strich Linie:** Kolorektales Karzinom. [Quelle: Pohl et al., 2005.]

### 2.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Hinsichtlich prädisponierender Faktoren und ihrer Pathogenese sind das Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom des Ösophagus voneinander abzugrenzen. Wichtigster Risikofaktor für die Entstehung des Adenokarzinoms des Ösophagus ist die gastroösophageale Refluxkrankheit [Chow WH et al. 1995, Lagergren J et al. 1999, Farrow DC et al 2000, Wu AH

et al. 2003]. Durch refluxbedingte Schleimhautschädigung am unteren Ösophagus kommt es bei 5-18% der betroffenen zur Ausbildung von Arealen einer intestinalen Metaplasie [Csendes A et al 2000, Corder AP et al 1996, Winters C et al 1987]. Dieser sogenannte Barrett Ösophagus bedingt durch vermehrtes Auftreten von Dysplasien ein 40-125-fach erhöhtes relatives Risiko für die Entstehung eines Adenokarzinoms im Vergleich zur Normalbevölkerung [Cameron AJ et al 1985, Drewitz DJ et al 1997, O'Connor JB et al 1999]. Auch die mit der Refluxkrankheit assoziierten Faktoren Adipositas und Einnahme von Medikamenten mit relaxierender Wirkung auf den unteren Ösophagus sphinkter, sowie Nikotinabusus wurden als Risikofaktoren identifiziert [Lagergren J et al 1999, Wu AH et al 2001, Lagergren J et al 2000]. Desweiteren sind die Hiatushernie und die Behandlung mit Magensäure hemmenden Medikamenten als prädisponierende Faktoren diskutiert worden. [Enziger PC 2003, Garcia Rodriguez et al. 2006]. Der Ätiologie entsprechend treten Adenokarzinome im distalen Ösophagus sowie im Bereich des gastroösophagealen Überganges auf. Beim Plattenepithelkarzinom spielt gastroösophagealer Reflux keine ursächliche Rolle. Dementsprechend sind Plattenepithelkarzinome anders als Adenokarzinome im gesamten Ösophagus zu finden, am häufigsten jedoch im mittleren Drittel [Siewert JR, Ott K. 2007]. Hier gelten Alkohol- und Nikotinabusus, vor allem in Kombination, als wichtigste Risikofaktoren [Lagergren et al. 2000, Engel LS et al. 2003, Freedman ND et al. 2007, Pandeya N et al. 2009]. Weitere häufig diskutierte Faktoren sind Nitrosamine [Mirvish S 1995], Ernährungsgewohnheiten [Ghardirian P et al. 1992, Bosetti C et al. 2000, Terry P et al. 2001], sozioökonomischer Status [Brown LM et al. 2001] und humane Papillomaviren [Sur M et al. 1998, Syrjänen KJ 2002]. Zusätzlich besteht eine Assoziation mit verschiedenen endogenen Erkrankungen wie z.B. dem Plummer-Vinson Syndrom [Larsson LG et al 1975, Watts J. 1961], der Achalasie [Streitz JM et al. 1995, Leeuwenburgh I. et al. 2006] und der Tylosis (familiäre palmoplantare Keratose) [Risk JM et al 1999, Marger RS, Marger D 1993].

### **2.1.3 Diagnose und Staging**

Das klassische Leitsymptom und damit Ausgangspunkt der Diagnosestellung des Ösophaguskarzinoms ist die Dysphagie [Daly JM et al 2000]. Da diese aufgrund der hohen Dehnungskapazität des Ösophagus erst auftritt, wenn ca. 2/3 des Ösophaguslumens vom Tumor verlegt sind, besteht zum Zeitpunkt der Diagnose bei über 50% der Patienten bereits

ein nicht resezierbarer oder metastasierter Befund [Enziger PC 2003]. Weitere häufig genannte Symptome sind Gewichtsverlust, Refluxbeschwerden, Odynophagie und Kurzatmigkeit [Daly JM et al 2000]. Die bevorzugten Verfahren der initialen Diagnostik bei Patienten mit Verdacht auf Ösophaguskarzinom sind die Röntgenkontrastdarstellung und Ösophago-Gastroskopie mit der Möglichkeit zur histologischen Bestimmung durch Biopsieentnahme. Zur Festlegung des Tumorstadiums werden dann eine Computertomographie von Thorax und Abdomen zum Ausschluss hämatogener Fernmetastasen, eine Endosonographie zur Beurteilung von Infiltrationstiefe und lymphogener Metastasierung, sowie bei suprabifurkalen Tumoren eine Bronchoskopie durchgeführt. Eine zunehmend größere Bedeutung im präoperativen Staging hat in den letzten Jahren das PET-Imaging erfahren [Flamen P et al 2000, Swisher SG et al 2004, Schauer M et Knoefel WT 2010]. Nach Abschluss aller Untersuchungen erfolgt die Stadieneinteilung nach den Richtlinien der UICC (Union International Contre le Cancer) (siehe Tabelle 2.1.3).

**Tabelle 2.1.3: Stadieneinteilung des Ösophaguskarzinoms**

Stadium	TNM-System			5-Jahres- überlebensrate
<b>0</b>	Tis	N0	M0	>95%
<b>I</b>	T1	N0	M0	50-80%
<b>II a</b>	T2, T3	N0	M0	30-40%
<b>II b</b>	T1, T2	N1	M0	10-30%
<b>III</b>	T3	N1	M0	10-15%
	T4	N0, N1	M0	10-15%
<b>IV a</b>	T1-T4	N0, N1	M1a	<5%
<b>IV b</b>	T1-T4	N0, N1	M1b	<1%

<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
Tis	Carcinoma in situ
T1	Invasion der Lamina propria oder Submucosa
T2	Invasion der Muskularis propria
T3	Invasion der Adventitia
T4	Invasion von Nachbarstrukturen
<b>N</b>	<b>Regionaler Lymphknotenbefall</b>
N0	Lymphknoten Tumorfrei
N1	regionaler Lymphknotenbefall
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
M0	keine Fernmetastasen
M1a	Metastasen in zöliakalen (Tumor im Unteren Ösophagus) bzw. in zervikalen Lymphknoten (Tumor im oberen Ösophagus)
M1b	andere Fernmetastasen

#### 2.1.4 Therapie

Für die Wahl des therapeutischen Vorgehens sind Lokalisation und Tumorstadium sowie Allgemeinzustand und Begleiterkrankungen des Patienten zu berücksichtigen. Die einzige Chance auf Heilung bietet die chirurgische R0 Resektion des Tumors inklusive aller befallenen Lymphknoten [Malthaler RA et al 2004, Hulscher JB et al 2002]. Dies ist aufgrund der späten Diagnosestellung aber nur bei bis zu 39% aller Patienten möglich [Malthaler RA et al 2006]. Die am häufigsten angewendeten Verfahren zur Resektion des Ösophagus sind die thorako-abdominale- und die transhiatale Ösophagektomie. Bei Vorliegen einer lokalen Inoperabilität durch Infiltration benachbarter Strukturen wie Aorta oder Trachea kann

versucht werden, durch neoadjuvante Radiochemotherapieverfahren ein Downstaging zu erreichen, woraufhin eine Operation mit kurativer Intention möglich wird [Slater et al 2001]. Ob eine neoadjuvante oder adjuvante Radio-Chemotherapie bei resektablen Tumoren mit einem prognostischen Nutzen verbunden ist, ist weiterhin umstritten [Mariette C et al 2007, Malthaler et al 2004 und 2006, Urschel et al 2002 und 2003]. Bei inoperablen Patienten kommen palliative Therapieverfahren zur Anwendung. Ziel ist die Aufrechterhaltung der Ösophaguspassage z.B. durch endoskopische Bougierung und Stenteinlage oder Laserbehandlung sowie die Sicherung der Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr durch frühzeitige perkutane-endoskopische Gastrostomie. Inwiefern eine palliative Radiochemotherapie die Prognose beeinflusst, ist nicht eindeutig geklärt [Homs MY et al 2006].

### **2.1.5 Prognose**

Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 10-20% gehört das Ösophaguskarzinom zu den bösartigsten Neoplasien überhaupt [Parkin DM et al 2005, Mariette et al 2007, RKI 2008]. Die individuelle Prognose ist eng mit dem UICC-Stadium zu Beginn der Therapie korreliert. Weitere Prognoserelevante Faktoren sind: Anzahl befallener Lymphknoten, lymphatische Mikrometastasen, vaskuläre und perineurale Invasion, Differenzierungsgrad, Tumorgröße, positive circumferential resection margin, Gewichtsverlust von über 10% der Körpermasse und hohes Alter. [Enziger et al 2003, Thompson SK et al 2008]. Nach einer R0 Resektion des Tumors beträgt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei einem carcinoma in situ (stadium 0) über 95%, für Stadium I 50-80%, für Stadium IIA 30-40%, für Stadium IIB 10-30% und für Stadium III 10-15%. Bei Patienten mit Fernmetastasierung (Stadium IV) ergibt sich ein Medianes Überleben von unter einem Jahr [Enziger et al 2003](Tabelle 2.1.3).

## **2.2 Cytochrom P450 Enzyme**

Cytochrom P450 Enzyme (CYPs) sind eine sehr weit verbreitete Gruppe von Hämoproteinen, die in praktisch allen Organismen, angefangen bei Bakterien über Pflanzen und Tiere bis hin zum Menschen konserviert sind [Nebert DW et al. 2006, Bathelt CM et al 2008]. Sie gehören zu den wichtigsten Stoffwechsellenzymen des menschlichen Organismus, da sie entscheidend am Metabolismus exogener wie auch endogener Substanzen beteiligt sind [Nebert DW et al. 2002, 2006]. Die Bezeichnung P450 beruht auf dem charakteristischen Absorptionsspektrum des reduzierten kohlenmonoxid gebundenen Komplexes mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm. Das P in P450 steht dabei für Pigment [Omura T, Sato R 1964]. Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan beinhaltet 90-95% aller CYPs des menschlichen Organismus, wobei diese vornehmlich in Membranen des Endoplasmatischen Retikulums der Hepatozyten lokalisiert sind [Shimada et al. 1994]. In geringerem Ausmaß sind CYPs aber auch in extrahepatischem Gewebe wie Haut, Lunge oder Magendarmtrakt nachweisbar [Ding X et al 2003].

### **2.2.1 Nomenklatur**

Aufgrund von Homologien in ihrer Aminosäuresequenz werden CYPs in Familien und Subfamilien eingeteilt. Aus einer Familie stammen alle Enzyme, deren Aminosäuresequenz zu mindestens 40% identisch ist, aus einer Subfamilie bei einer Homologie von 55% oder mehr. Der Name des jeweiligen Enzyms setzt sich aus dem Kürzel CYP gefolgt von einer arabischen Ziffer für die Familie, einem Buchstaben für die Subfamilie und einer abschließenden Ziffer für die entsprechende Isoform zusammen [Nebert DW, Russell DW 2002]. Derzeit sind 18 Familien und 44 Subfamilien humaner Cytochrom P450 Enzyme bekannt [Nelson DR 2009]. Für viele CYP-Isoformen existieren zusätzlich verschiedene Genvarianten, sogenannte Polymorphismen. Diese bewirken zum Teil deutliche Unterschiede in der Enzymaktivität [Rodriguez-Antona C et al. 2006] und werden durch den Zusatz eines Sterns und einer arabischen Ziffer klassifiziert [Nebert DW et al. 2006].

### **2.2.2 Allgemeine Aufgaben**

Vor allem für den Metabolismus exogener Substanzen (Xenobiotika) wie Umweltschadstoffe oder Medikamente spielen CYPs eine herausragende Rolle. Sie repräsentieren mit 70-80% die überwiegende Mehrzahl aller am Phase-I Stoffwechsel beteiligten Enzyme [Evans WE et

al. 1999, Nebert DW et al. 2006]. Ziel der Phase-I Reaktionen ist die Einführung zusätzlicher funktioneller Gruppen in die meist lipophilen Substrate, an die im Phase-II Metabolismus weitere polare Gruppen wie Glutathion oder Glukoronsäure angefügt werden können. Auf diese Weise wird die Wasserlöslichkeit der Substanzen erhöht und ihre Ausscheidung über Urin oder Stuhl erleichtert. Bei den von CYPs katalysierten Reaktionen handelt es sich überwiegend um Oxidationen. Dabei wird ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff in eine Kohlenwasserstoff-Bindung des Substrats eingefügt, welches dadurch oxidiert oder peroxidiert wird. Das zweite Sauerstoffatom dagegen wird reduziert und verlässt den Reaktionszyklus in Form von Wasser. Als Reduktionsmittel dienen die Coenzyme NADH oder NADPH [Ortiz de Montellano PR 2009]. Die von CYPs katalysierten Reaktionen im Rahmen des Phase-I Metabolismus besitzen eine Schlüsselrolle bei der Entgiftung vieler Xenobiotika [Nelson DR et al. 1996, Ding X et al. 2003, Nebert DW et al. 2006]. Neben Fremdstoffen werden aber auch körpereigene Substanzen wie z.B. Cholesterin, Corticosteroide, Gallensalze, Arachidonsäure und Vitamin D<sub>3</sub> durch CYPs verstoffwechselt [Nebert DW et al. 2006]. Keines der Enzyme ist allerdings in der Lage, die gesamte Vielzahl dieser Reaktionen zu katalysieren. Einige Isoformen haben eine breite Substratspezifität, andere vermitteln nur eine bestimmte Reaktion. So können CYP katalysierte Reaktionen zum einen hochspezifisch ablaufen wie bei der Biosynthese von Hormonen, zum anderen aber auch unspezifisch sein, wie bei der Detoxifikation von Fremdstoffen [Bruno RD et al 2007].

### **2.2.3 Cytochrom P450 und Karzinogenese**

CYPs sind auf vielfältige Art und Weise dazu in der Lage, die Karzinogenese im menschlichen Organismus zu beeinflussen. Im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus sind sie entscheidend an der Entgiftung zahlreicher Karzinogene beteiligt. Als Nebeneffekt dieser Entgiftung kann es allerdings auch zur intermediären Bildung hochreaktiver, elektrophiler Substanzen kommen. Diese können unter Adduktbildung mit nukleophilen Molekülen wie DNA-Basen oder Proteinseitenketten reagieren und so bei ausbleibender oder fehlerhafter Reparatur zur Krebsentstehung beitragen [Ding X et al. 2003, Nebert DW et al. 2006]. Im Rahmen der Chemotherapie kann eine solche Bioaktivierung aber auch erwünscht sein. Beispielsweise, wenn dadurch Zytostatika wie z.B. Cyclophosphamid, Docetaxel oder Tamoxifen in ihre aktiven Metabolite umgewandelt werden [Patterson LH et al 2002, Ahern TP et al 2009, Pastina I et al. 2010, Sideras K et al. 2010]. Neben der Metabolisierung verschiedenster

Xenobiotika sind CYPs auch am Stoffwechsel endogener Substanzen wie Steroiden, Vitamin A, Vitamin D und Arachidonsäure beteiligt. Auf diese Weise greifen CYPs in vielfältige Signaltransduktionswege ein, die unter anderem auch im Rahmen der Karzinogenese eine entscheidende Rolle spielen. So sind z.B. CYP17 und CYP19 für die Produktion von Androgenen und Östrogenen verantwortlich. Die zentrale Bedeutung dieser Hormone bei der Entstehung des Prostata- und Mammakarzinoms führte zur Entwicklung der ersten in der Krebstherapie genutzten CYP Inhibitoren [Bruno RD et al. 2007, Reid AH et al. 2008, Hiscox S et al 2009]. Nach diesem Vorbild könnte in Zukunft auch die Inhibition von Vitamin A und D, oder Arachidonsäure metabolisierenden CYPs für onkologische Therapien genutzt werden [Nebert DW et al. 2006, Bruno RD et al. 2007, Jiang JG et al. 2005].

Zusammengefasst beeinflussen CYPs auf vielfältigen Wegen den Prozess der Karzinogenese. Demnach ist es denkbar, dass die individuell unterschiedliche Aktivität einiger CYP Isoformen mit einem erhöhten bzw. reduzierten Risiko für das Auftreten bestimmter Karzinome assoziiert ist. Basierend auf dieser Vermutung wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Studien durchgeführt, die den Zusammenhang zwischen CYP-Aktivität und dem Risiko der Entstehung von Malignomen untersuchten. Hierbei wurde die Tatsache genutzt, dass für viele CYP-Isoformen Polymorphismen existieren, die mit einer unterschiedlichen Aktivität des Enzyms einhergehen. Die Mehrzahl dieser Untersuchungen besitzt allerdings nur eine geringe Aussagekraft, da häufig zu wenige Fälle analysiert wurden und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse existieren [Agundez JA 2004]. Die folgende Tabelle liefert eine Übersicht über die Ergebnisse der durchgeführten Studien.

**Tabelle 2.2.3 CYP-Polymorphismen und Krebsrisiko**

Polymorphismus	Lunge	Kopf/Hals (1)	Ösophagus	Leber	Kolorektal	Brust	Blase	Prostata
CYP1A1	+	+/-	+/- (2)	-	+/- (2)	-	-(2)	+(2)
CYP1A2	-(2)	n.u.	n.u.	-(2)	-	n.u.	-	-(2)
CYP1B1	+(2)	+(2)	n.u.	n.u.	-(2)	-(2,3)	n.u.	+(2)
CYP2A6	+/-	n.u.	-(2)	-(2)	+(2)	n.u.	n.u.	n.u.
CYP2C9	-	n.u.	n.u.	n.u.	+/- (2)	n.u.	n.u.	n.u.
CYP2C19	+(2)	n.u.	n.u.	+/- (2)	+(2)	n.u.	-	-
CYP2D6	+	-(2)	n.u.	+	-	-	-	-
CYP2E1	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-(2)	-(2)	-(2)
CYP3A4	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-(2)	n.u.	+/- (2)

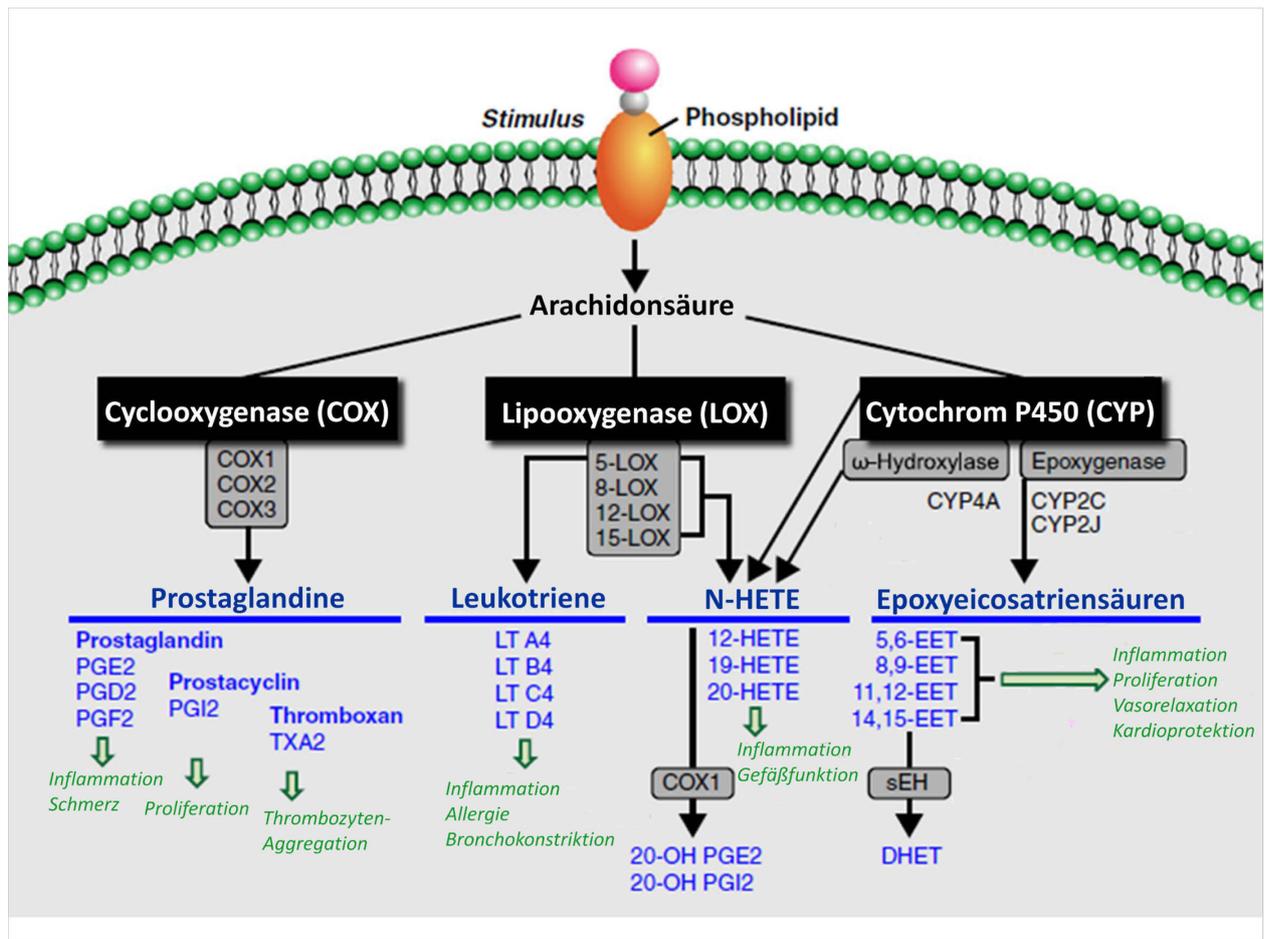
Zusammenfassung von Studien die nach einer Assoziation von CYP-Polymorphismen und Krebsrisiko suchen. (+) positive Assoziation, (-) keine relevante Assoziation, (+/-) widersprüchliche Ergebnisse, (n.u.) nicht untersucht. (1) Mund-, Pharynx- und Larynxkarzinome. (2) weitere Studien werden benötigt. (3) eine Bedeutung bei hormonabhängigem Brustkrebs kann bestehen. [Agundez JA 2004]

Die mit Abstand höchste Konzentration und Aktivität an CYPs findet sich in der Leber. Sie bestimmt als zentrales Stoffwechselorgan des Menschen die systemischen Spiegel der meisten Xenobiotika sowie ihrer Metaboliten [Ding X et al. 2003]. Doch auch in extrahepatischen Geweben, vor allem in solchen, die häufig mit Fremdstoffen in Kontakt stehen, konnte die Expression zahlreicher CYPs nachgewiesen werden [Hukkanen J et al. 2002, Castell JV et al. 2005, Ding X et al. 2003]. Diese Tatsache könnte auch im Rahmen der Karzinogenese von essenzieller Bedeutung sein. Wie zuvor beschrieben, werden viele Xenobiotika und Prokarzinogene erst durch CYPs katalysierte Reaktionen im Körper zu toxischen Substanzen bzw. Karzinogenen aktiviert [Nebert DW et al. 2006, Hashizumea T et al. 2009]. Die entstehenden reaktiven Produkte sind häufig sehr instabil und kurzlebig, so dass ihr Reaktionsradius vor allem die unmittelbare Umgebung ihrer Entstehung betrifft [Ding X et al. 2003]. Ein gewisser Anteil der toxischen bzw. kanzerogenen Stoffe in extrahepatischen Organen stammt demzufolge sehr wahrscheinlich aus lokaler CYP-vermittelter metabolischer Aktivierung. Die gewebespezifische Expression verschiedener CYPs ist demnach mit der Sensitivität eines Organs gegenüber toxischen bzw. kanzerogenen Effekten exogener Substanzen assoziiert [Ding X et al. 2003]. Analog könnte die selektive Inhibition ausgewählter CYP Isoformen die Entstehung von Karzinomen in bestimmten Geweben reduzieren [Bruno et al. 2007].

#### **2.2.4 Cytochrom P450 2C9 und Epoxyeicosatriensäuren**

Gemeinsam mit den Isoformen CYP 2C8, 2C18 und 2C19 bildet CYP 2C9 die Subfamilie CYP 2C, die etwa 20% des hepatischen CYP-Gehaltes repräsentiert [Shimada T et al. 1994]. Innerhalb dieser Familie stellt CYP 2C9 mit 60 % den Hauptteil der CYP2C-Isoenzyme in der menschlichen Leber [Goldstein JA et al. 1994] bereit. Zudem wird CYP 2C9 in extrahepatischen Geweben wie Gastrointestinal- und Respirationstrakt, sowie in Nieren, Pankreas und Prostata exprimiert [Enayetallah AE et al. 2004]. Damit ist CYP 2C9 eines der am häufigsten vorkommenden CYPs im menschlichen Körper. Es ist an der Metabolisierung zahlreicher exogener Substanzen beteiligt [Zhou SF et al. 2009], darunter über 100 Medikamente und Umweltgifte, wie z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PHAs) [Degawa M et al. 1994, Ozawa S et al. 1999, Chan AT et al. 2004]. Das Auftreten erblich bedingter Allelvarianten, sogenannter Polymorphismen, verursacht individuelle Unterschiede der Enzymaktivität. Einige dieser Genotypen konnten als Risikofaktor für die Entstehung von Karzinomen identifiziert werden [London SJ et al 1997, Chan AT et al 2004, Bartsch H et al 2000, Tranah GJ et al 2005], wobei zum Teil widersprüchliche Ergebnisse existieren [Agundez JA 2004].

Neben seiner zentralen Rolle im Metabolismus verschiedenster Xenobiotica ist CYP 2C9 auch an der Metabolisierung endogener Substanzen beteiligt [Zhou SF et al. 2009, Spector AA 2009]. So ist es wie auch die anderen Isoformen der Subfamilien 2C und 2J in der Lage, durch Epoxygenierung von Arachidonsäure Epoxyeicosatriensäuren (EETs) zu generieren. Diese CYP-katalysierte Reaktion repräsentiert einen der drei Hauptmetabolisierungswege der Arachidonsäure, welche alternativ über die Cyclooxygenase zu Prostaglandinen und Thromboxan oder über die Lipooxygenase zu Leucotrienen metabolisiert werden kann [Spector AA et al 2004, 2009, Fleming I 2007]. Die entstehenden Metabolite haben Einfluss auf die Homöostase zahlreicher Gewebe und sind an der Regulation vielfältiger physiologischer Prozesse wie Inflammation, Vasomotorik, Angiogenese oder Zellproliferation beteiligt (Abbildung 2.2.4) [Panigrahy D et al. 2010].



**Abbildung 2.2.4:** Schematischer Überblick über die Arachidonsäure metabolisierenden Enzyme (schwarze Kästen), ihre Metabolite (blau) und deren biologische Funktion (grün). [Panigrahy D et al. 2010]

Auch in der Pathogenese maligner Erkrankungen spielen die Metabolite der Arachidonsäure eine bedeutende Rolle. So sind Prostaglandine, Leukotriene und EETs z.B. dazu in der Lage, die Proliferation und Migration von Karzinomzellen sowie deren Resistenz gegenüber Apoptose zu steigern [Danneberg AJ et al 2003, Fürstenberger G et al 2006, Pidgeon GP et al 2007, Jiang JG et al 2005, 2007, Panigrahy D et al. 2010, Nithipatikom K et al. 2010].

Inwiefern CYP 2C9 und seine Produkte eine Rolle im Prozess der Karzinogenese spielen, ist bislang nur wenig untersucht, auch wenn es einige Hinweise für die Bedeutung des Enzyms im Rahmen der Tumorentstehung gibt. So ist etwa die CYP 2C9 Expression in malignem Gewebe weit verbreitet. Unter den Arachidonsäure metabolisierenden CYPs 2C9, 2C8 und 2J2 ist es die in Malignomen am häufigsten exprimierte Isoform [Enayetallah et al 2006]. Über die biologische Funktion in neoplastischen Geweben ist bislang allerdings nur wenig bekannt.

### 2.3 Zielsetzung

Die Prognose des Ösophaguskarzinoms ist trotz Verwendung aggressiver multimodaler Therapiekonzepte, sowie verbesserter Operationstechniken und intensivierter perioperativer Betreuung der Patienten weiterhin schlecht. Aus diesem Grund ist ein besseres Verständnis der Tumorbilogie und die Entwicklung neuer Strategien zur Prävention und Therapie des Ösophaguskarzinoms dringend erforderlich. Arachidonsäure und seine Metabolite haben in den vergangenen Jahren großes Interesse in der Krebsforschung geweckt. Doch anders als den Prostaglandinen und Leukotrienen wurde den durch CYP's generierten EETs bisher nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Es gibt jedoch eindeutige Hinweise darauf, dass auch EETs im Prozess der Karzinogenese eine bedeutende Rolle spielen. Ein neuer therapeutischer Ansatz in der Therapie des Ösophaguskarzinoms könnte demnach die Inhibition EET produzierender CYPs wie z.B. CYP2C9 sein.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Expressionsverhalten sowie die biologische Funktion der CYP Isoform 2C9 im Ösophaguskarzinom zu analysieren und anschließend dessen Potential als neue Zielstruktur in der Therapie des Ösophaguskarzinoms zu evaluieren.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- **Untersuchung des Expressionsverhaltens der CYP Isoform 2C9 in ösophagealer Normalmukosa, sowie dem Adeno- und Plattenepithelkarzinom des Ösophagus**  
Hierzu wurden molekulargenetische und immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt.
- **Untersuchung der Korrelation zwischen CYP2C9 Expression und Proliferationsverhalten des Ösophaguskarzinoms**  
Hierzu wurde die CYP2C9 Proteinexpression mit dem Ki67 LI korreliert.
- **Untersuchung der Wirkung des selektiven CYP2C9 Inhibitors Sulfaphenazol auf Ösophaguskarzinomzellen in der Zellkultur**  
Hierzu wurden verschiedene Ösophaguskarzinomzelllinien nach CYP2C9 Inhibition mittels MTT-Assay bzw. BrdU-FACS analysiert.

### 3. Material

Tabelle 3.1 Geräte

Gerät	Produktname	Hersteller
ELISA-Reader	Sunrise	Tecan
Durchflusszytometer	FACS-Calibur	BD Pharmingen
Mikroskop	Leica DMIL	Leica
Digitale Farbkamera	Leica DFC 300 FX	Leica
Vorschaltgerät	ebq 100	Leica
Wasserbad	Leica HI 1200	Leica
Schlittenmikrotom	Leica SM 2000R	Leica
Mikroskop	Axioskop	Zeiss
Mikroskop	Wilovert A	Hund
Feinwage	Voyager Pro	Ohaus
Real-Time PCR Detector	Chromo 4	Bio-Rad
Sicherheitswerkbank	Hera Safe	Heraeus Instruments
Brutschrank	Hera cell	Heraeus Instruments
Reagenzglasmixer	lab dancer	IKA
Schüttelinkubator	KS 250 basic	IKA
Reagenzglasmixer	Vortex Mixer 7-2020	neoLab
Thermoblock Heizgerät	neoBlock II	neoLab
Lagerbehälter	BIOSAFE	Cryotherm
Gefrierschrank	Thermo	Electron Corporation
Mini Zentrifuge	C-1200	National Labnet
Thermoblock Heizgerät	Dry Bath System	Star Lab
Ofen	Modell 400	Memmert
Wasserbad	WNE 14	Memmert
Kryoschneider	MTE	SLEE Technik
Thermomixer	Thermomixer comfort	eppendorf
Photometer	Biophotometer	eppendorf
Real-Time PCR Detector	Chromo 4	Bio-Rad
Zentrifuge	Universal 32 R	Hettich
Zentrifuge	Universal 30 RF	Hettich
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	IBS
Pipetten	10 - 1000µl	eppendorf
Neubauer Zählkammer		Brand

**Tabelle 3.2 Reagenzien**

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Mayers Häkalaun	Merck
Chloroform	Merck
Isopropanol	Merck
Ethanol 99%	Merck
Xylol	Merck
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck
Mayers Häkalaun	Merck
Entellan	Merck
Paraformaldehyd	Merck
TRizol	Gibco
DPBS 1x	Gibco
1x PBS-Tabletten	Gibco
Nukleasefreies Wasser	Gibco
Trypanblau 0,4%	Gibco
Transcriptor Reverse Transcriptase	Roche
RT-Puffer (5x)	Roche
dNTP (10mM)	Roche
Protector RNase Inhibitor	Roche
DAPI	Roche
10x Target Retrieval Solution	Dako
DAB	Dako
Tween20	Sigma
Triton x-100	Sigma
Sulfaphenazole	Sigma
11,12-EET	Sigma
DMSO	Sigma
Stain Buffer	BD Pharmingen
AB-Serum	Biotest
Oligo dT Primer	Invitrogen
Tissue-Tek	Sakura

**Tabelle 3.3 Verbrauchsmaterial**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Chamber Slides	Lab-Tek
Super Frost Plus Objektträger	VWR
Deckgläschen	VWR
15 und 50 ml Tubes	Falcon
6 und 96 well Zellkulturplatten	Corning Inc.
FACS Röhrchen	BD Pharmingen
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Greiner
15 und 50 ml Tubes	Falcon
10 - 1000µl Pipettenspitzen	Star Lab
1,5 und 2ml eppendorf Tubes	eppendorf
Liquid Blocker Super Pap Pen Mini	MBT Brand
5 - 25ml Stripetten	

**Tabelle 3.4 Antikörper und Kits**

<b>Antikörper und Kits</b>	<b>Hersteller</b>
ABC-Kit: Rabbit IgG	Vectastain
ABC-Kit: Mouse IgG	Vectastain
CYP2C9	AbD Serotec
Ki67	Dako
X0903	Dako
Anti-Rabbit-Cy3	Sigma
FITC BrdU Flow Kit	BD Pharmingen

### 3.5 Patientenmaterial

Das Untersuchungskollektiv umfasste insgesamt 44 kryokonservierte und 183 in Paraffin eingebettete (FFPE) primäre Ösophaguskarzinome, welche von radikalen Ösophagektomien aus den Jahren 1986 bis 2008 stammten. Die FFPE Proben lagen in Form von Tissue Mikro Arrays (TMAs) vor. Zudem wurden 21 kryokonservierte und 76 paraffinisierte Normalmukosen aus nicht tumorbefallenen Arealen der Ösophaguspräparate analysiert. Für die Entnahme der Gewebeproben zu Forschungszwecken lag eine Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Düsseldorf vor.

### 3.5.1 Kryokonservierte Tumorproben

Die Expression von CYP 2C9 wurde an 46 schockgefrorenen Ösophaguskarzinompräparaten und 21 Normalmukosen mittels PCR analysiert. Es handelte sich um 16 Plattenepithelkarzinome und 30 Adenokarzinome des Ösophagus, die im Zeitraum vom Februar 2004 bis zum Oktober 2008 an der Klinik für Viszeralchirurgie der Universität Düsseldorf operiert wurden. Das Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt variierte zwischen 46 und 85 Jahren, der Median lag bei 55 Jahren. Intraoperativ wurde ein repräsentativer Teil des Primärtumors sowie ein Stück Normalmukosa entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei – 162°C in der Tumorbank des chirurgischen Forschungslabors der Universität Düsseldorf. An klinisch-pathologischen Daten standen neben Alter und Geschlecht der Patienten das pathologische Tumorstadium nach TNM- Klassifikation, das zytologische Grading, die R-Klassifikation sowie die Nachbeobachtungsdaten zur Verfügung (Tabelle 3.5.1). Es wurden nur Tumore in die Untersuchung einbezogen, bei denen sich im Rahmen der pathologischen Routinediagnostik ein R0 Status ergab. Nicht bei allen Patienten waren die Daten vollständig.

**Tabelle 3.5.1: Patientencharakteristika I**

	ESCC	EAC
<b>Patienten</b>	16 (100%)	30 (100%)
<b>Geschlecht</b>		
Männlich	10 (62,5%)	24 (80%)
Weiblich	6 (37,5%)	6 (20%)
<b>T – Stadium</b>		
T1	8 (50%)	4 (13,3%)
T2	1 (6%)	10 (33,3%)
T3	7 (44%)	16 (53,3%)
T4	0 (0%)	0 (0%)
<b>N – Stadium</b>		
N0	9 (56%)	11 (37%)
N1	7 (44%)	19 (63%)
<b>M – Stadium</b>		
M0	16 (100%)	28 (93%)
M1	0 (0%)	2 (7%)
<b>Grading</b>		
G1	1 (6%)	0 (0%)
G2	11 (69%)	13 (46%)
G3	3 (19%)	15 (46%)
G4	0 (0%)	0 (0%)

### 3.5.2 Ösophagus TMA

Mit Immunhistochemischen Färbemethoden wurden 183 in Paraffin eingebettete Ösophaguskarzinompräparate auf die Expression von CYP 2C9 und Ki67 untersucht. Es lagen 105 Plattenepithelkarzinome und 78 Adenokarzinome des Ösophagus vor. Die Präparate stammten aus Ösophagusresektionen, die im Zeitraum von 1986 bis 2005 an den chirurgischen Kliniken der Universitäten Düsseldorf und Köln durchgeführt wurden. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 36 und 83 Jahren, das mittlere Alter bei 61 Jahren (Abbildung 3.5.2). Auch für diese Präparate standen Patientendaten sowie das pathologische Tumorstadium zu Verfügung (Tabelle 3.5.2).

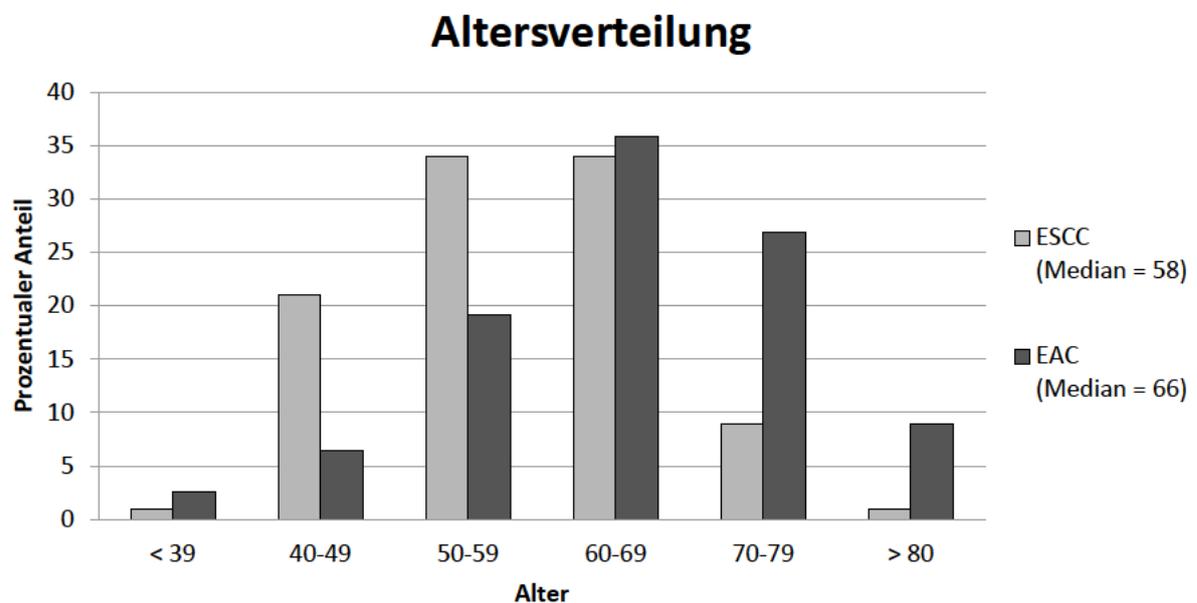


Abbildung 3.5.2: Altersverteilung

**Tabelle 3.5.2: Patientencharakteristika II**

	ESCC	EAC
<b>Patienten</b>	105 (100%)	78 (100%)
<b>Geschlecht</b>		
männlich	78 (74%)	63 (81%)
weiblich	27 (26%)	15 (19%)
<b>T - Stadium</b>		
T1	16 (15%)	5 (6%)
T2	22 (21%)	41 (53%)
T3	64 (61%)	30 (29%)
T4	3 (3%)	0 (0%)
<b>N - Stadium</b>		
N0	37 (35%)	25 (32%)
N1	68 (65%)	51 (66%)
<b>M - Stadium</b>		
M0	103 (98%)	67 (86%)
M1	2 (2%)	9 (12%)
<b>Grading</b>		
G1	2 (2%)	0 (0%)
G2	58 (55%)	20 (26%)
G3	45 (43%)	36 (46%)
G4	0 (0%)	13 (17%)

### 3.6 Zelllinien

Für in vitro - Experimente wurden die in Tabelle 3.6 aufgeführten humanen Adeno- und Plattenepithelkarzinomzelllinien des Ösophagus verwendet.

**Tabelle 3.6: Ösophaguskarzinomzelllinien**

Zelllinie	Histologie	Medium	Bezugsquelle
KYSE-30	Plattenepithelkarzinom	RPMI1640 + 10% FCS	
KYSE-270	Plattenepithelkarzinom	RPMI1640 + 10% FCS	
KYSE-410	Plattenepithelkarzinom	RPMI1640 + 10% FCS	
KYSE-520	Plattenepithelkarzinom	RPMI1640 + 10% FCS	
COLO-680N	Plattenepithelkarzinom	RPMI1640 + 10% FCS	
OE19	Adenokarzinom	RPMI1640 + 10% FCS	
OE33	Adenokarzinom	RPMI1640 + 10% FCS	
PT1590	Adenokarzinom	RPMI1640 + 10% FCS	
LN1590	Adenokarzinom	RPMI1640 + 10% FCS	

## **4. Methoden**

### **4.1 Molekulargenetische Untersuchungen**

Mittels quantitativer RT-PCR (qPCR) wurde die CYP 2C9 Expression in 44 Kryokonservierten Ösophaguskarzinompräparaten, sowie in allen verwendeten Zelllinien analysiert. Dazu wurde zunächst RNA isoliert, diese durch Reverse-Transkriptase in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die Expression des Zielgens im Verhältnis zum Haushaltsgen GAPDH quantifiziert.

#### **4.1.1 Präparation der kryokonservierten Tumorproben**

Mit einem Kryostat-Mikrotom wurden 10µm dicke Schnitte der Tumorproben hergestellt. Zehn dieser Schnitte wurden umgehend in ein Eppendorf Tube überführt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 1 ml TRIzol (Invitrogen, USA) inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert. Um sicherzustellen, dass es sich bei dem gewonnenen Material um Tumorgewebe handelt, wurde ein Schnitt vor sowie ein Schnitt nach einer solchen Zehnerserie mit Hämalaun gefärbt und lichtmikroskopisch begutachtet. Nur bei einem Tumoranteil über 75% wurden die Schnitte für die Expressionsanalyse verwendet.

#### **4.1.2 RNA Isolation**

Mittels TRIzol (Invitrogen, USA) wurden die Zellen zunächst homogenisiert, Proteine denaturiert und RNAsen inaktiviert. Die so homogenisierten Präparate wurden mit 200 µl Chloroform gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 12000 x g wurde die RNA-haltige, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol gemischt. Es folgten 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 12000 x g. Der Überstand wurde verworfen, die durch Isopropanol gefällte RNA mit Ethanol (75%) gewaschen und für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet und je nach Größe in 30-80 µl Nuklease freiem Wasser gelöst. Die Konzentration der aufgereinigten RNA wurde spektralphotometrisch (Bio Photometer Eppendorf) bei den Wellenlängen 260 und 280 nm ( $OD_{260}$  und  $OD_{280}$ ) gemessen. Dabei stellen 260 nm das Extinktionsoptimum von Nukleinsäuren und 280 nm das von Proteinen dar. Der Quotient aus  $OD_{260}/OD_{280}$  diene der Reinheitsbestimmung der isolierten RNA-Lösung. Es wurden ausschließlich Proben mit einem Quotienten größer 1,7 verwendet.

#### **4.1.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)**

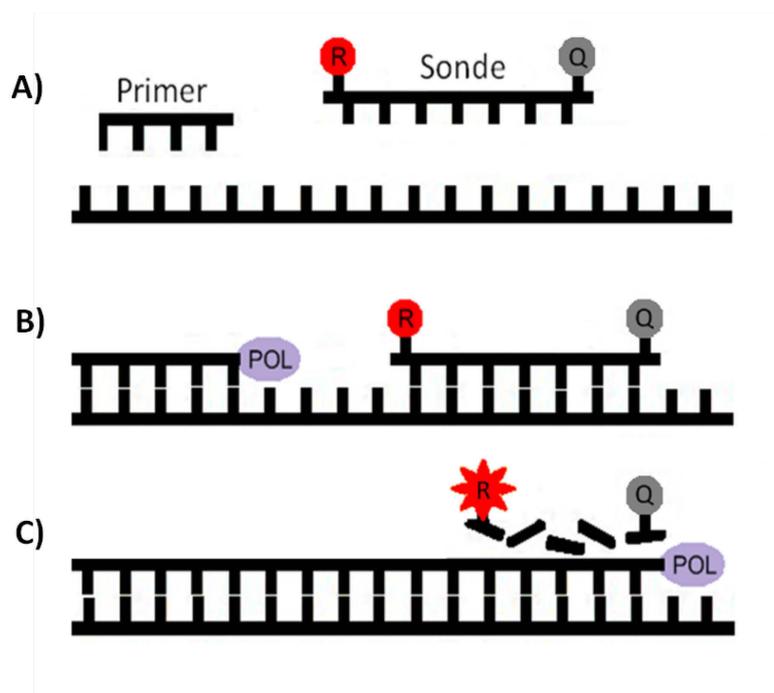
Bei der reversen Transkription wird RNA in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierzu wird das aus Retroviren isolierte Enzym Reverse Transkriptase genutzt. Dieser Schritt ist erforderlich, da die Polymerasekettenreaktion DNA als Ausgangsmaterial benötigt. Die Umschreibung von 2 µg RNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Es wurden 2 µg RNA in 11 µl Nuklease freiem Wasser, 4 µl RT-Puffer (5x), 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 2 µl Oligo dT Primer, 0,5 µl Protector RNase Inhibitor und 0,5 µl Reverse Transkriptase auf Eis zusammenpipettiert. Das Annealing der Primer an die RNA erfolgte bei Raumtemperatur für 10 Minuten. Die Umschreibung der RNA in cDNA mittels Reverser Transkriptase erfolgte bei 55°C für 30 Minuten. Anschließend wurde das Enzym bei 85°C über 10 Minuten inaktiviert.

#### **4.1.4 Grundlagen der Real-Time PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zählt zu den wichtigsten Methoden der modernen Molekularbiologie. Sie dient der Vervielfältigung ausgewählter DNA-Sequenzen. Hierzu werden eine gewisse Menge Ausgangs-DNA, zwei Oligonukleotidprimer, eine thermostabile Polymerase, Desoxyribonukleotide sowie spezielle Salze und Puffer benötigt. Die Reaktion besteht aus drei sich zyklisch wiederholenden Einzelschritten. Zunächst erfolgt das Aufschmelzen des DNA Doppelstranges (1. Denaturierung), gefolgt von der Anlagerung der Primer an die entstandenen Einzelstränge (2. Annealing) und der Verlängerung der Primer durch die DNA Polymerase (3. Elongation).

Bei der Real-Time PCR erfolgt zusätzlich eine Messung des akkumulierenden PCR-Produktes über die Detektion von Fluoreszenzlicht, welches proportional zur Menge des PCR-Produktes erzeugt wird. Bei dem für unsere Analysen verwendeten Detektionssystem handelte es sich um Hydrolysesonden (TaqMan-PCR). Dies sind sequenzspezifische Oligonukleotide, die zwischen den beiden Primern an die Zielsequenz binden und an ihrem 5'-Ende einen fluoreszierenden „Reporter“-Farbstoff tragen. Das 3'-Ende ist mit einem „Quencher“-Farbstoff markiert, welcher durch die räumliche Nähe zum „Reporter“ dessen Fluoreszenz durch das Phänomen des Fluoreszenz-Energietransfers supprimiert. Zusätzlich ist das 3'-Ende der Sonde mit einem Phosphatrest blockiert, um eine Verlängerung des Sondenstranges in der Elongationsphase zu verhindern.

Während der PCR binden Sonde und Primer zunächst an den Matrizenstrang. Im Rahmen des Elongationsprozesses kommt es dann durch die Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase zur hydrolytischen Spaltung der Sonde. Der Reporter wird vom Quencher getrennt und erzeugt bei Anregung ein starkes Fluoreszenzsignal. Die Fluoreszenzintensität wird am Ende jedes Elongationsschrittes gemessen. Dies ermöglicht die Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit („Real-Time“). Freie, nicht hybridisierte Sonden bleiben intakt.



**Abbildung 4.1.4: TaqMan-PCR:** A) Denaturierung der cDNA B) Annealing der Sonde und der Primer an die Zielsequenz C) Durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase (POL) wird die Sonde gespalten, der Reporter (R) wird vom Quencher (Q) getrennt und erzeugt ein Fluoreszenzsignal.

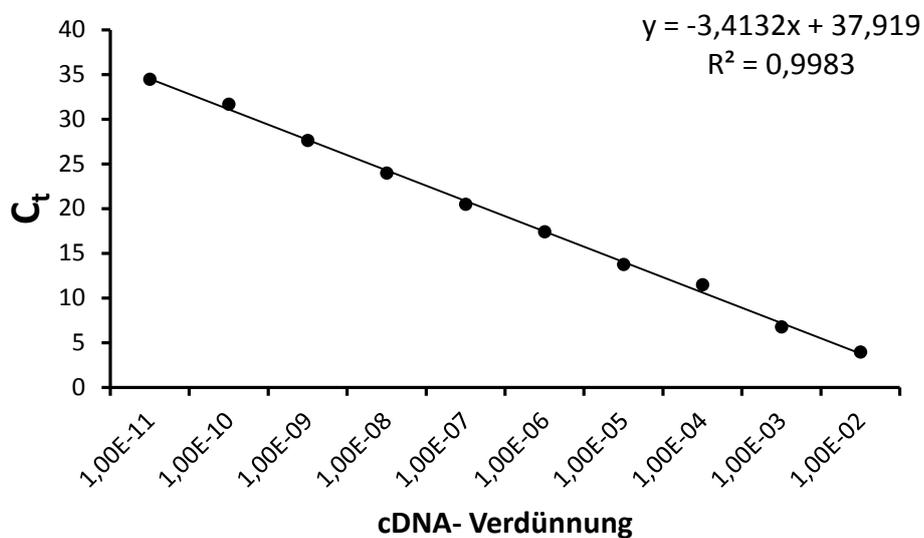
#### 4.1.5 Durchführung der Real-Time PCR

Bestimmt wurde die CYP 2C9 Expression. Als endogene Kontrolle diente das Haushaltsgen GAPDH. Die Durchführung der PCR erfolgte mit einem vollautomatischen Thermo cycler (Dyad Disciple Chromo 4, Bio-Rad, Germany). Je Slot wurden 11,25 µl cDNA (1 ng/µl), oder 11,25 µl H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle, 12,5 µl iQ Supermix (Bio-Rad, Germany) und 1,25 µl Primerkonzentrat (10 µM Forward + 10 µM Reverse + 4 µM Sonde) zusammenpipettiert. Die Denaturierung der cDNA erfolgte bei 95°C für 10 Minuten, gefolgt von 40 PCR-Zyklen. Jeder dieser Zyklen bestand aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 Sekunden sowie Annealing und Elongation bei 60°C für eine Minute. Die niedrige Elongationstemperatur

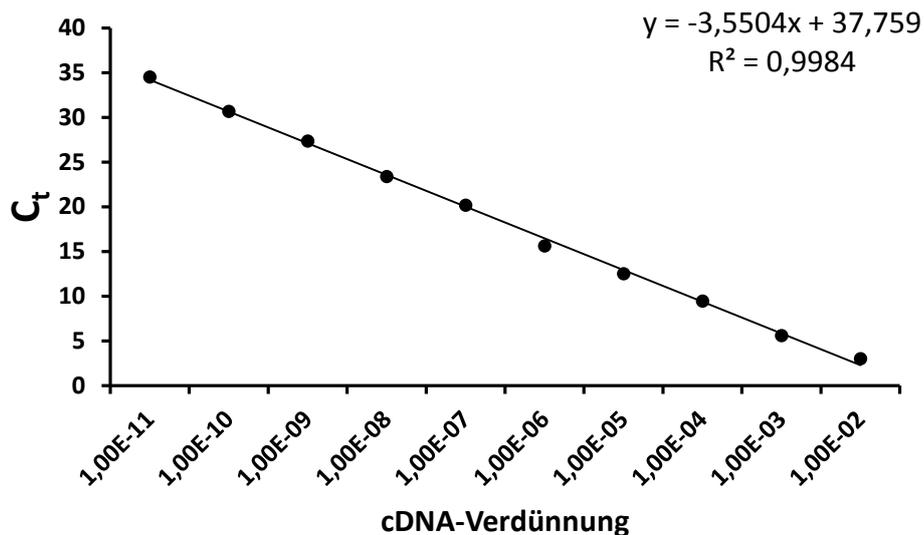
begünstigt die Bindung der Sonde, so dass ihre Hydrolyse effizienter verläuft. Am Ende jedes Elongationsschrittes wurde die Stärke des Fluoreszenzsignals bestimmt. Zunächst wurde für die verwendeten Primerpaare anhand einer logarithmischen Verdünnungsreihe eine Standardkurve mit Korrelationskoeffizient erstellt (Abb.: 4.1.5.1 und Abb.: 4.1.5.2). Anhand der Steigung der Geraden wurde die Effizienz der PCR-Reaktion ermittelt.

**Tabelle 4.1.5: Verwendete Primer**

Primer	Sequenz	
CYP 2C9	5`-CAA CCC TGA GAT ATG CTC TCC-3`	Forward
	5`-CGT TCA ATC TCT TCC TGG AC-3`	Reverse
	FAM-TGA AGC ACC CAG AGG TCA CAG CTA AA-BHQ1	Sonde
GAPDH	5`-CGT GGA AGG ACT CAT GAC CA-3`	Forward
	5`-GCC ATC ACG CCA CAG TTT C-3	Reverse
	FAM-CAG AAG ACT GTG GAT GGC CCC TCC-TAM	Sonde



**Abbildung 4.1.5.1:** Standardkurve für CYP 2C9. Die Standardkurve ergibt sich aus der logarithmischen Auftragung der eingesetzten DNA-Menge gegen den Ct-Wert. Es entsteht eine Gerade der Form:  $C_{(t)} = m \times x + b$ , wobei m die Steigung, x die eingesetzte DNA-Menge und b den y-Achsenabschnitt der Geraden repräsentiert. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  zeigt die lineare Korrelation innerhalb der Standardkurve an.



**Abbildung 4.1.5.2:** Standardkurve für GAPDH. Die Standardkurve ergibt sich aus der logarithmischen Auftragung der eingesetzten DNA-Menge gegen den Ct-Wert. Es entsteht eine Gerade der Form:  $C_{(t)}=m \times x + b$ , wobei m die Steigung, x die eingesetzte DNA-Menge und b den y-Achsenabschnitt der Geraden repräsentiert. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  zeigt die lineare Korrelation innerhalb der Standardkurve an.

#### 4.1.6 Auswertung der Real-Time PCR

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte über die Bestimmung des  $C_t$ -Wertes (threshold cycle), welcher die Zykluszahl angibt, bei der die Reporter-Fluoreszenz erstmals einen bestimmten Schwellenwert übersteigt. Dieser Schwellenwert wird so gewählt, dass er von den Amplifikationskurven am Beginn ihrer exponentiellen Phase geschnitten wird. Je geringer die Ausgangskonzentration der Zielsequenz bei Beginn der PCR ist, umso später wird der Schwellenwert überschritten und umso höher ist der  $C_t$ -Wert. Demzufolge besteht ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen  $C_t$ -Wert und Ausgangskonzentration der Zielsequenz. Bei 100%iger Amplifikationseffizienz führt eine zehnfache Konzentrationsänderung der Zielsequenz zu einer Veränderung des  $C_t$ -Wertes um 3,3 Zyklen. Ein Unterschied von einem Zyklus entspricht einem Unterschied um den Faktor 2 in der Targetkonzentration.

Die ermittelten  $C_t$ -Werte für CYP 2C9 wurden mittels des endogenen Referenzgens GAPDH normiert und in Form von  $\Delta C_t$ -Werten angegeben ( $\Delta C_t = C_t \text{ CYP 2C9} - C_t \text{ GAPDH}$ ). Dadurch kann die unterschiedliche Expression des Zielgens in verschiedenen Geweben quantifiziert werden. Grundvoraussetzung für diese sogenannte relative Quantifizierung ist die gleichmäßige Genexpression des housekeeping-Referenzgenes.

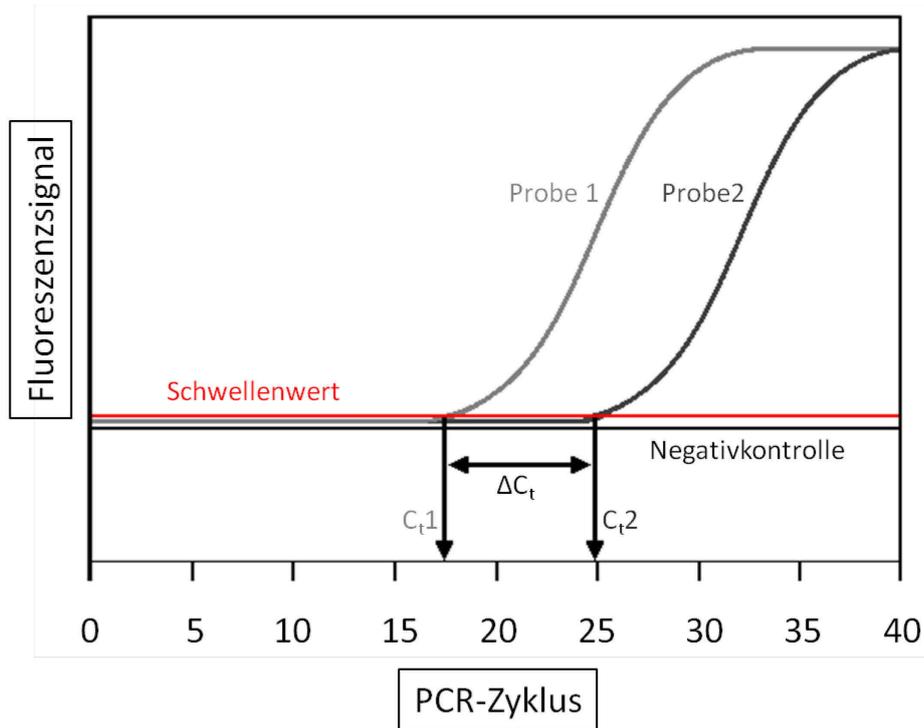


Abbildung 4.1.6: Real-Time PCR Amplifikationsplot

## 4.2 Immunhistochemische Untersuchungen

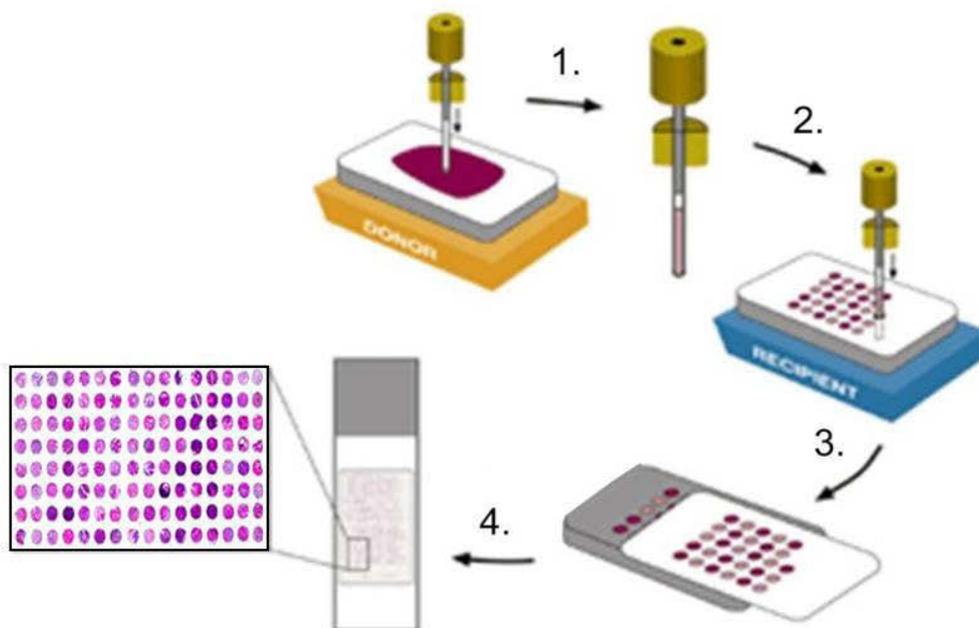
### 4.2.1 Der Tissue Microarray

Um die CYP 2C9 Proteinexpression im Ösophaguskarzinom immunhistochemisch zu analysieren, wurden zunächst TMAs angefertigt. Hierzu wurden insgesamt 120 formalin-fixierte, paraffinisierte Plattenepithelkarzinompräparate, 103 formalin-fixierte, paraffinisierte Adenokarzinompräparate sowie 87 formalin-fixierte, paraffinisierte Normalmukosapräparate des Ösophagus verwendet. Die Normalmukosen wurden aus nicht tumorbefallenen Abschnitten der Ösophagusresektate gewonnen.

Bei der Methode des TMA werden Stanzproben aus Paraffinblöcken verschiedener eingebetteter Gewebeprobe (Donor-Block) entnommen und in einem gewebefreien Paraffinblock (Rezipient-Block) neu angeordnet (Abbildung 4.2.1). Der Ursprungsblock, aus welchem die Stanze entnommen wird, bleibt dabei weitgehend intakt. Die Gewebeerstörung bei der Materialgewinnung wird deutlich verringert [Kallioniemi OP et al 2001]. Ein weiterer Vorteil des TMA ist die Möglichkeit, eine große Anzahl verschiedener Tumorproben auf einem Objektträger unter identischen Versuchsbedingungen untersuchen zu können. Auf diese Weise wird die Durchführung und Auswertung der

Immunhistochemischen Färbungen überschaubarer sowie weniger zeit- und kostenintensiv [Milanes-Yearsley M et al 2002]. Es wird nur ein kleiner Ausschnitt des Tumorsekts untersucht, wobei die Möglichkeit klinisch-pathologische Zusammenhänge festzustellen jedoch nicht signifikant beeinflusst wird [Nocito A et al 2001].

Die in dieser Studie verwendeten TMAs wurden im Rahmen vorangegangener Arbeiten angefertigt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Nina Lindenlauf und Judith Wolters).



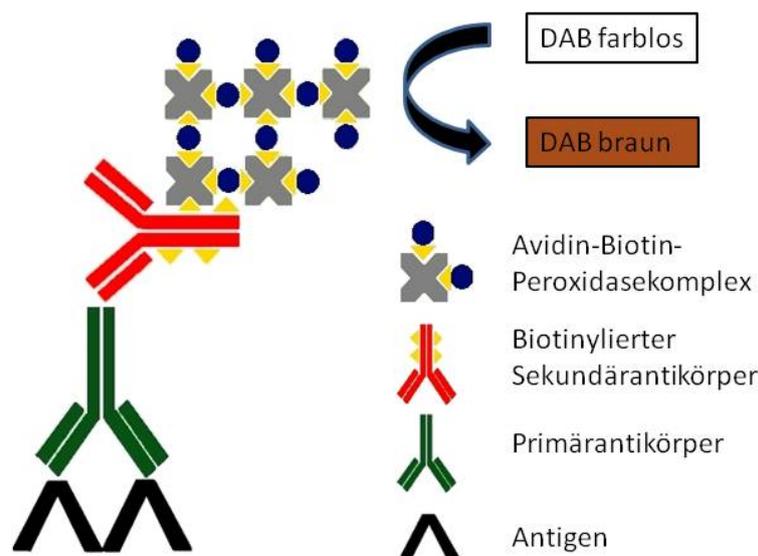
**Abbildung 4.2.1: Herstellung eines Tissue Microarray:** 1. Entnahme der Gewebebiopsie aus dem Donorblock. 2. Transferieren des Gewebezylinders in den Rezipientblock. 3. Schnitt des angefertigten Blocks mittels Mikrotom. 4. Aufziehen des Schnitts auf einen Objektträger. (Quelle: [www.microarraystation.com](http://www.microarraystation.com))

#### 4.2.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren zum Proteinnachweis in Gewebeschnitten. Es beruht auf der Bindung eines Antikörpers an spezifische Epitope eines Proteins. Durch die Kopplung dieses sogenannten Primärantikörpers an verschiedene Detektionssysteme wird dieser im Gewebe sichtbar und zeigt das Vorhandensein des entsprechenden Proteins an.

#### 4.2.3 Das Prinzip der Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC-Methode)

Die angefertigten Tissue Microarrays wurden unter Verwendung der ABC-Methode auf die Expression der Proteine Cyp 2C9 und Ki67 untersucht. Diese Methode basiert auf der hohen Affinität von Avidin für Biotin. Nach Inkubation der Gewebeprobe mit dem Primärantikörper erfolgt die Zugabe von gegen diesen gerichteten, biotinylierten Sekundärantikörpern, die ihrerseits von Avidin-Biotin-Peroxidase Komplexen gebunden werden. Die gebundene Peroxidase katalysiert die Oxidation des im nächsten Schritt zugegebenen Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Die Oxidationsprodukte polymerisieren und bilden einen bräunlichen Farbstoff. Als Gegenfärbung dient Hämalaun. Durch dieses mehrstufige Detektionssystem können auch gering exprimierte Proteine im Gewebe lokalisiert werden.



**Abbildung 4.2.3: Prinzip der ABC-Methode:** Der Primärantikörper bindet an das Antigen. Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. An das Biotin des Sekundärantikörpers bindet der Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von DAB [Dako, Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden].

#### 4.2.4 Die Durchführung der IHC am TMA

Für die immunhistochemische Untersuchung der TMAs auf die Expression von CYP 2C9 wurde der polyklonale (rabbit) CYP 2C9 Antikörper der Firma Abd Serotec in Kombination mit einem aufeinander abgestimmten Kompletprotokoll, dem ABC-Peroxidase-Kit von Vectastain (Vector Laboratories) verwendet. Die immunhistochemische Färbung der Schnitte

mit einem monoklonalen (mouse) Ki67 Antikörper (DAKO) zur Analyse der Ki67 Expression wurde freundlicherweise vom Institut für Pathologie der Universität Düsseldorf durchgeführt. Vor der Durchführung der IHC-Färbung wurden die TMA-Schnitte über Nacht auf 65°C erhitzt und anschließend für 3 x 10 Minuten in Xylol entparaffinisiert. In einer absteigenden Alkoholreihe wurde das Gewebe dann vom Xylol befreit (2 x 99,5% EtOH, 2 x 96% EtOH, 2 x 80 % EtOH, 1 x 70 % EtOH, für je 5 Minuten) und für 5 Minuten in destilliertem Wasser rehydriert. Zur Demaskierung von durch die Formalinfixation veränderten Epitopstrukturen (inter- und intramolekulare Cross-links) wurden die Objektträger bei 95°C für 30 Minuten in Target Retrieval Solution erhitzt. Anschließend kühlten die Schnitte bei Raumtemperatur für 20 Minuten ab und wurden für jeweils 5 Minuten in PBS und destilliertem Wasser gewaschen. Um unspezifische Umsetzung der chromogenen Substratlösung durch endogene Peroxidasen zu vermeiden, wurden diese durch Inkubation in 0,3% Wasserstoffperoxid für 30 Minuten inaktiviert. Anschließend wurden Tissue Microarrays mit einem Fettstift umrandet, um die Ausbreitung von Blocking- und Antikörperlösung über den Geweberand hinaus zu vermeiden. Die Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte durch Inkubation mit Normalserum für 20 Minuten. Nach Abklopfen des Normalserums wurden die Proben für 30 Minuten mit dem Primärantikörper inkubiert. Im Anschluß wurden der biotinylierte Sekundärantikörper und das ABC-Reagenz für jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Vor und zwischen diesen beiden Schritten wurden die Proben zweimalig für 5 Minuten mit PBS gespült. Nach erneutem Waschen mit PBS zur Entfernung nicht gebundener Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe zu entfernen erfolgte dann die Zugabe der frisch angesetzten DAB- (3,3'Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) Chromogen-Lösung. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Proben in Leitungswasser gespült und anschließend mit Hämalaun gegengefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde in fließendem Wasser ausgespült. Zur möglichst vollständigen Entwässerung wurden die Präparate einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% EtOH, 80% EtOH, 99% EtOH) mit abschließender Xylol-Inkubation unterzogen. Abschließend wurde das Gewebe zur Fixierung in Entellan eingedeckt und luftgetrocknet. Die Auswertung der IHC-Färbungen erfolgte lichtmikroskopisch.

#### 4.2.5 Optimierung der IHC für den TMA und Verwendung von Kontrollen

An Einzelgewebeschnitten erfolgte die Optimierung der Antikörperverdünnung, der Antigendemaskierung und der Blockierung unspezifischer Bindungen. Die Reaktionsbedingungen wurden so optimiert, um Überfärbungen oder zu schwache Färbung der Proben zu vermeiden und eine semiquantitative Auswertung zu ermöglichen.

Als Negativkontrollen dienten Gewebeschnitte, welche anstelle des Primärantikörpers mit einer Isotyp-Kontrolle inkubiert wurden. Sie zeigten keine unspezifischen Färbungen. Lebergewebeschnitte, die eine hohe Expression von CYP 2C9 zeigen, wurden als Positivkontrollen verwendet.

#### 4.2.6 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die IHC-Färbungen wurden lichtmikroskopisch (Leica) mit 10- bis 100-facher Vergrößerung analysiert. Für die Bewertung der CYP2C9 Expression kam der semiquantitative Immunoreaktive Score (IRS) zur Anwendung. Bei diesem wird ein Score Wert von 0-12 Punkten gebildet, indem die maximale Färbungsintensität mit dem Prozentsatz positiver Zellen multipliziert ( $IRS = FI \times PP$ ) wird [Remmele W, Stegner HE 1987, Remmele W, Schicketanz KH 1993].

**Tabelle 4.2.6: Immunoreactive Score (Remmele Score)**

<b>Färbeintensität</b>	<b>Prozentsatz positiver Zellen</b>
keine = 0	keine Färbung = 0
schwach = 1	≤10% = 1
mäßig = 2	11-50% = 2
stark = 3	51-80% = 3
	> 80% = 4

Bei den Ki67 gefärbten Präparaten wurde ausschließlich die Anzahl der positiv gefärbten Zellkerne in Prozent bestimmt (Ki67-LI). Da nicht von allen Tumorproben bzw. Normalmukosen für eine Bewertung ausreichende Gewebemengen vorlagen, konnten nur 105 (88%) der 120 Plattenepithelkarzinompräparate, 78 (76%) der 103 Adenokarzinompräparate und 79 (90%) der 87 Normalmukosapräparate in die Untersuchung eingeschlossen werden. In der Mehrzahl der analysierten Karzinompräparate lagen zwei Gewebestanden aus unterschiedlichen Tumorarealen vor, so dass der jeweilige Mittelwert

aus den IRS bzw. Ki67-LI der beiden Stenzen für die statistische Analyse verwendet wurde. Alle Schnitte wurden von zwei Untersuchern (Dr.med. Moritz Schmelzle, Levent Dizdar) doppel-blind ausgewertet.

### **4.3 Zellkultur**

Für die Untersuchungen wurden adhärent wachsende Platten- und Adenokarzinomzelllinien des Ösophagus verwendet (Tabelle 2.1). Diese wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) in 12 ml RPMI-Medium (+10% FCS) ausgesät. Die Kultivierung im Brutschrank erfolgte in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 37°C. Bei 80%iger Konfluenz des Zellrasens (in der Regel nach drei Tagen) erfolgte die Subkultivierung der Zellen. Hierzu wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit 1x DPBS gewaschen und anschließend mit Trypsin 0,05% + 0,02% EDTA (Gibco) inkubiert. Bei nahezu vollständiger Loslösung der Zellen vom Flaschenboden erfolgte die Inaktivierung des Trypsins durch die Zugabe von Serumhaltigem RPMI-Medium und eine 5 minütige Zentrifugation bei 1500 rpm. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen entweder der weiteren Verarbeitung zugeführt oder nach Verdünnung in frischem Medium (1:3 – 1:15 je nach Zelllinie) erneut kultiviert. Alle Arbeiten an der Zellkultur erfolgten unter einer Laminar- flow- Box.

#### **4.3.1 CYP2C9 Expressionsanalyse in Karzinomzelllinien**

Die Tumorzelllinien wurden nach Entfernung des Mediums zweimalig in 1x DPBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflaschen gelöst und in 10 ml 1x DPBS in einen Falcon Tube überführt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1500 rpm wurde das Zellpellet in 1 ml TRIzol bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert. Die folgenden Schritte erfolgten analog zur CYP 2C9 Expressionsanalyse aus Kryokonservierten Patientenproben.

#### **4.3.2 Nachweis von CYP 2C9 bei den Zelllinien K30 und PT1590 mittels Immunfluoreszenz**

Es wurden jeweils 1 x 10<sup>5</sup> Tumorzellen der Zelllinien KYSE-30 und PT1590 in 1 ml RPMI Medium (+10% FCS) auf chamber slides (Nunc GmbH, Roskilde, Dänemark) ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Bei 60-prozentiger Zellkonfluenz wurde das Medium entfernt, die Zellen mit Methanol fixiert und anschließend Luftgetrocknet. Um die Markierung des intrazellulär lokalisierten CYP 2C9 zu ermöglichen, erfolgte die Permeabilisierung der

Zellmembranen durch 5 minütige Inkubation mit 0,5% Triton x-100 in 1 x PBS. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für je 5 Minuten in 1 x PBS gewaschen und danach für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 20% AB-Serum blockiert. Im Anschluß erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (CYP 2C9 in 10% AB-Serum) oder der Isotypkontrolle (X0903 in 10% AB-Serum) für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Hierauf wurden die Objektträger dreimal für je 3 Minuten in 1 x PBS gewaschen und dann für 30 Minuten mit einem Cy3 markierten Sekundärantikörper (Anti-Rabbit-Cy3 in 10% AB-Serum) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,2% Tween 20 in 1 x PBS wurde die Zelluläre DNA mit 1mg/ml DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol – Dihydrochlorid) gefärbt. Zuletzt wurden die Objektträger mit 1% PFA in 1 x PBS fixiert und in Vectashield eingedeckelt. Die Auswertung der immuncytochemischen Färbung erfolgte mit Hilfe eines digitalen Farbkamerasystems für Fluoreszenzmikroskopie (Leica DFC 300 FX).

#### **4.4 Der MTT-Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid)**

Dieser von Mosmann entwickelte Test [Mosmann et al., 1983] misst die Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenasen lebender Zellen [Hansen et al., 1989; Berg K et al., 1990]. Eine Hemmung der Aktivität dieses Enzyms durch eine Testsubstanz gilt als direktes Maß für akut toxische Wirkungen [Bohrenfreund E et al., 1988; Husøy et al., 1993] und wird einem Vitalitätsverlust gleichgesetzt. Das schwach gelbe MTT dringt nach Zugabe zum Medium in die Zellen ein. Dort wird sein Tetrazoliumring durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen, und es entsteht das dunkelblaue, alkohollösliche Salz Formazan. Um dieses freizusetzen und zu lösen, werden die Zellen mit einer Mischung aus SDS (Sodium-Dodecylsulfat), DMSO (Dimethylsulfoxid) und Essigsäure lysiert. Die Farbintensität der Formazanlösung wird photometrisch bestimmt. Die gemessenen Extinktionswerte verhalten sich proportional zu dem in den Zellen gespaltenen MTT und stellen somit ein Maß für die Vitalität der untersuchten Zellen dar.

##### **4.4.1 Durchführung des MTT-Assay**

Je nach Zelllinie wurden zwischen  $2 \times 10^3$  bis  $4 \times 10^4$  Tumorzellen in 96 well Platten in 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Nach Zugabe der Testsubstanzen erfolgte die Inkubation im Brutschrank für 24h. An Testsubstanzen verwendet wurden Sulfaphenazol (selektiver CYP 2C9 Inhibitor) und 11(12) Epoxieicosatriensäure (Produkt von CYP 2C9). Bei allen Versuchsansätzen wurde

als Kontrolle eine Probe mit der verwendeten Lösungsmittelkonzentration der entsprechenden Testsubstanz mitgeführt.

Im Anschluss an die 24 stündige Inkubation mit der Testsubstanz erfolgte die Zugabe von 40 µl MMT-Reagenz in das Medium der subkonfluent gewachsenen Tumorzellen. Nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Medium entfernt und 100 µl einer Mischung aus DMSO, Essigsäure (6‰) und SDS (100mg/ml) zugegeben. Die Mikrotiterplatten wurden auf einem Schüttler gemischt und anschließend in einem ELISA-Reader bei einer Testwellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen.

#### **4.4.2 Auswertung des MTT-Assay**

Zunächst wurden die Blindwerte von allen Messwerten subtrahiert und aus den analysierten Proben die jeweiligen Mittelwerte gebildet. Zur Bestimmung des Einflusses der Testsubstanz auf die Proliferation der Tumorzellen wurden die Messwerte der unbehandelten Kontrollen gleich 100% gesetzt. Die Vitalität der mit Testsubstanzen behandelten Proben wurde dann folgendermaßen ermittelt:

$$\text{Proliferation \% Kontrolle} = \left( \frac{\text{Mittelwert Testsubstanz}}{\text{Mittelwert Kontrolle}} - 1 \right) * 100$$

### **4.5 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse**

#### **4.5.1 Durchflusszytometrie (FACS)**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es Zellen, anhand ihrer Größe, ihrer Granularität, bestimmter Oberflächenmoleküle oder intrazellulärer Proteine zu charakterisieren und quantifizieren. Durch hydrodynamischen Druck werden einzelne Zellen in eine Messkanüle gepresst, in der sie einen oder mehrere Laserstrahlen definierter Wellenlängen passieren. Die Intensität des vorwärts (0,5-2°) und seitwärts (90°) gestreuten Lichtes wird detektiert und erlaubt Rückschlüsse auf Größe (Forward Scatter) und Granularität (Side Scatter) der Zelle. Zusätzlich können die Zellen durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern bezüglich ihrer Oberflächenmoleküle oder intrazellulärer Proteine untersucht werden. Durch einen Laserstrahl wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt und emittiert Licht einer charakteristischen Wellenlänge, welches wiederum von einem Detektor erkannt wird.

#### **4.5.2 BrdU und 7-AAD Markierung**

Bei Bromodeoxyuridin (BrdU) handelt es sich um ein Thymidinanalogon. Nach Zugabe dieser Substanz in das Nährmedium proliferierender Zellen wird es im Rahmen der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA eingebaut. Anschließend werden die in die DNA eingebauten BrdU-Moleküle mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper markiert. Zusätzlich wird die gesamte DNA mit 7-Aminoactinomycin (7-AAD) angefärbt. Durch die Messung dieser beiden Signale im Durchflusszytometer können Aussagen über die Verteilung der Zellen im Zellzyklus getroffen werden.

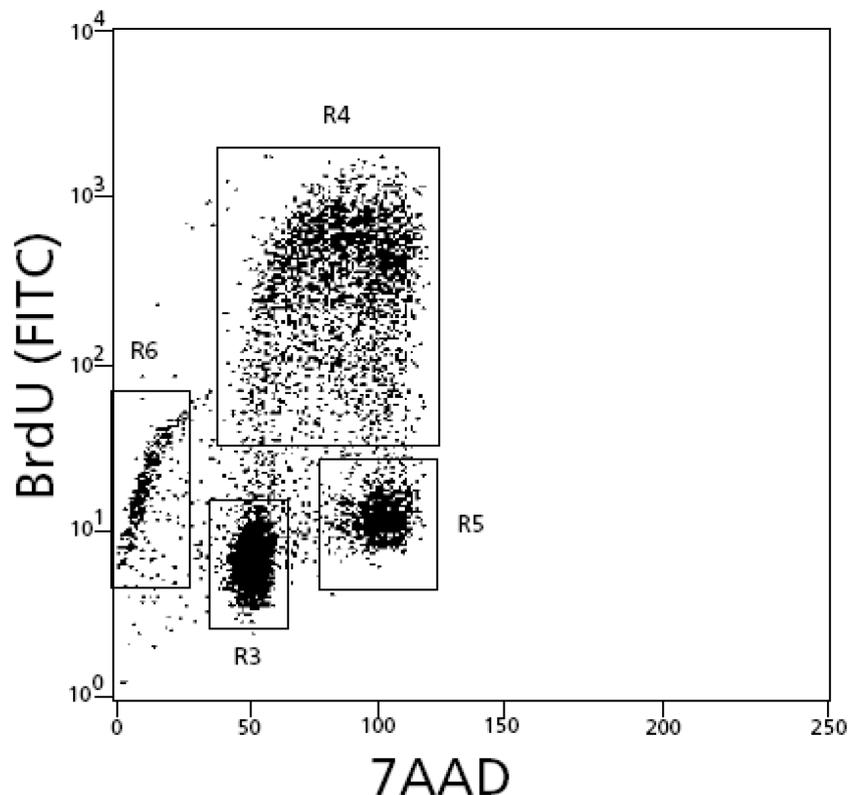
#### **4.5.3 Durchführung**

Der Einfluss von Sulphafenazol auf die Proliferation von Ösophaguskarzinomzellen wurde unter Verwendung des FITC BrdU Flow Kits von BD Pharmingen analysiert. Es wurden  $5 \times 10^5$  Tumorzellen in 2 ml RPMI-Medium + 10% FCS in 6-Well-Kulturplatten ausgesät und für unterschiedlich lange Zeitintervalle mit der Testsubstanz bzw. dem Lösungsmittel als Negativkontrolle inkubiert. 30 Minuten vor der Zellernte wurden dem Medium 20µL einer 1mM BrdU-Lösung zugegeben, die Zellen anschließend mittels Zellschaber vom Boden gelöst, in FACS-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde das Pellet in 1 mL Staining Buffer gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Resuspension in 100µL Cytofix/Cytoperm Buffer für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zwischen jedem der folgenden Schritte wurde den Zellen 1 mL Staining Buffer hinzugegeben und für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Nacheinander wurden die Zellen auf Eis für 10 Minuten in 100µL Cytoperm/Plus Buffer, für 5 Minuten in 100µL Cytofix/Cytoperm Buffer, bei 37°C in 100µL DNase und bei Raumtemperatur im Dunklen für 20 Minuten mit 51µL Anti-BrdU-Antikörper (1µL/50µL Perm/Wash Buffer) inkubiert. Abschließend wurde das Zellpellet in 7-AAD (20µL/ml Staining Buffer) resuspendiert.

#### **4.5.4 Analyse und Auswertung**

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mit dem BD FACSCalibur. Dieses Gerät verfügt über einen 488nm Argonlaser, der in der Lage ist, die Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein Isothiocyanate (FITC) und 7-AAD anzuregen. Die grüne Fluoreszenz des FITC wird über einen 530/30nm-Bandenfilter gesammelt und logarithmisch auf die Ordinate abgebildet, wohingegen die rote Fluoreszenz des 7-AAD mit einem 630/30nm-Bandenfilter gesammelt

und linear auf die Abszisse aufgetragen wird. Die sich abbildenden Zellpopulationen repräsentieren unterschiedliche Phasen des Zellzyklus (G0/G1-Phase, S-Phase, G2/M-Phase). Sie werden umrandet und als prozentuale Anteile angegeben.



**Abbildung 4.5.4:** Punktwolkendiagramm einer FACS-Zellzyklusanalyse; **R3:** G0/G1-Phase, **R4:** S-Phase, **R5:** G2/M-Phase, **R6:** Apoptotische Zellen (Quelle: [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com))

#### 4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm SPSS 15.0 für Windows.

##### 4.6.1 Mann-Whitney-U-Test

Der Mann-Whitney-U-Test ist ein parameterfreier Signifikanztest. Er dient zur Überprüfung, ob zwei unabhängige Stichproben aus derselben Grundgesamtheit stammen. Voraussetzung für die Anwendung dieses Tests ist ein mindestens ordinales Skalenniveau sowie eine stetige Verteilung der Zielgröße. Wir verwendeten den U-Test zur Untersuchung von CYP2C9 IRS - und  $\Delta C_t$  – Mittelwerten auf Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern (T, N, M, Grading, Alter, Geschlecht). Des weiteren wurden die nach CYP2C9 Inhibition gemessenen

Werte im MTT und BrdU-FACS mit den zugehörigen Kontrollwerten korreliert. Als Signifikanzschwelle wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p < 0,05$ ) gewählt. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;) )

#### 4.6.2 Spearman's Rho Test

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ist ein Maß für die Stärke des monotonen Zusammenhangs zwischen zwei unabhängigen mindestens ordinal skalierten Größen. Ein positiver Zusammenhang liegt bei einem Korrelationskoeffizienten ( $r_s$ ) größer Null, ein negativer Zusammenhang bei einem  $r_s$  kleiner Null vor. Der Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen, wobei der Zusammenhang umso schwächer ist, je näher  $r_s$  bei 0 liegt:

- 0,0  $\leq r_s \leq 0,2$  → kein bis geringer Zusammenhang
- 0,2  $< r_s \leq 0,5$  → schwacher bis mäßiger Zusammenhang
- 0,5  $< r_s \leq 0,8$  → deutlicher Zusammenhang
- 0,8  $< r_s \leq 1,0$  → hoher bis perfekter Zusammenhang

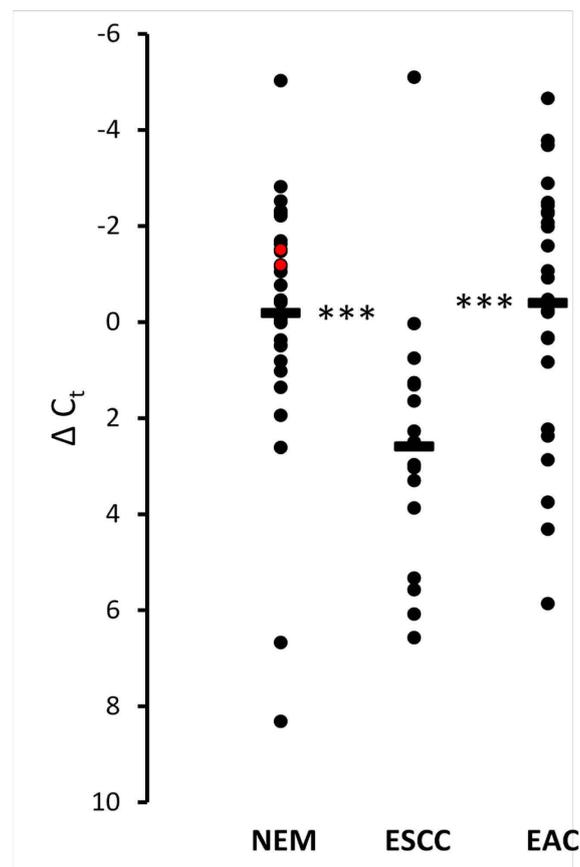
Wir verwendeten den Spearman's Rho Test zur Untersuchung der CYP2C9 Expression auf eine Korrelation mit der Expression des Proliferationsmarker Ki67. Als Signifikanzschwelle wurde erneut eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p < 0,05$ ) gewählt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 RT-PCR Analyse der CYP 2C9 Genexpression

#### 5.1.1 CYP 2C9 Genexpression in Tumorproben und Normalmukosa

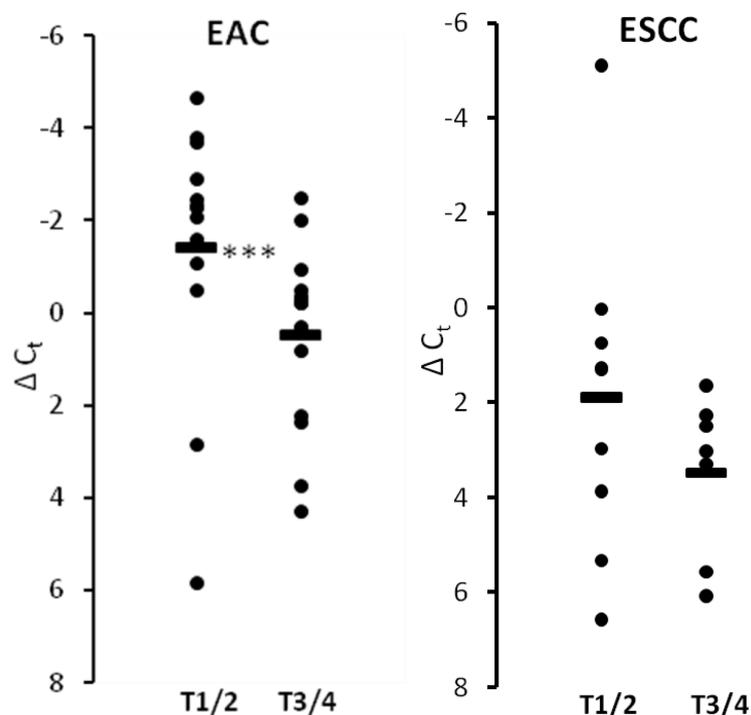
Alle 30 untersuchten Normalmukosen (NEM) (100%) des Ösophagus, sowie alle 16 untersuchten Plattenepithelkarzinome (ESCC) (100%) und 28 der 30 untersuchten Adenokarzinome (EAC) (93%) des Ösophagus zeigten eine CYP2C9 Expression auf mRNA-Ebene. Die relative mRNA-Expression ( $\Delta C_t$ -Werte) war sehr variabel. Das mittlere Expressionsniveau der Normalmukosen lag bei -0,19 [range -5,03 – 8,31], das der Plattenepithelkarzinome bei 2,59 [range -5,10 – 6,57] und das der Adenokarzinome bei -0,40 [range -4,66 – 5,86]. Der statistische Vergleich der drei Gewebetypen zeigte einen signifikanten Unterschied der CYP 2C9 Expression zwischen Normalmukosa und Plattenepithelkarzinom ( $\Delta C_t$  - NEM vs.  $\Delta C_t$  - ESCC,  $p = 0,000$ ), sowie zwischen Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom ( $\Delta C_t$  - ESCC vs.  $\Delta C_t$  - EAC,  $p = 0,001$ ) des Ösophagus.



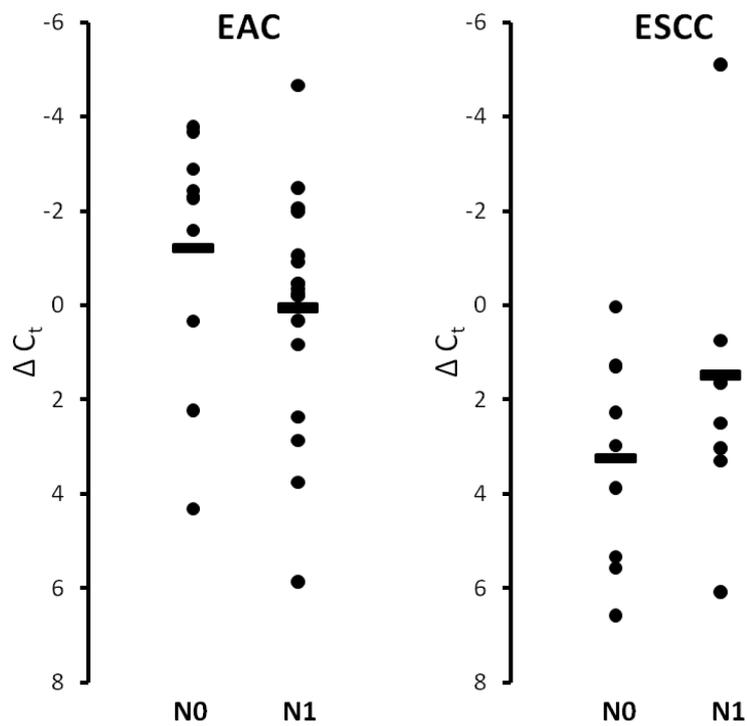
**Abbildung 5.1.1:** Relative CYP 2C9 Expression in Normalmukosa (NEM), Plattenepithelkarzinom (ESCC) und Adenokarzinom (EAC) des Ösophagus. Der entsprechende Mittelwert ist als roter Balken dargestellt.

### 5.1.2 Korrelation der CYP 2C9 Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

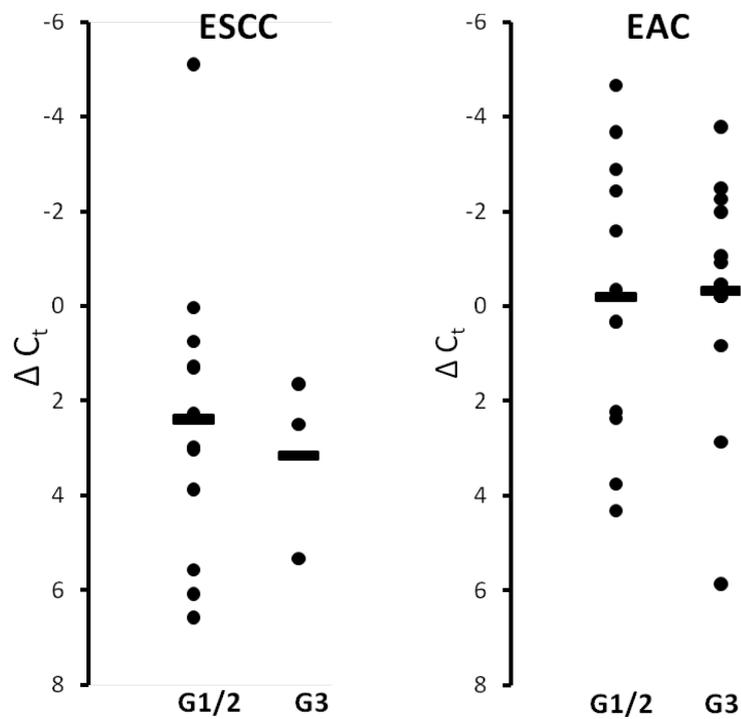
Die relativen CYP 2C9 Expressionslevel der Tumorproben wurden auf Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern untersucht. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Korrelation der CYP 2C9 Expression im EAC zu den Tumorstadien pT1/2 und pT3/4. Tumore der Stadien pT1/2 zeigten eine stärkere CYP 2C9 Expression als solche im Stadium pT3/4 (EAC: Mittelwert: **pT1/2** = -1,42 vs. **pT3/4** = 0,48;  $p = 0,006$ ). Im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (ESCC) ergab sich kein signifikanter Unterschied für das pT-Stadium (ESCC: Mittelwert: **pT1/2** = 1,89 vs. **pT3/4** = 3,48;  $p = 0,252$ ). Die Korrelation des pN-Stadiums mit der CYP 2C9 Expression ergab weder für das EAC, noch für das ESCC einen signifikanten Unterschied (EAC: Mittelwert: **pN0** = -1,12 vs. **pN1** = 0,06;  $p = 0,151$ ; ESCC: Mittelwert: **pN0** = 3,24 vs. **pN1** = 1,74;  $p = 0,606$ ). Auch bei der Korrelationsanalyse für das histologische Grading fanden sich keine signifikanten Unterschiede (EAC: Mittelwerte: **G2** = -0,19 vs. **G3** = -0,33;  $p = 0,801$ ; ESCC: Mittelwerte: **G1/2** = 2,38 vs. **G3** = 3,16;  $p = 0,840$ ). Die Korrelation des Patientenalters oder Geschlechts mit der CYP 2C9 Expression zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 5.1.2.1:** Korrelation der relativen CYP 2C9 Expression im EAC und ESCC mit dem pathologischen Tumorstadium. Der entsprechende Mittelwert ist als Balken dargestellt.



**Abbildung 5.1.2.2:** Korrelation der relativen CYP 2C9 Expression im EAC und ESCC mit dem Lymphknotenstadium. Der entsprechende Mittelwert ist als Balken dargestellt.



**Abbildung 5.1.2.3:** Korrelation der relativen CYP 2C9 Expression im EAC und ESCC mit dem histologischen Tumorgrading. Der entsprechende Mittelwert ist als Balken dargestellt.

**Tabelle 5.1.2:** Korrelation der CYP 2C9 Genexpression ( $\Delta C_t$ ) mit klinisch-pathologischen Parametern von Patienten, bei denen eine R0 en bloc Ösophagektomie durchgeführt wurde (Mann-Whitney-U-Test).

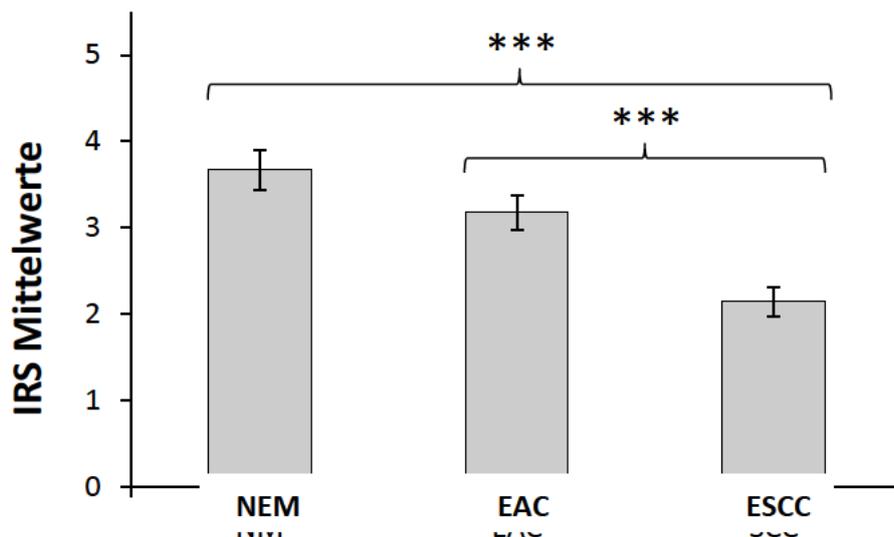
Merkmal	EAC			ESCC		
	Patienten	$\Delta C_t$ -Mittelwert	p	Patienten	$\Delta C_t$ -Mittelwert	p
<b>Patienten</b>	28 (93%)	-0,399		16 (100%)	2,504	
<b>Alter</b>						
Gesamt	28 (93%)	-0,399		16 (100%)	2,504	
≤ 69/66	15	-1,263		8 (50%)	1,821	
> 69/66	13	0,598	0,065	8 (50%)	3,187	0,645
<b>Geschlecht</b>						
Gesamt	28 (93%)	-0,399		16 (100%)	2,504	
Weiblich	6	0,01		7 (44%)	2,45	
Männlich	22	-0,511	0,849	9 (56%)	2,546	0,758
<b>T-Stadium</b>						
Gesamt	28 (93%)	-0,399		16 (100%)	2,504	
T1/2	13	-1,42		9 (56%)	1,742	
T3/4	15	0,485	<b>0,006</b>	7 (44%)	3,484	0,252
<b>N-Stadium</b>						
Gesamt	28 (93%)	-0,399		16 (100%)	2,504	
N0	10	-1,205		9 (56%)	3,096	
N1	18	0,048	0,121	7 (44%)	1,743	0,681
<b>M-Stadium</b>						
Gesamt	27	-0,574		16 (100%)	2,504	
M0	23	-0,517		16 (100%)	2,504	
M1	4	0,145	0,622	0 (0%)		
<b>Grading</b>						
Gesamt	26	-0,262		16 (100%)	2,504	
G1/2	13	-0,194		13 (81%)	2,353	
G3/4	13	-0,33	0,801	3 (9%)	3,157	0,9

## 5.2 Immunhistochemische Analyse der CYP 2C9 Proteinexpression

### 5.2.1 CYP 2C9 Proteinexpression in Tumorproben und Normalmukosa

Für die immunhistochemische Bewertung der CYP 2C9 Expressionsstärke in den untersuchten Präparaten wurde der semiquantitative Immunoreaktive Score (IRS) verwendet. Die ösophageale Normalmukosa zeigte in 73 der 76 Gewebeproben (96%) eine Expression von CYP 2C9, der Mittelwert des IRS lag bei 3,67 [range 0 – 8]. In 69 der 78 (88%) Adenokarzinompräparaten konnte CYP 2C9 nachgewiesen werden. Die Untersuchung der

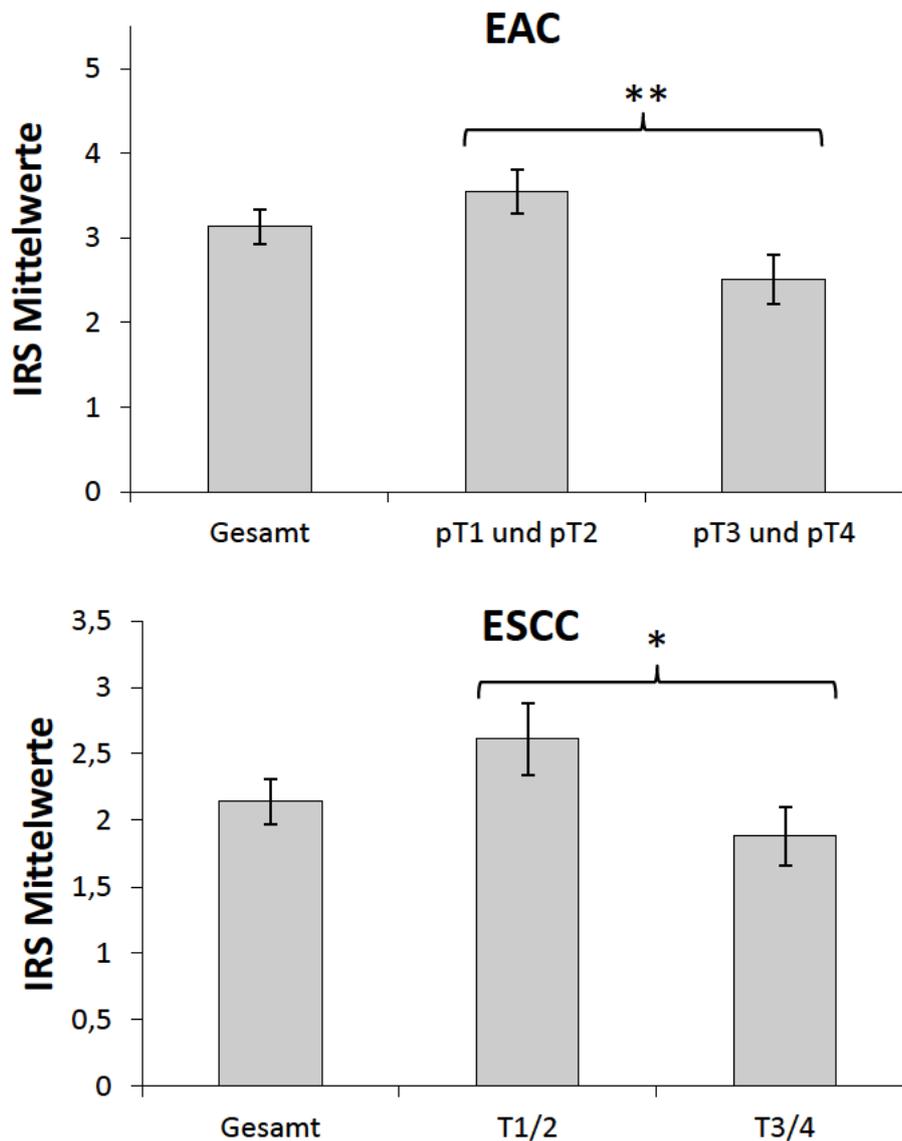
Plattenepithelkarzinome ergab in 79 der 105 (75%) untersuchten Tumorproben einen Nachweis des Proteins. Der Mittelwert des CYP 2C9-IRS betrug im EAC 3,18 [range 0 – 8], im ESCC 2,14 [range 0 – 8]. Im statistischen Vergleich ergab sich ein signifikanter Unterschied der CYP 2C9 Expression zwischen Normalmukosa und ESCC [ $p < 0,001$ ], sowie zwischen EAC und ESCC [ $p < 0,001$ ]. Normalmukosa und EAC unterschieden sich nicht signifikant in ihrer CYP 2C9 Expression.



**Abbildung 5.2.1:** CYP 2C9 Expression in Normalmukosa (NEM), Adenokarzinom (EAC) und Plattenepithelkarzinom (ESCC) des Ösophagus. Dargestellt sind IRS-Mittelwerte der verschiedenen Gewebe mit jeweiligem Standardfehler des Mittelwertes.

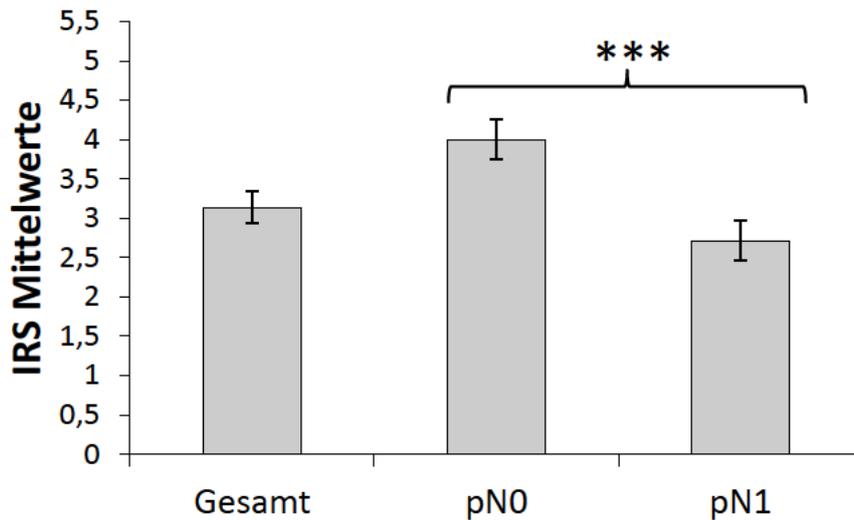
### 5.2.2 Korrelation des CYP 2C9 IRS mit klinisch-pathologischen Parametern

Die immunhistochemische Analyse der CYP 2C9 Expression im Ösophaguskarzinom ergab unterschiedliche Expressionsmuster in Korrelation mit mehreren klinisch-pathologischen Parametern. So ergab sich sowohl im EAC, als auch im ESCC ein signifikanter Unterschied für die Korrelation des CYP 2C9 – IRS mit dem pT-Stadium. Korrespondierend zu der PCR-Analyse zeigten sich höhere Expressionslevel in Tumoren der Stadien pT1/2 im Vergleich zu pT3/4 (EAC: Mittelwert: pT1/2 = 3,54 vs. pT3/4 = 2,52;  $p = 0,009$ ; ESCC: Mittelwert: pT1/2 = 2,61 vs. pT3/4 = 1,88;  $p = 0,043$ ) [Abbildung 5.2.2.1].



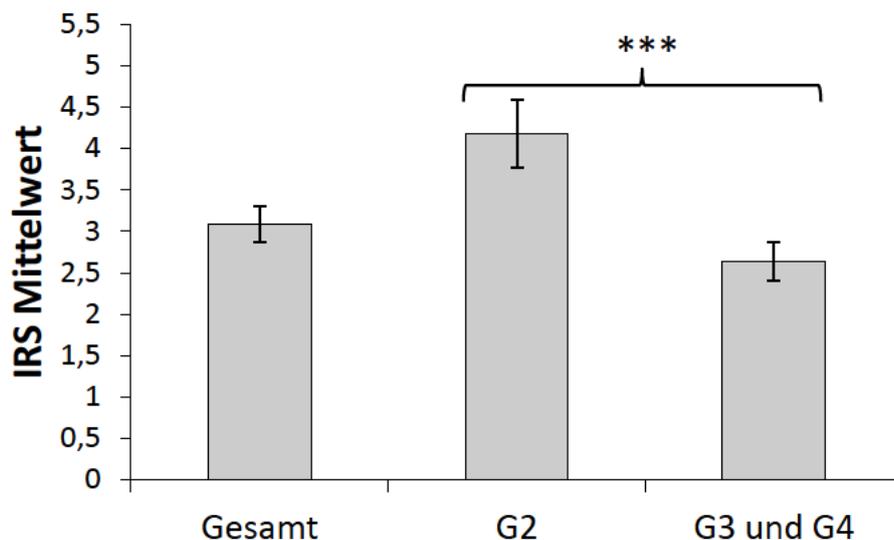
**Abbildung 5.2.2.1:** Korrelation der CYP 2C9 Expression mit dem pT-Stadium. Dargestellt sind IRS-Mittelwerte der unterschiedlichen Tumorstadien mit zugehörigem Standardfehler des Mittelwertes.

Des weiteren ergab sich im EAC ein signifikanter Unterschied zwischen der CYP 2C9 Expression und der Metastasierung in regionäre Lymphknoten. Tumore der pN0-Kategorie zeigten eine signifikant höhere CYP 2C9 Expression im Vergleich zur Gruppe der Patienten mit Lymphknotenmetastasen (EAC: Mittelwert: pN0 = 4,00 pN1 = 2,72,  $p = 0,001$ ) [Abbildung 3.2.2.2]. Im ESCC dagegen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (ESCC: Mittelwert: Gesamt = 2,14, pN0 = 2,04, pN1 = 2,2).



**Abbildung 5.2.2.2:** Korrelation der CYP 2C9 Expression mit dem pN-Stadium. Dargestellt sind IRS-Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler des Mittelwertes.

In den untersuchten EAC-Präparaten, nicht jedoch in den ESCC-Präparaten, konnte weiterhin eine signifikante Korrelation zwischen der histologischen Differenzierung und der CYP 2C9 Expression festgestellt werden. Eine gute bis mäßige Zelldifferenzierung ging mit einer erhöhten CYP 2C9 Expression einher (EAC: Mittelwerte: G2 = 4,175 vs. G3/G4 = 2,6429,  $p = 0,001$ ; ESCC: Mittelwerte: G1/2 = 2,28, G3 = 1,96). Weitere Parameter, wie das Vorhandensein von Fernmetastasen, Alter oder Geschlecht zeigten keine signifikante Korrelation mit der CYP 2C9 Expression.



**Abbildung 5.2.2.3:** Korrelation der CYP 2C9 Expression mit dem histologischen Grading. Dargestellt sind IRS-Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler des Mittelwertes.

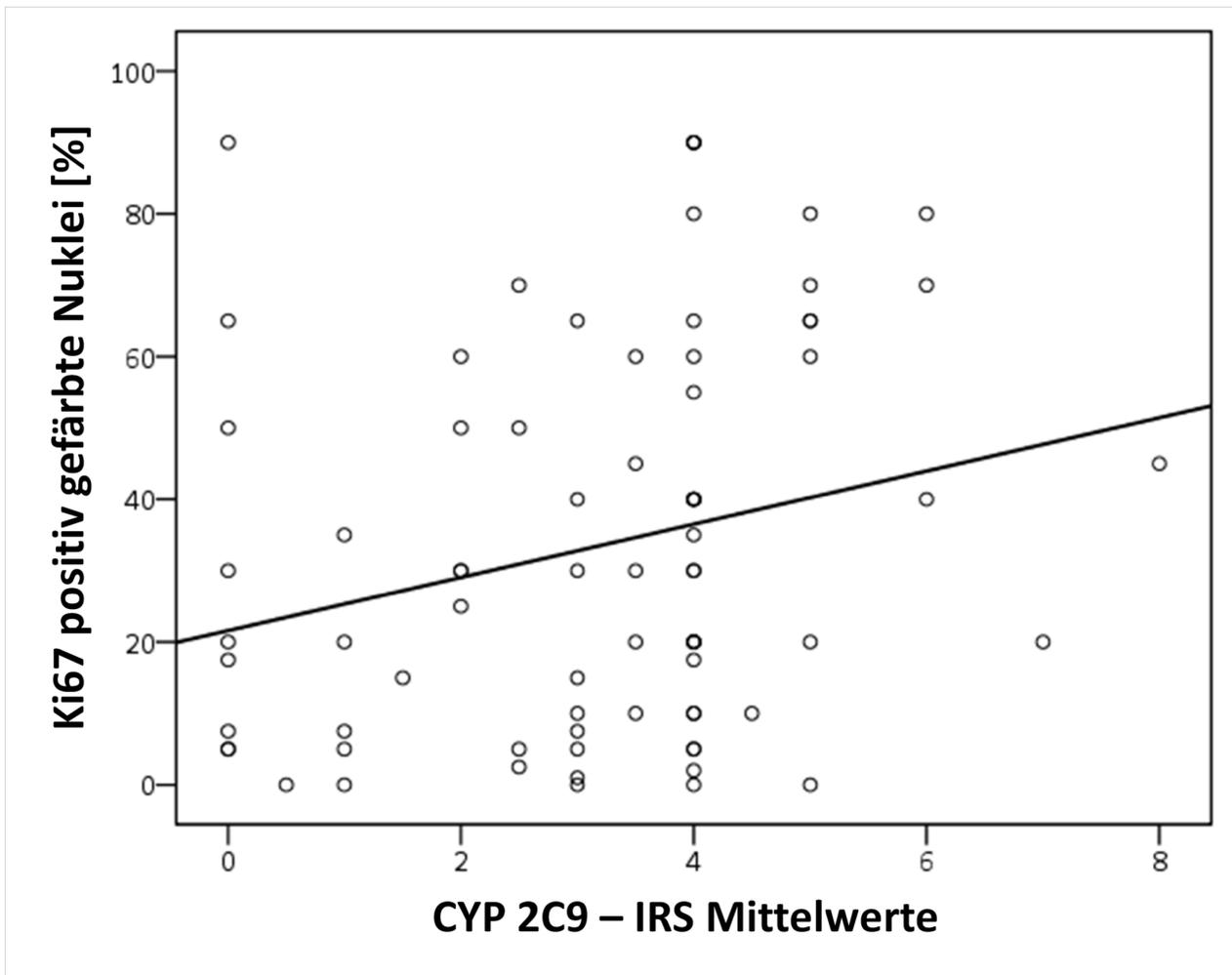
**Tabelle 5.2.2:** Korrelation der CYP 2C9 Proteinexpression (IRS) mit klinisch-pathologischen Parametern von Patienten bei denen eine R0 en bloc Ösophagektomie durchgeführt wurde (Mann-Whitney-U-Test).

Merkmal	EAC			ESCC		
	Patienten	IRS-Mittelwert	p	Patienten	IRS-Mittelwert	p
<b>Patienten</b>	78 (100%)	3,18		105 (100%)	2,14	
<b>Alter</b>						
Gesamt	78 (100%)	3,18		104 (99%)	2,16	
≤ 65/58	41 (53%)	3,26		52 (50%)	2,52	
> 65/58	37 (47%)	3,19	0,732	52 (50%)	1,81	0,051
<b>Geschlecht</b>						
Gesamt	78 (100%)	3,18		105 (100%)	2,14	
weiblich	15 (19%)	3,6		27 (26%)	2,2	
männlich	63 (81%)	3,08	0,297	78 (74%)	2,12	0,596
<b>T-Stadium</b>						
Gesamt	76 (97%)	3,14		105 (100%)	2,14	
T1/2	46 (59%)	3,54		38 (36%)	2,61	
T3/4	30 (38%)	2,52	<b>0,009</b>	67 (64%)	1,88	<b>0,043</b>
<b>N-Stadium</b>						
Gesamt	76 (97%)	3,14		105 (100%)	2,14	
N0	25 (32%)	4		37 (35%)	2,04	
N1	51 (65%)	2,72	<b>0,001</b>	68 (65%)	2,2	0,921
<b>M-Stadium</b>						
Gesamt	76 (97%)	3,14		104 (99%)	2,13	
M0	67 (85%)	3,23		102 (97%)	3	
M1	9 (12%)	2,44	0,197	2 (2%)	2,14	0,432
<b>Grading</b>						
Gesamt	69 (89%)	3,09		105 (100%)	2,14	
G1/2	20 (26%)	4,18		60 (57%)	2,28	
G3/4	49 (63%)	2,64	<b>0,001</b>	45 (43%)	1,96	0,512

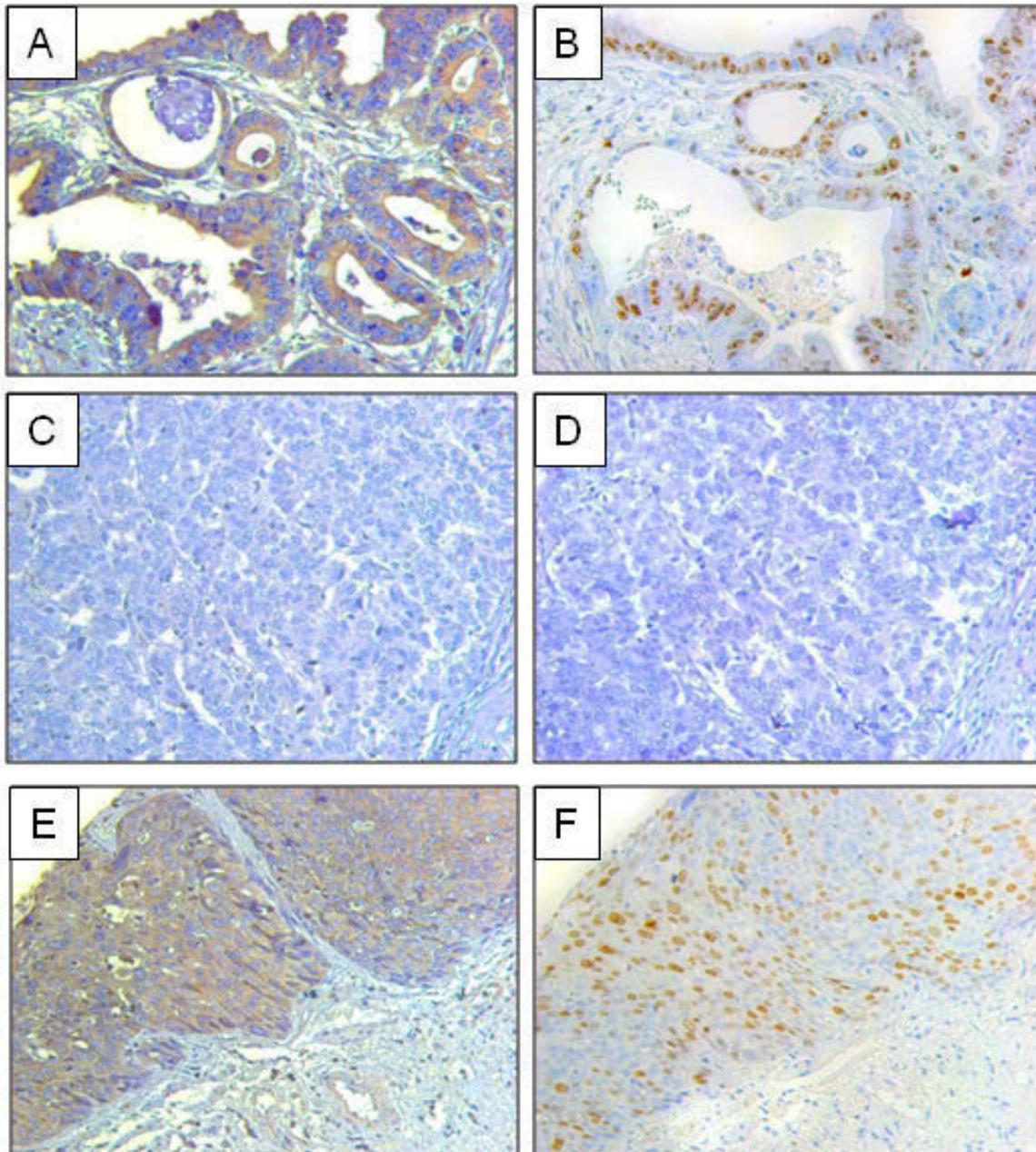
### 5.3 Korrelation der CYP 2C9 Expression (IRS) mit dem Proliferationsmarker Ki67

Die CYP 2C9 Proteinexpression der 78 EACs und 105 ESCCs wurden auf eine Korrelation mit dem Proliferationsmarker Ki67 untersucht. Die CYP 2C9 Expression wurde mittels IRS angegeben, die Ki67 Expression als prozentualer Anteil positiv gefärbter Zellkerne. Der Vergleich der beiden Faktoren ergab im EAC eine statistisch signifikante, positive Korrelation (Korrelations-Koeffizient ( $r$ ) = 0,281;  $p$  = 0,013; Spearman's Rho Test). Patienten mit hoher

CYP 2C9 Expression zeigten auch eine hohe Ki67 Expression. Im ESCC ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation der CYP2C9 und Ki67 Expression, es fanden sich allerdings auch hier häufig Tumorareale mit einer Ko-Lokalisation der beiden Parameter [Abb.:5.3.2, E und F].



**Abbildung 5.3.1:** Signifikante ( $p = 0,013$ ) Korrelation ( $r = 0,281$ ) der CYP 2C9 und Ki67 Expression in den untersuchten Tumorproben des EAC. Dargestellt sind die Mittelwerte des CYP 2C9-IRS, sowie des prozentualen Anteils Ki67 positiver Zellkerne.

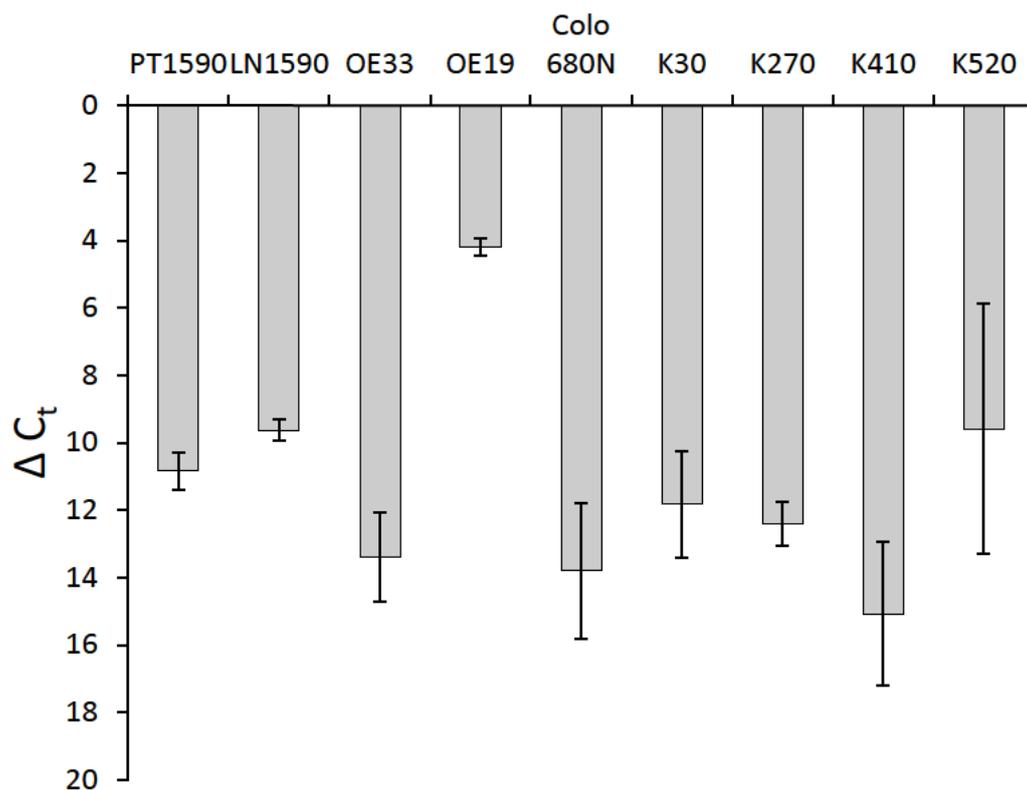


**Abbildung 5.3.2:** Immunhistochemische Färbung von CYP2C9 und Ki67 in humanen Ösophaguskarzinom Präparaten. **A-B:** Starke Färbung für CYP2C9 (**A**) und Ki67 (**B**) in gepaarten EAC Gewebeproben. **C-D:** Keine Färbung für CYP2C9 (**C**) und Ki67 (**D**) in gepaarten EAC Gewebeproben. **E-F:** Starke Färbung für CYP2C9 (**E**) und Ki67 (**F**) in gepaarten ESCC Gewebeproben.

## 5.4 CYP 2C9 Expression in Ösophaguskarzinomzelllinien

### 5.4.1 RT-PCR

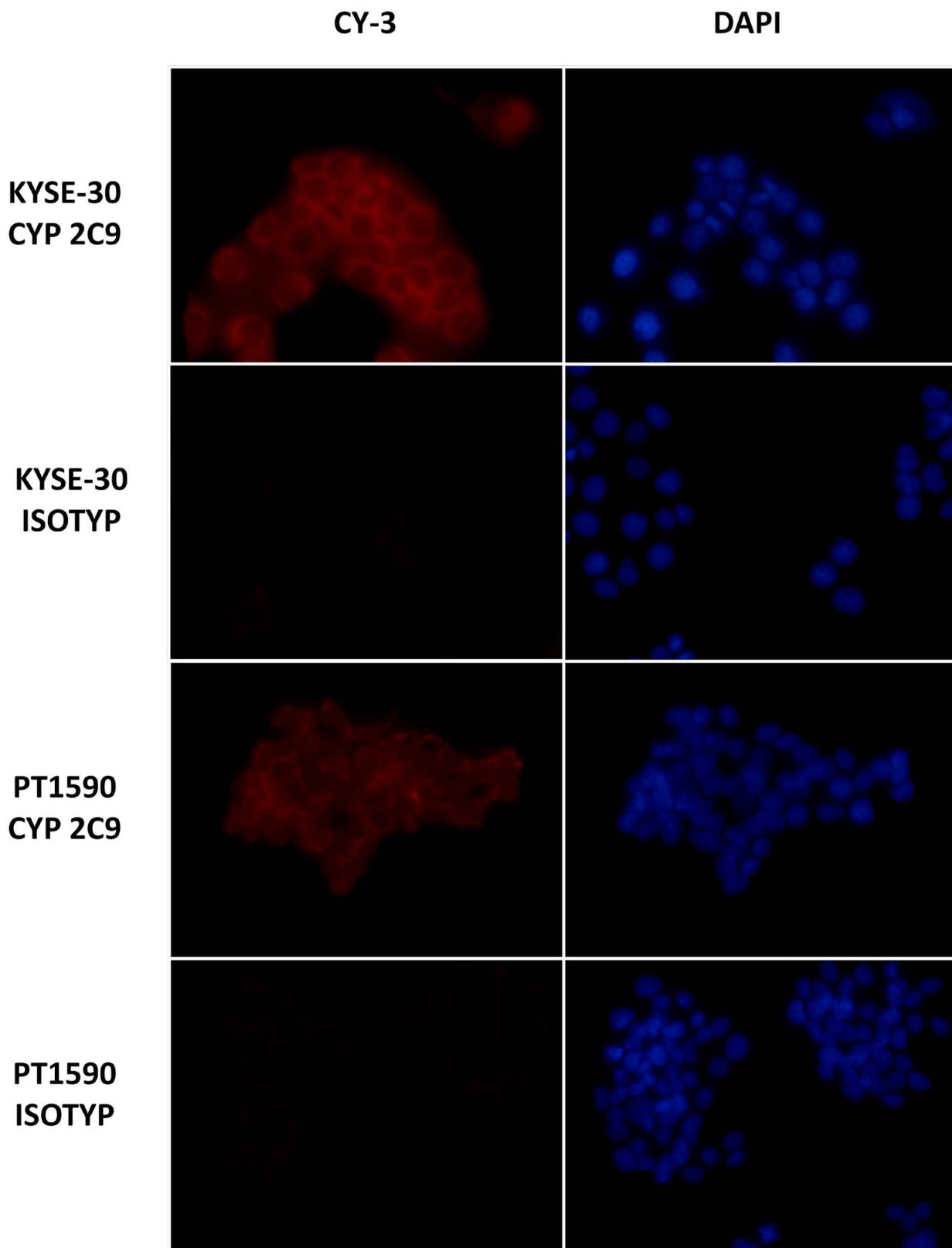
Mittels real-time RT-PCR wurden fünf Plattenepithel und vier Adenokarzinomzelllinien des Ösophagus auf die Expression von CYP 2C9 untersucht. Alle Zelllinien zeigten eine CYP 2C9 Expression. Die relative mRNA-Expression ( $\Delta C_t$ -Wert) variierte zwischen 4,18 bei der Adenokarzinomzelllinie OE19 und 15,08 bei der Plattenepithelzelllinie K410.



**Abbildung 5.4.1:** Relative CYP 2C9 Expression in Ösophaguskarzinomzelllinien, dargestellt in  $\Delta C_t$ -Werten. Ergebnisse (Mittelwert und Standardabweichung) aus drei Messungen mit jeweils Doppelansätzen.

### 5.4.2 Immuncytochemische Färbung

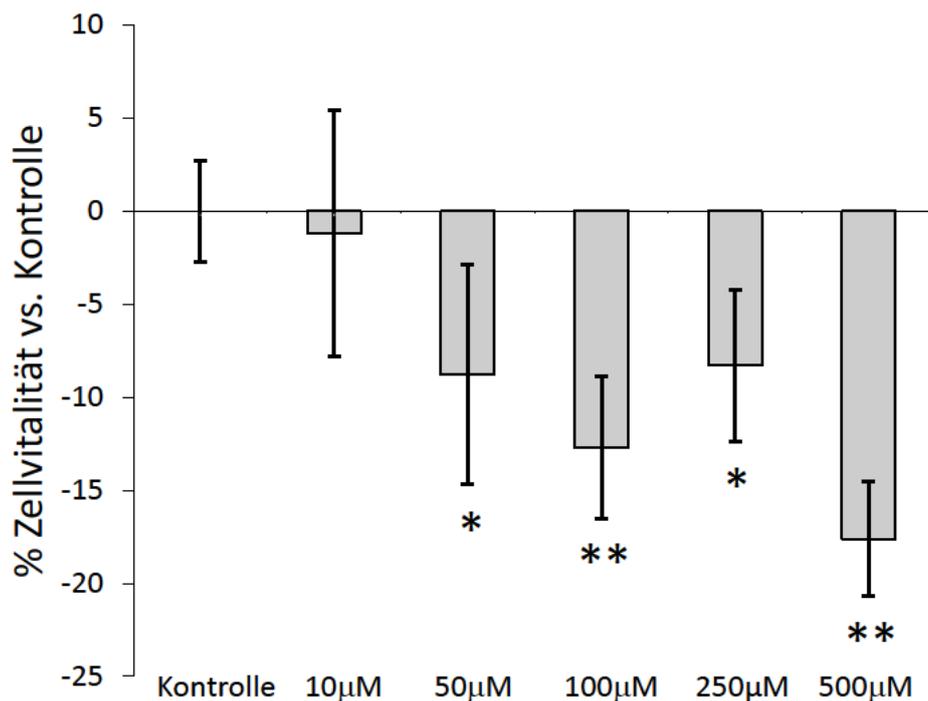
Die CYP 2C9 Expression der Zelllinien KYSE-30 und PT1590 wurde in einer immuncytochemischen Färbung auf Proteinebene analysiert. Beide Zelllinien zeigten eine perinukleär betonte Expression des Proteins, was mit einer Lokalisation im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums vereinbar ist.



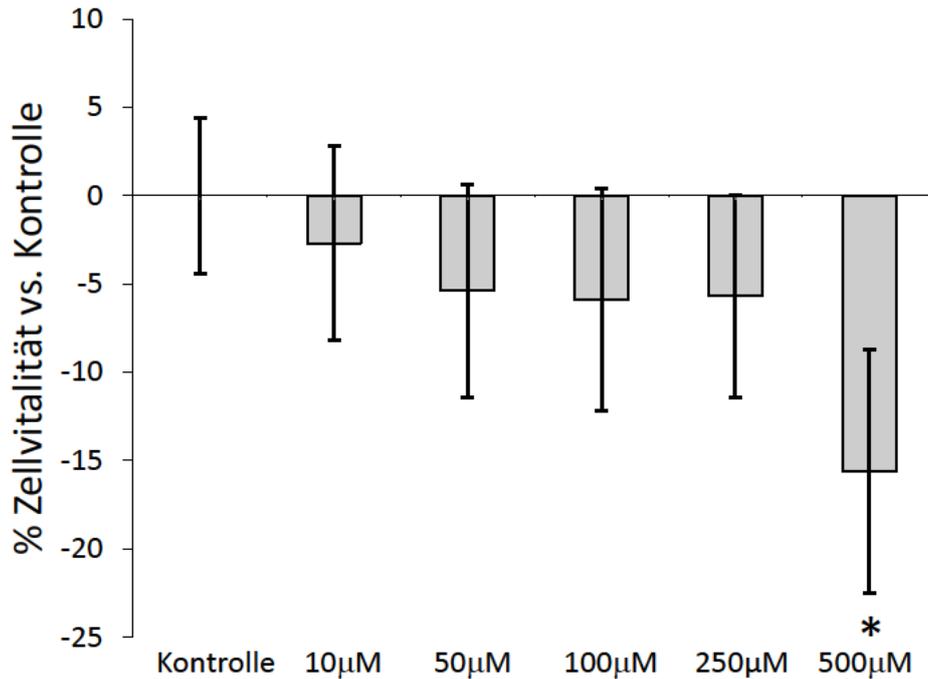
**Abbildung 5.4.2:** Immuncytochemische Darstellung der CYP 2C9 Expression in den Zelllinien KYSE-30 und PT1590.

## 5.5 Beeinflussung der Zellvitalität durch Sulfaphenazol

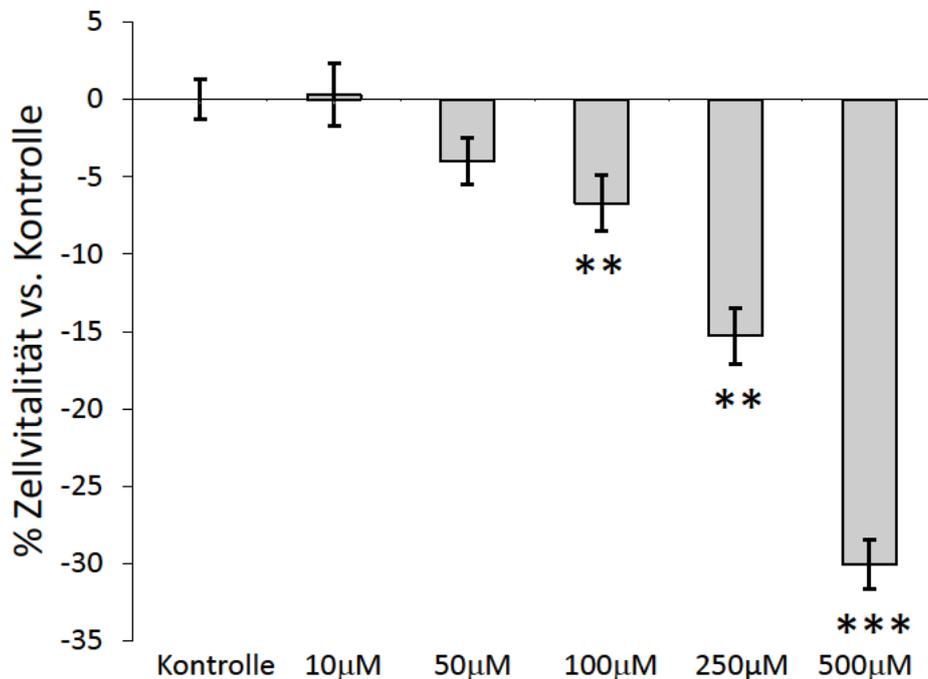
In den Ösophaguskarzinomzelllinien KYSE-30, PT1590 und Oe19 wurde der Einfluss des pharmakologischen CYP 2C9-Inhibitors Sulfaphenazol auf die Zellvitalität im MTT-Test untersucht. Sulfaphenazol bewirkte in allen Zelllinien eine dosisabhängige Abnahme vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.1). Für die Zelllinie KYSE-30 ergab sich eine signifikante Abnahme ab einer Sulfaphenazolkonzentration von 50 $\mu$ M (50 $\mu$ M = -8,7%,  $p < 0,05$ ; 100 $\mu$ M = -12,7%,  $p < 0,01$ ; 250  $\mu$ M = -8,2%,  $p < 0,05$ ; 500  $\mu$ M = -17,6%,  $p < 0,01$ ). Bei der Zelllinie PT1590 fand sich eine signifikante Abnahme der Zellvitalität erst bei einer Wirkstoffkonzentration von 500 $\mu$ M (500 $\mu$ M = -15,5%,  $p < 0,01$ ). In der Zelllinie Oe19 zeigte sich eine signifikante Reduktion ab 100 $\mu$ M Sulfaphenazol (100 $\mu$ M = -6,7%,  $p < 0,01$ ; 250 $\mu$ M = -15,3%,  $p < 0,01$ ; 500 $\mu$ M = -30,1%,  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 5.5.1** Zellvitalität, dargestellt in Prozent der Kontrolle für die Zelllinie KYSE-30 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Sulfaphenazol (10 $\mu$ M bis 500 $\mu$ M) für 24h. Ergebnisse (Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Fünffachansätzen.



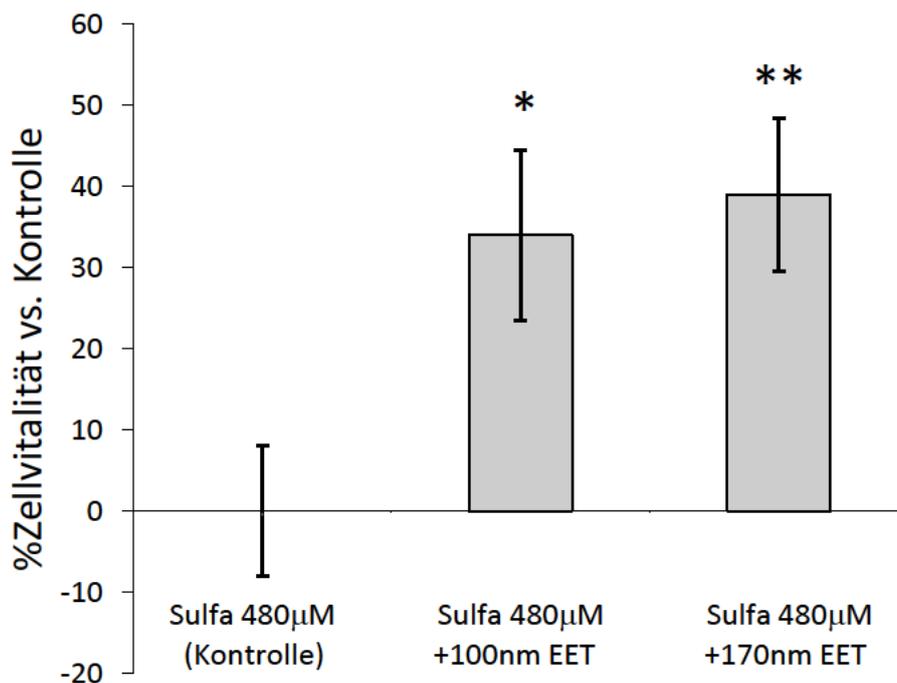
**Abbildung 5.5.2** Zellvitalität, dargestellt in Prozent der Kontrolle für die Zelllinie PT1590 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Sulfaphenazol (10µM bis 500µM) für 24h. Ergebnisse (Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Fünffachansätzen.



**Abbildung 5.5.3** Zellvitalität, dargestellt in Prozent der Kontrolle für die Zelllinie Oe19 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Sulfaphenazol (10µM bis 500µM) für 24h. Ergebnisse (Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Fünffachansätzen.

## 5.6 Reversibilität des Vitalitätsverlust durch 11,12-Epoxyeicosatriensäure

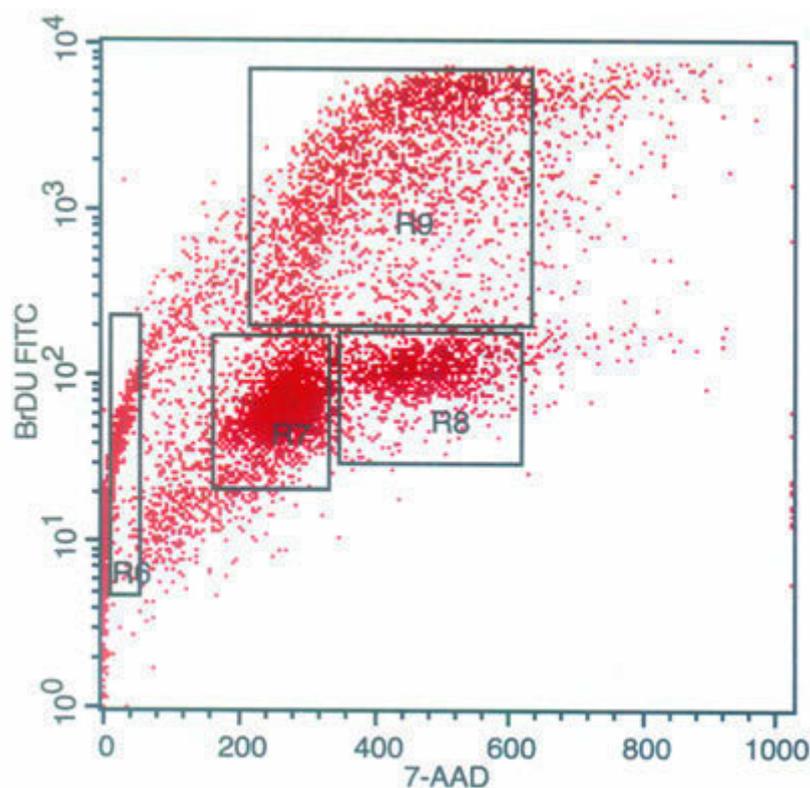
In der Ösophaguskarzinomzelllinie PT1590 wurde untersucht, ob der von Sulfaphenazol induzierte Vitalitätsverlust durch gleichzeitige Inkubation mit 11,12-Epoxyeicosatriensäure antagonisierbar ist. Hierzu wurden die Zellen gleichzeitig mit 480µM Sulphafenazol und verschiedenen Konzentrationen von 11,12-Epoxyeicosatriensäure inkubiert (100nM bzw. 170nM). Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit 480µM Sulphafenazol behandelt wurden. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde die Zellvitalität mittels MTT-Assay bestimmt. 11,12-Epoxyeicosatriensäure bewirkte eine signifikante Zunahme der Anzahl vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5.6). (100nM = +34%,  $p = 0,005$ ; 170nM = +39%,  $p = 0,002$ ).



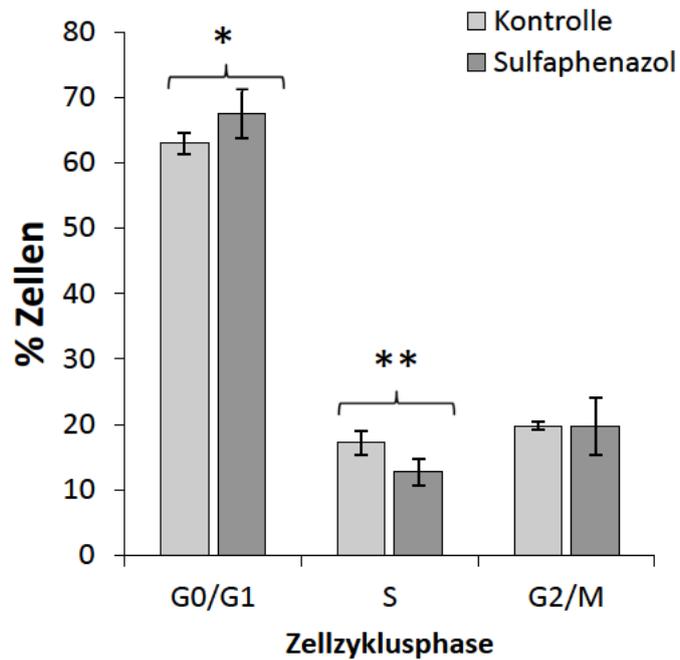
**Abbildung 5.6** Zellvitalität, dargestellt in Prozent der Kontrolle für die Zelllinie PT1590 nach Behandlung mit 480µM Sulfaphenazol und gleichzeitiger Inkubation mit 11,12-Epoxyeicosatriensäure (100nM bzw. 170nM) für 24h. Ergebnisse (Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Fünffachansätzen.

## 5.7 Beeinflussung des Zellzyklus durch Sulfaphenazol

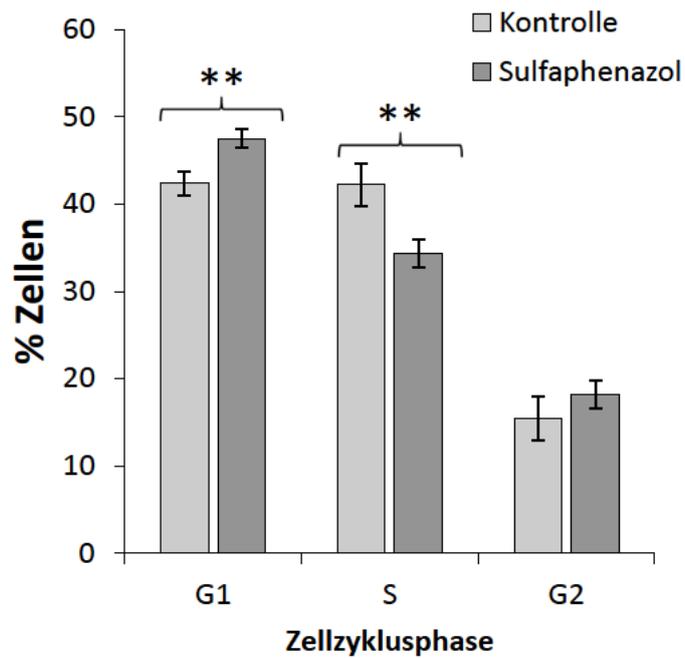
Mittels durchflusszytometrischer Zellzyklusanalyse wurde untersucht ob, die im MTT-Test gezeigte Abnahme der Anzahl vitaler Zellen unter Sulfaphenazol-Gabe auf einer Arretierung im Zellzyklus beruht. In der untersuchten Zelllinie PT1590 ergab sich zu verschiedenen Zeitpunkten eine signifikante Zunahme der Zellen in der G0/G1-Phase (**6h**: 62,9% vs. 67,4%,  $p = 0,037$ ; **12h**: 42,4% vs. 47,5%,  $p = 0,009$ ; **24h**: 44,4% vs. 47,6%,  $p = 0,076$ ), sowie eine signifikante Abnahme der Zellen in der S-Phase (**6h**: 17,2% vs. 12,8%,  $p = 0,006$ ; **12h**: 42,2% vs. 34,3%,  $p = 0,009$ ; **24h**: 33,8% vs. 28,5%,  $p = 0,009$ ) des Zellzyklus unter Inkubation mit 480 $\mu$ M Sulfaphenazol im Vergleich zur Kontrolle. In der G2/M-Phase ergab sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied (**6h**: 19,8% vs. 19,8%,  $p = 1,0$ ; **12h**: 15,4% vs. 18,2%,  $p = 0,075$ ; **24h**: 21,8% vs. 23,8%,  $p = 0,175$ ).



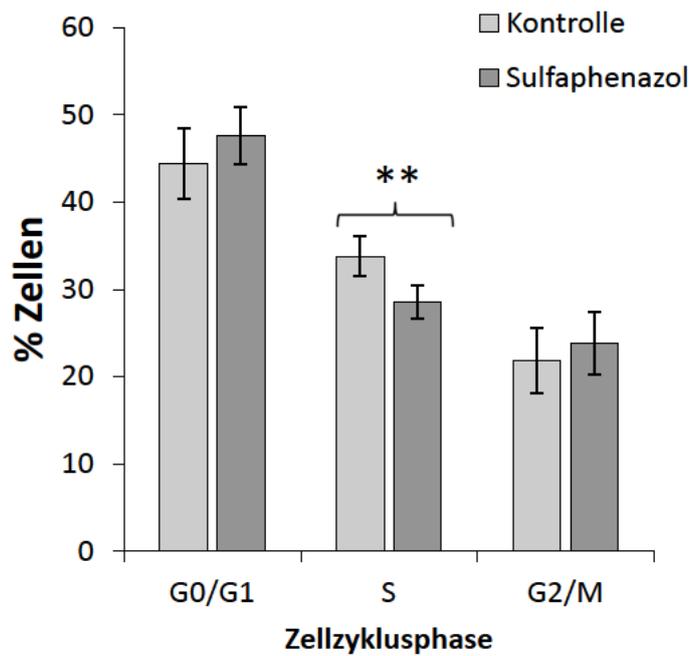
**Abbildung 4.7.1:** Beispielhafte Darstellung eines Punktwolkendiagramms einer FACS-Zellzyklusanalyse; **R7**: G0/G1-Phase, **R9**: S-Phase, **R8**: G2/M-Phase, **R6**: Apoptotische Zellen



**Abbildung 5.7.2:** Effekt von Sulfaphenazol auf den Zellzyklus der Zelllinie PT1590. Die Zellen wurden für 6h mit Sulfaphenazol (480 $\mu$ M) inkubiert. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel Ethanol. Die Zellen wurden mittels BrdU Flow Kit (BD Pharmingen) aufbereitet und durchflusszytometrisch analysiert. Ergebnisse (Mittelwert und Standardabweichung) von fünf unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 5.7.3:** Effekt von Sulfaphenazol auf den Zellzyklus der Zelllinie PT1590. Die Zellen wurden für 12h mit Sulfaphenazol (480µM) inkubiert. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel Ethanol. Die Zellen wurden mittels BrdU Flow Kit (BD Pharmingen) aufbereitet und durchflusszytometrisch analysiert. Ergebnisse (Mittelwert und Standardabweichung) von fünf unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 5.7.4:** Effekt von Sulfaphenazol auf den Zellzyklus der Zelllinie PT1590. Die Zellen wurden für 24h mit Sulfaphenazol (480 $\mu$ M) inkubiert. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel Ethanol. Die Zellen wurden mittels BrdU Flow Kit (BD Pharmingen) aufbereitet und durchflusszytometrisch analysiert. Ergebnisse (Mittelwert und Standardabweichung) von fünf unabhängigen Experimenten.

## 6. Diskussion

Das Ösophaguskarzinom ist ein ausgesprochen aggressiver, schnell wachsender und frühzeitig metastasierender Tumor, der trotz verfeinerter Diagnoseverfahren, großer Fortschritte der chirurgischen Technik und multimodaler Therapieansätze nach wie vor eine sehr ungünstige Prognose hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Cytochrom P450 Isoform 2C9 in Hinblick auf eine Bedeutung für die Karzinogenese und Tumorzellproliferation im Ösophaguskarzinom analysiert. Hierzu erfolgte zunächst eine Expressionsanalyse des Enzyms in Karzinom- und Normalmukosapräparaten des Ösophagus. Anschließend wurde der Einfluss von CYP 2C9 auf die Proliferation verschiedener Adeno- und Plattenepithelkarzinomzelllinien des Ösophagus untersucht.

### 6.1 CYP 2C9 Expression im Ösophaguskarzinom

Die CYP 2C9 Expression im Adeno- und Plattenepithelkarzinom sowie in Normalmukosa des Ösophagus wurde sowohl auf transkriptionaler als auch auf Proteinebene analysiert. Dabei zeigten sich hohe CYP 2C9 Expressionslevel im Adenokarzinom sowie in der den Tumor umgebenden Normalmukosa des Ösophagus. Eine signifikant niedrigere Expression fand sich dagegen im ösophagealen Plattenepithelkarzinom. Des Weiteren ergab sich eine Korrelation der CYP 2C9 Expression mit pathologischen Charakteristika wie Invasionstiefe, regionale Lymphknotenmetastasierung und histologischem Grading. Karzinome mit niedrigem Tumorstadium, ohne Lymphknotenmetastasierung sowie mit guter Differenzierung wiesen signifikant höhere CYP 2C9 Expressionslevel auf als weiter fortgeschrittene Tumore mit bereits erfolgter Metastasierung und schlechterer Differenzierung.

Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen auch Bergheim et al. Sie untersuchten das Expressionsverhalten verschiedener Cytochrom P450 Monooxygenasen in Normalmukosa und Tumorgewebe von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Dabei zeigte sich eine verminderte CYP 2C Expression im ESCC Gewebe, verglichen mit der in den Tumor umgebenden ösophagealen Normalmukosa. Zusätzlich wurde die CYP Expression in der Normalmukosa von Ösophaguskarzinompatienten mit der in Normalmukosa von Kontrollpatienten ohne Karzinom verglichen. Hierbei ergab sich eine signifikant niedrigere CYP 2C8-19 Expression in ösophagealer Normalmukosa der gesunden Kontrollpatienten. Eine

Erklärung für diesen Befund könnte die Induktion des Enzymes in der Schleimhaut von Karzinompatienten sein. Als mögliche nicht krankheitsspezifische Induktoren kämen ein vermehrter Nikotin- oder Alkoholkonsum sowie eine refluxbedingte Verlängerung der Kontaktzeit zwischen Schleimhaut und Mageninhalt oder die Einnahme von Medikamenten wie z.B. Antazida in Frage [Huges SJ et al 1999, Bergheim I et al 2007].

In der Literatur findet man interessanterweise für verschiedene CYP450 Enzyme sowohl Berichte über erhöhte wie auch über reduzierte Expressionslevel in Karzinomgewebe, verglichen mit angrenzenden Normalgeweben. Einige CYP-Isoformen scheinen die Karzinogenese und Tumorzellproliferation zu fördern, andere scheinen sie zu behindern. So konnte etwa CYP 2J2 lediglich in Gewebe unterschiedlichster Karzinomarten detektiert werden, nicht aber in angrenzendem Normalgewebe. Zusätzlich wurde eine hohe CYP 2J2 Expression als Tumorzellproliferations-, sowie migrationsfördernder Faktor identifiziert [Jiang JG et al 2005]. In einer Studie über die Bedeutung der CYP450 Isoform 2B6 im Prostatakarzinom ergab sich dagegen ein völlig anderer Befund. Hier wurde vor allem in Normalgewebe eine hohe Expression des Enzyms gemessen, welches in Karzinomgewebe deutlich seltener detektiert werden konnte. Je schlechter die Differenzierung eines Prostatakarzinoms, umso geringer war seine CYP 2B6 Expression. Eine hohe Expression dieser CYP-Isoform war gleichzeitig mit einer Abnahme der Tumorzellproliferation assoziiert [Kumagai J et al 2007].

Das von uns beobachtete Expressionsverhalten der CYP450 Isoform 2C9 im Ösophaguskarzinom ähnelt eher dem von CYP 2B6 im Prostatakarzinom. Wir konnten hohe Expressionslevel des Enzyms in Normalmukosa von Karzinompatienten und eine Abnahme der Expression in weiter fortgeschrittenen Tumoren feststellen.

## **6.2 Korrelation der CYP 2C9 Expression mit dem ki67 Proliferationsindex**

Um zu überprüfen, ob die CYP 2C9 Expression im Tumorgewebe mit dem Proliferationsverhalten der Ösophaguskarzinome assoziiert ist, wurde in aufeinanderfolgenden Gewebeschnitten eines Tumorpräparates der IRS-Wert der CYP 2C9 Expression mit dem Ki67 Proliferationsindex korreliert. Das Ki67-Antigen gilt als Proliferationsmarker und wird ausschließlich in proliferierenden Zellen exprimiert. Ruhende

Zellen, also solche, die sich in der G0-Phase des Zellzyklus befinden, exprimieren das Antigen nicht. Der Ki67 Proliferationsindex gibt demnach über das Wachstumsverhalten eines Tumors Aufschluss. Für die Korrelation der CYP 2C9 und Ki67 Expression zeigte sich im Adenokarzinom des Ösophagus ein statistisch signifikanter Zusammenhang der beiden Faktoren. Tumoren mit hohem Ki67 Proliferationsindex zeigten gleichzeitig eine vermehrte CYP 2C9 Expression, solche mit niedrigem Proliferationsindex eine geringere CYP 2C9 Expression. In den untersuchten Plattenepithelkarzinompräparaten und Normalmukosen des Ösophagus hingegen zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang von CYP 2C9 Expression und Ki67 Proliferationsindex. Lichtmikroskopisch fanden sich allerdings auch im Plattenepithelkarzinom häufig Areale mit Zellen, die sowohl CYP 2C9 als auch Ki67 exprimierten.

Ähnliche Beobachtungen machten Huges J. et al, als sie die Expression verschiedener CYP450 Enzyme in ösophagealer Normalmukosa und Barrettmukosa analysierten. Sie stellten fest, dass alle untersuchten Isoformen, unter anderem CYP 1A2, CYP 3A4 und CYP 2C9/10, in Normalmukosa in nicht proliferierenden Zellen exprimiert wurden, während in Barrettmukosa die CYP-Expression in Arealen aktiver Zellproliferation dominierte. Diese Kombination aus einerseits aktiver Zellproliferation und andererseits der Möglichkeit, Prokarzinogene mittels CYP450 abhängiger Metabolisierung zu aktivieren, könnte einer der Gründe für das große Entartungspotential der Barrettmukosa sein. Inwiefern die CYP450 Enzyme und ihre Produkte selbst eine Modulation der proliferativen Eigenschaften in Zellen der Barrett-Schleimhaut bewirken, wurde nicht analysiert [Huges J et al 1999].

Fasst man die Ergebnisse der CYP 2C9 Expressionsanalyse und der Korrelation mit dem Ki67 Proliferationsindex zusammen, so ist festzuhalten, dass frühe Tumorstadien (geringe Tumorgröße, keine Lymphknotenmetastasen, gute Differenzierung) mit hoher CYP 2C9 Expression gleichzeitig stärker proliferieren. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der von Laird AK (1964) erstmals beschriebenen Wachstumskinetik von Tumoren nach Gompertz, wonach Tumoren mit zunehmender Größe eine abnehmende Tumorzellproliferation besitzen [Laird AK 1964].

### **6.3 CYP 2C9 Expression in Ösophaguskarzinomzelllinien**

Um die mögliche biologische Bedeutung der Cytochrom p450 Monooxygenase 2C9 und seiner Metaboliten im Rahmen der Proliferation von Ösophaguskarzinomzellen zu untersuchen, wurden einige Experimente an Ösophaguskarzinomzelllinien durchgeführt. Zunächst wurden verschiedene Adeno- und Plattenepithelkarzinomzelllinien des Ösophagus bezüglich ihres CYP2C9 Expressionsverhalten analysiert. Alle untersuchten Zelllinien zeigten eine CYP 2C9 Expression. Die Expressionslevel lagen allerdings deutlich niedriger als in den analysierten primären Karzinomgeweben. Diese Beobachtung ist durch eine große Instabilität des Enzyms unter Zellkulturbedingungen zu erklären [Fleming I 2007]. In verschiedenen Geweben konnte eine schnelle Abnahme der CYP 2C9 Expression nach Zellisolation und in vitro Kultivierung beobachtet werden [Fleming I 2007, Michaelis UR et al 2005]. So wurde etwa die Funktion von CYP 2C9 und seiner EETs in der Regulierung der vaskulären Homöostase in Zellkulturversuchen lange Zeit übersehen [Fleming I 2007]. Demnach ist es denkbar, dass die in vitro gewonnenen Ergebnisse die Bedeutung des Enzyms und seiner Metaboliten im ursprünglichen Gewebe noch unterschätzen. Für die weiteren Experimente wählten wir die Adenokarzinomzelllinien Oe19 und PT1590, sowie die Plattenepithelkarzinomzelllinie KYSE-30. OE19 besaß mit einem  $\Delta C_t$ -Wert von 4,18 die mit Abstand stärkste CYP 2C9 Expression. Die Expressionslevel der Zelllinien PT1590 und KYSE-30 waren mit  $\Delta C_t$ -Werten von 10,84 und 11,83 deutlich niedriger.

### **6.4 CYP2C9 und seine Bedeutung für die Zellproliferation**

In einer ersten Versuchsreihe wurde das Enzym CYP2C9 in den Ösophaguskarzinomzelllinien PT1590, Oe19 und KYSE-30 mittels Sulfaphenazol inhibiert. Sulfaphenazol gilt als selektiver, pharmakologischer Inhibitor der Isoform CYP2C9 [Fleming I et al. 2001]. Die Inkubation der ausgewählten Zelllinien mit Sulfaphenazol führte zu einer dosisabhängigen Abnahme der Zellvitalität im MTT-Assay. Eine signifikante Abnahme der Tumorzellvitalität konnte ab Sulfaphenazolkonzentrationen von 50 $\mu$ M beobachtet werden. Der höchste Vitalitätsverlust wurde bei der Zelllinie Oe19 gemessen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die durch Sulfaphenazol verursachte Abnahme der Zellvitalität im MTT-Assay durch gleichzeitige Substitution von 11,12-EET antagonisierbar ist. Diese Beobachtung bekräftigt die Vermutung, dass die Reduktion der Zellvitalität auf einer Konzentrationsabnahme CYP2C9 generierter EETs beruht. Um die im MTT-Assay beobachtete Reduktion der Zellvitalität

weiter zu spezifizieren, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Die Zelllinie PT1590 wurde nach CYP 2C9 Inhibition mit Hilfe eines FITC BrdU Flow Kits und anschließender FACS-Analyse auf Veränderungen im Zellzyklus untersucht. Diese Analyse zeigte eine signifikante Zunahme des prozentualen Anteils von Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase sowie eine signifikante Abnahme des Zellanteils in der S-Phase des Zellzyklus. Demnach scheint der im MTT-Assay beobachtete Vitalitätsverlust nach pharmakologischer CYP 2C9 Inhibition auf einer Beeinträchtigung der Zellproliferation zu beruhen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Jiang JG et al. Sie zeigten, dass CYP 2J2 generierte EETs die Proliferation verschiedener Tumorzellen steigern und es analog durch Inhibition der Epoxygenaseaktivität zu einer Reduktion der Zellproliferation kommt. Als biologische Grundlage der gesteigerten Proliferationsaktivität wurde eine vermehrte Phosphorylierung des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und eine Aktivierung des Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K/AKT) und mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalweges beobachtet. Zusätzlich konnten Jiang JG et al nachweisen, dass CYP 2J2 generierte EETs in Tumorzellen neben den Effekten auf die Zellproliferation zu einer erhöhten Resistenz gegenüber der Induktion von Apoptose führen.

Auch in nicht neoplastischem Gewebe und hier insbesondere im Gefäßendothel scheinen CYP-Epoxygenasen wie CYP 2C9 und ihre EETs die Zellproliferation zu beeinflussen. So konnten Fleming I et al einen proliferationsfördernden Effekt von CYP 2C generierten EETs in humanen Endothelzellen nachweisen. Auch hier war die Steigerung der Zellproliferation mit einer vermehrten Phosphorylierung des EGFR und einer Aktivierung des PI3K/Akt und MAPK Signalweges verbunden. In einer weiteren Studie zeigte sich in Endothelzellen eine gesteigerte Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) nach Administration von 11,12-EET oder Überexpression der Epoxygenase CYP 2C9 mittels adenoviraler Transfektion [Michaelis UR et al 2005]. Eine derartige Verknüpfung von CYP 2C9 und COX-2 Expression wäre auch im Ösophaguskarzinom durchaus denkbar, da COX-2 ähnlich wie CYP 2C9 besonders in frühen Tumorstadien exprimiert wird und ebenfalls proliferationsfördernd wirkt [Zhi H et al 2006, Zhang L et al 2009].

Die in unseren Versuchen beobachtete Abnahme der Tumorzellproliferation nach CYP 2C9 Inhibition mit Sulfaphenazol beruht höchstwahrscheinlich auf einer Reduktion der von CYP 2C9 produzierten EETs. Ob diese Beeinflussung der Zellproliferation auf einer Modulation der EGFR Phosphorylierung und Aktivierung des PI3K/Akt oder MAPK Signalweges beruht, kann nicht beurteilt werden. Ebenso kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es neben der Proliferationsabnahme zusätzlich zu einer Apoptoseinduktion kommt. Diese Fragen werden Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

### **6.5 Die Bedeutung von CYP 2C9 im Ösophaguskarzinom**

In dieser Studie wurde erstmalig die Expression der Cytochrom P450 Epoxygenase 2C9 und ihre Bedeutung für Tumorzellproliferation im Ösophaguskarzinom analysiert. Wir konnten feststellen, dass CYP 2C9 im Ösophaguskarzinom sowohl auf transkriptionaler wie auch auf Proteinebene exprimiert wird. Vor allem die Normalmukosen von Karzinompatienten sowie frühe Tumorstadien besaßen hohe Expressionslevel des Enzyms. In den durchgeführten Zellkulturversuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass CYP 2C9 eine proliferationsfördernde Wirkung in verschiedenen Ösophaguskarzinomzelllinien besitzt. Diese Beobachtungen deuten auf eine Bedeutung des Enzyms in der frühen Entwicklung des Ösophaguskarzinoms hin. Die pharmakologische Inhibition von CYP 2C9 könnte folglich zu einer effektiveren Therapie in Karzinomen mit hohen Expressionslevels des Enzyms beitragen.

Die selektive Inhibition bestimmter CYP Isoformen hat bereits Einzug in die Therapie maligner Erkrankungen gefunden. CYP19 Inhibitoren (Aromatasehemmer) wie Anastrozol oder Exemestan sind seit Jahren ein fester Bestandteil der Therapie des Mammakarzinoms [Riemsma R et al. 2010]. Auch in der Behandlung des Prostatakarzinoms zeigt die Inhibition der Isoform CYP17 erste erfolgsversprechende Resultate [Wu Y et al. 2011]. Nach diesem Vorbild könnte in Zukunft auch die Inhibition von CYP 2C9 für die Therapie des Ösophaguskarzinoms genutzt werden.

## 7. Zusammenfassung

Trotz verbesserter Operationstechniken und multimodaler Therapieansätze ist die Prognose des Ösophaguskarzinoms nach wie vor schlecht. Ein besseres Verständnis der Tumorbiologie und die Entwicklung neuer Strategien zur Prävention und Therapie des Ösophaguskarzinoms sind demnach von essentieller Bedeutung. In den vergangenen Jahren hat sich die Inhibition von Cytochrom P450 Enzymen als möglicher neuer effektiver Ansatzpunkt für die Therapie maligner Erkrankungen erwiesen. In der vorliegenden Arbeit sollte das Expressionsverhalten, sowie die biologische Funktion der CYP Isoform 2C9 analysiert werden und anschließend dessen Potential als neue Zielstruktur für die Therapie des Ösophaguskarzinoms evaluiert werden.

Im Rahmen der Expressionsanalyse wurden Präparate von Adenokarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und Normalmukosen des Ösophagus auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht. Dabei zeigten sich hohe CYP 2C9 Expressionslevel im Adenokarzinom, sowie in der den Tumor umgebenden Normalmukosa des Ösophagus. Eine signifikant niedrigere Expression fand sich dagegen im ösophagealen Plattenepithelkarzinom. Interessanterweise zeigten in beiden Histologien Karzinome mit niedrigem Tumorstadium, ohne Lymphknotenmetastasierung, sowie mit guter Differenzierung eine signifikant höhere CYP 2C9 Expression als fortgeschrittene Tumore. Im Adenokarzinom des Ösophagus war außerdem eine Korrelation der CYP 2C9 Expression mit dem Ki67 Proliferationsindex feststellbar. Um die mögliche biologische Bedeutung von CYP 2C9 im Rahmen der Proliferation von Ösophaguskarzinomzellen näher zu untersuchen, wurden Experimente an verschiedenen Ösophaguskarzinomzelllinien durchgeführt. Die pharmakologische CYP 2C9 Inhibition mit Sulfaphenazol führte dabei in allen Zelllinien zu einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität im MTT-Assay. Dieser Vitalitätsverlust war durch die gleichzeitige Applikation von 11,12-EET reversibel. Um die im MTT-Assay beobachtete Reduktion der Zellvitalität weiter zu spezifizieren, wurde eine Zellzyklusanalyse mittels BrdU-FACS durchgeführt. Im Rahmen dieser Zellzyklusanalyse zeigte sich ein G0/G1-Arrest nach CYP 2C9 Inhibition. CYP 2C9 scheint durch die Beeinflussung der Tumorzellproliferation eine Bedeutung in der frühen Entwicklung des Ösophaguskarzinoms zu besitzen. Die pharmakologische Inhibition dieses Enzyms könnte demnach zu einer effektiveren Therapie bei Ösophaguskarzinomen mit einer hohen CYP 2C9 Expression beitragen.

## 8. Literaturverzeichnis

- Ahern TP, Pedersen L, Cronin-Fenton DP, Sørensen HT, Lash TL. (2009). "No increase in breast cancer recurrence with concurrent use of tamoxifen and some CYP2D6-inhibiting medications." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 18(9): 2562-2564.
- Bareiss D, Stabenow R, Müller R, Eisinger B, Stegmaier C, Däubler P, Zeitz M, Scherübl H. (2002). "Current epidemiology of carcinoma of the esophagus and cardia in Germany." *Dtsch Med Wochenschr.* 127(25-26): 1367-74.
- Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K. (2000). "Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 9(1): 3-28.
- Bathelt CM, Mulholland AJ, Harvey JN. (2008). "QM/MM modeling of benzene hydroxylation in human cytochrome P450 2C9." *J Phys Chem A.* 112(50): 13149-13156.
- Berg K, Hansen MB, Nielsen SE. (1990). "A new sensitive bioassay for precise quantification of interferon activity as measured via the mitochondrial dehydrogenase function in cells (MTT-method)." *APMIS.* 98 (2): 156-162.
- Bergheim I, Wolfgarten E, Bollschweiler E, Hölscher AH, Bode C, Parlesak A. (2007). "Cytochrome P450 levels are altered in patients with esophageal squamous-cell carcinoma." *World J Gastroenterol* 13(7): 997-1002.
- Blaser MJ, Saito D. (2002). "Trends in reported adenocarcinomas of the oesophagus and gastric cardia in Japan." *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 14(2): 107-113.
- Blot WJ, McLaughlin JK. (1999). "The changing epidemiology of esophageal cancer." *Semin Oncol* 26: 2-8.
- Bollschweiler E, Wolfgarten E, Gutschow C, Hölscher AH. (2001). "Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males." *Cancer* 92(3): 549-555.
- Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. (1988). "Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests." *Toxicol In Vitro.* 2(1): 1-6.

- Bosetti C, La Vecchia C, Talamini R, Simonato L, Zambon P, Negri E, Trichopoulos D, Lagiou P, Bardini R, Franceschi S. (2000). "Food groups and risk of squamous cell esophageal cancer in northern Italy." *Int J Cancer*. 2000 87(2): 289-294.
- Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. (2002). "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995." *European Journal of Cancer* 38(1): 99-166.
- 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. (2001). "Excess incidence of squamous cell esophageal cancer among US Black men: role of social class and other risk factors." *Am J Epidemiol* 153(2): 114-122.
- Bruno RD, Njar VC. (2007). "Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development." *Bioorg Med Chem*. 15(15): 5047-5060.
- Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. (1985). "The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus." *N Engl J Med*. 313(14): 857-859.
- Castell JV, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. (2005). "Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach." *Exp Toxicol Pathol*. . 57: 189-204.
- Chan AT, Tranah G, Giovannucci EL, Hunter DJ, Fuchs CS (2004). "A prospective study of genetic polymorphisms in the cytochrome P-450 2C9 enzyme and the risk for distal colorectal adenoma." *Clin Gastroenterol Hepatol*.(2(8)): 704-712.
- Chen C, L. G., Liao W, Wu J, Liu L, Ma D, Zhou J, Elbekai RH, Edin ML, Zeldin DC, Wang DW. (2009). "Selective inhibitors of CYP2J2 related to terfenadine exhibit strong activity against human cancers in vitro and in vivo." *J Pharmacol Exp Ther*. 329(3):: 908-918.
- Chow WH, Finkle WD, McLaughlin JK, Frankl H, Ziel HK, Fraumeni JF Jr. (1995). "The relation of gastroesophageal reflux disease and its treatment to adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia." *JAMA* 274(6): 474-477.
- Collard JM, Otte JB, Fiassé R, Laterre PF, De Kock M, Longueville J, Glineur D, Romagnoli R, Reynaert M, Kestens PJ. (2001). "Skeletonizing en bloc esophagectomy for cancer." *Ann Surg*. 234(1): 25-32.

- Corder AP, Jones RH, Sadler GH, Daniels P, Johnson CD. (1996). "Heartburn, oesophagitis and Barrett's oesophagus in self-medicating patients in general practice." *Br J Clin Pract.* 50(5): 245-248.
- Corley DA, Buffler PA. (2001). "Oesophageal and gastric cardia adenocarcinomas: analysis of regional variation using the Cancer Incidence in Five Continents database." *Int J Epidemiol.* 30(6): 1415-1425.
- Crew KD, Neugut AI. (2004). "Epidemiology of upper gastrointestinal malignancies." *Semin Oncol.* 31(4): 450-464.
- Csendes A, Smok G, Burdiles P, Quesada F, Huertas C, Rojas J, Korn O. (2000). "Prevalence of Barrett's esophagus by endoscopy and histologic studies: a prospective evaluation of 306 control subjects and 376 patients with symptoms of gastroesophageal reflux." *Dis Esophagus* 13(1): 5-11.
- Daly JM, Fry WA, Little AG, Winchester DP, McKee RF, Stewart AK, Fremgen AM. (2000). "Esophageal cancer: results of an American College of Surgeons Patient Care Evaluation Study." *J Am Coll Surg.* 190(5): 562-572.
- Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. (2003). "Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: Rationale and promise." *Cancer Cell.* 4(6): 431-436.
- Degawa M, Stern SJ, Martin MV, Guengerich FP, Fu PP, Ilett KF, Kaderlik RK, Kadlubar FF. (1994). "Metabolic activation and carcinogen-DNA adduct detection in human larynx." *Cancer Res.* 54(18): 4915-9.
- Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. (1998). "Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States." *Cancer* 83(10): 2049-56.
- Ding X, Kaminsky LS. (2003). "Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts." *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43: 149-173.
- Drewitz DJ, Sampliner RE, Garewal HS. (1997). "The incidence of adenocarcinoma in Barrett's esophagus: a prospective study of 170 patients followed 4.8 years." *Am J Gastroenterol.* 92(2): 212-215.

Enayetallah AE, French RA, Grant DF. (2006). "Distribution of soluble epoxide hydrolase, cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 in human malignant neoplasms." *J Mol Histol.* 37(3-4): 133-41.

Enayetallah AE, French RA, Thibodeau MS, Grant DF. (2004). "Distribution of Soluble Epoxide Hydrolase and of Cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in Human Tissues." *J Histochem Cytochem.* 52(4): 447-454.

Engel LS, Chow WH, Vaughan TL, Gammon MD, Risch HA, Stanford JL, Schoenberg JB, Mayne ST, Dubrow R, Rotterdam H, West AB, Blaser M, Blot WJ, Gail MH, Fraumeni JF Jr. (2003). "Population attributable risks of esophageal and gastric cancers." *J Natl Cancer Inst* 95(18): 1404-1413.

Enzinger PC, Mayer RJ. (2003). "Esophageal Cancer." *N Engl J Med* 349: 2241-2252.

Farrow DC, Vaughan TL, Sweeney C, Gammon MD, Chow WH, Risch HA, Stanford JL, Hansten PD, Mayne ST, Schoenberg JB, Rotterdam H, Ahsan H, West AB, Dubrow R, Fraumeni JF Jr, Blot WJ. (2000). "Gastroesophageal reflux disease, use of H2 receptor antagonists, and risk of esophageal and gastric cancer." *Cancer Causes Control.* 11(3): 231-238.

Flamen P, Lerut A., Van Cutsem E, De Wever W, Peeters M, Stroobants S, Dupont P, Bormans G, Hiele M, De Leyn P, Van Raemdonck D, Coosemans W, Ectors N, Haustermans K, Mortelmans L. (2000). "Utility of positron emission tomography for the staging of patients with potentially operable esophageal carcinoma." *J Clin Oncol.* 18(18): 3202-3210.

Fleming I (2001). "Cytochrome P450 and Vascular Homeostasis." *Circ Res.* 89(9): 753-762.

Fleming I (2007). "Epoxyeicosatrienoic acids, cell signaling and angiogenesis." *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 82 (2007) 60-67 82: 60-67.

Fleming I (2007). "DiscrEET regulators of homeostasis: epoxyeicosatrienoic acids, cytochrome P450 epoxygenases and vascular inflammation." *Trends Pharmacol Sci.* 28(9): 448-452.

Fleming I, Michaelis UR, Bredenkötter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. (2001). "Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Synthase (Cytochrome P450

2C9) Is a Functionally Significant Source of Reactive Oxygen Species in Coronary Arteries " *Circ. Res.* 2001;88;44-51 88: 44-51.

Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF, Mouw T, Subar AF, Hollenbeck AR, Schatzkin A. (2007). "A Prospective Study of Tobacco, Alcohol, and the Risk of Esophageal and Gastric Cancer Subtypes." *Am J Epidemiol.* 165(12): 1424-1433.

Fürstenberger G, Krieg P, Müller-Decker K, Habenicht AJ. (2006). "What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis?" *Int J Cancer.* 119(10): 2247-2254.

García Rodríguez LA, Lagergren J, Lindblad M. (2006). "Gastric acid suppression and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma: a nested case control study in the UK." *Gut* 55(11): 1538-1544.

Ghadirian P, Ekoe JM, Thouez JP. (1992). "Food habits and esophageal cancer: an overview." *Cancer Detect Prev.* 16(2): 163-168.

Goldstein JA, de Morais SM (1994). "Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily." *Pharmacogenetics.* 4(6): 285-299.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. (1989). "Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill." *J Immunol Methods.* 119(2): 203-210.

Hashizume T, Yoshitomi S, Asahi S, Matsumura S, Chatani F, Oda H. (2009). "In vitro micronucleus test in HepG2 transformants expressing a series of human cytochrome P450 isoforms with chemicals requiring metabolic activation." *Mutation Research* 677: 1-7.

Hiscox S, Davies EL, Barrett-Lee P. (2009). "Aromatase inhibitors in breast cancer." *Maturitas* 63(4): 275-279.

Homs MY, v. d. Gaast A, Siersema PD, Steyerberg EW, Kuipers EJ. (2006). "Chemotherapy for metastatic carcinoma of the esophagus." *Cochrane Database Syst Rev.*

Hou J, Lin PS, Chen ZF. (1998). "A study survey of oesophageal cancer in Cixian of Hebei." *Chung Liu Fang Zhi Yan Jiu.* 25: 73-75.

- Hughes SJ, Morse MA, Weghorst CM, Kim H, Watkins PB, Guengerich FP, Orringer MB, Beer DG. (1999). "Cytochromes P450 are expressed in proliferating cells in Barrett's metaplasia." *Neoplasia* 1(2): 145-153.
- Hukkanen J, Pelkonen O, Hakkola J, Raunio H. (2002). "Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung." *Crit Rev Toxicol.* 32(5): 391-411.
- Hulscher JB, v. Sandick JW, de Boer AG, Wijnhoven BP, Tijssen JG, Fockens P, Stalmeier PF, ten Kate FJ, van Dekken H, Obertop H, Tilanus HW, van Lanschot JJ. (2002). "Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the esophagus." *N Engl J Med* 347(21): 1622-1669.
- Husøy T, Syversen T, Jenssen J. (1993). "Comparisons of four in vitro cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements." *Toxicol In Vitro.* 7 (2): 149-154.
- Jernström H, B. E., Rose C, Jönsson PE, Ingvar C. (2009). "CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms in relation to tumour characteristics and early breast cancer related events among 652 breast cancer patients." *Br J Cancer.* 101(11):: 1817-1823.
- Jiang JG, Chen CL, Card JW, Yang S, Chen JX, Fu XN, Ning YG, Xiao X, Zeldin DC, Wang DW. (2005). "Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors." *Cancer Res.* 65(11): 4707-4715.
- Jiang JG, Ning YG, Chen C, Ma D, Liu ZJ, Yang S, Zhou J, Xiao X, Zhang XA, Edin ML, Card JW, Wang J, Zeldin DC, Wang DW. (2007). "Cytochrome p450 epoxygenase promotes human cancer metastasis." *Cancer Res.* 67(14): 6665-6674.
- Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. (2001). "Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer." *Hum Mol Genet* 10(TMA): 657-662.
- Kumagai J, Fujimora T, Takahashi S, Urano T, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Blumberg B, Inoue S. (2007). "Cytochrome P450 2B6 is a growth-inhibitory and prognostic factor for prostate cancer." *Prostate.* 67 (10): 1029-1037.
- Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O. (1999). "Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma." *N Engl J Med.* 340(11): 825-831.

- Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O. (2000). "The role of tobacco, snuff and alcohol use in the aetiology of cancer of the oesophagus and gastric cardia." *Int. J. Cancer* 85: 340-346.
- Lagergren J, Bergström R, Adami HO, Nyrén O. (2000). "Association between medications that relax the lower esophageal sphincter and risk for esophageal adenocarcinoma." *Ann Intern Med.* 133(3): 165-175.
- Lagergren J, Bergström R, Nyrén O. (1999). "Association between Body Mass and Adenocarcinoma of the Esophagus and Gastric Cardia " *Annals of Internal Medicine* 130(11): 883-890.
- Laird AK (1964). "Dynamics of tumor growth." *Br J Cancer.* 13: 490-502.
- Larsson LG, Sandström A, Westling P. (1975). "Relationship of Plummer-Vinson disease to cancer of the upper alimentary tract in Sweden." *Cancer Res.* 35(11): 3308-3316.
- Leclerc J, T. G., Courcot-Ngoubo Ngangue E, Pottier N, Lafitte JJ, Jaillard S, Mensier E, Lhermitte M, Broly F, Lo-Guidice JM. (2010). "Profiling gene expression of whole cytochrome P450 superfamily in human bronchial and peripheral lung tissues: Differential expression in non-small cell lung cancers." *Biochimie.* 92(3):: 292-306.
- Leeuwenburgh I, Haringsma J, Van Dekken H, Scholten P, Siersema PD, Kuipers EJ. (2006). "Long-term risk of oesophagitis, Barrett's oesophagus and oesophageal cancer in achalasia patients." *Scand J Gastroenterol Suppl.* (243): 7-10.
- Lenzini P, Wadelius M, Kimmel S, Anderson JL, Jorgensen AL, Pirmohamed M, Caldwell MD, Limdi N, Burmester JK, Dowd MB, Angchaisuksiri P, Bass AR, Chen J, Eriksson N, Rane A, Lindh JD, Carlquist JF, Horne BD, Grice G, Milligan PE, Eby C, Shin J, Kim H, Kurnik D, Stein CM, McMillin G, Pendleton RC, Berg RL, Deloukas P, Gage BF. (2010). "Integration of genetic, clinical, and INR data to refine warfarin dosing." *Clin Pharmacol Ther.* 87(5): 572-578.
- London SJ, Sullivan-Klose T, Daly AK, Idle JR. (1997). "Lung cancer risk in relation to the CYP2C9 genetic polymorphism among Caucasians in Los Angeles County. ." *Pharmacogenetics.* 7(5): 401-404.
- Malthaner RA, Collin S, Fenlon D, Rhodes S (2006). "Preoperative chemotherapy for resectable thoracic esophageal cancer." *Cochrane Database of Systematic Reviews*(1): Art. No.: CD001556.

- Malthaner RA, Wong RK, Rumble RB, Zuraw L. (2004). "Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis." *BMC* 2:35.
- Marger RS, Marger D. (1993). "Carcinoma of the esophagus and tylosis. A lethal genetic combination." *Cancer* 72(1): 17-19.
- Mariette C, Piessen G, Triboulet JP. (2007). "Therapeutic strategies in oesophageal carcinoma: role of surgery and other modalities." *Lancet Oncol.* 8(6): 545-553.
- Martínez C, G.-M. E., Ladero JM, Sastre J, Garcia-Gamito F, Diaz-Rubio M, Agúndez JA. (2001). "Association of CYP2C9 genotypes leading to high enzyme activity and colorectal cancer risk." *Carcinogenesis.* 22(8): 1323-1326.
- Mathijssen RH, v. Schaik RH. (2006). "Genotyping and phenotyping cytochrome P450: perspectives for cancer treatment." *Eur J Cancer.* 42(2): 141-148.
- Michaelis UR, Fisslthaler B, Barbosa-Sicard E, Falck JR, Fleming I, Busse R. (2005). "Cytochrome P450 epoxygenases 2C8 and 2C9 are implicated in hypoxia-induced endothelial cell migration and angiogenesis." *Journal of Cell Science* 118: 5489-5498.
- Michaelis UR, Fleming I. (2006). "From endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) to angiogenesis: Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and cell signaling." *Pharmacol Ther.* 111(3): 584-595.
- Michaelis UR, Falck JR, Schmidt R, Busse R, Fleming I. (2005). "Cytochrome P450 2C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 25: 321-326.
- Milanes-Yearsley M, Hammond ME, Pajak TF, Cooper JS, Chang C, Griffin T, Nelson D, Laramore G, Pilepich M. (2002). "Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups." *Mod Pathol* 15(12): 1366-73.
- Mirvish SS (1995). "Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC." *Cancer Lett* 97 (2): 17-48.

- Mosmann T. (1983). "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2): 55-63.
- Nebert DW, D. T. (2006). "The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis." *Nat Rev Cancer*. 6(12):: 947-960.
- Nebert DW, Russel DW. (2002). "Clinical importance of the cytochromes P450." *Lancet*. 360(9340): 1155-1162.
- Nelson DR (2009). "The Cytochrome P450 Homepage." *Human Genomics* 4(1): 59-65.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. (1996). "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." *Pharmacogenetics*. 6(1): 1-42.
- Nithipatikom K, B. D., Tang AT, Manthathi VL, Falck JR, Williams CL, Campbell WB. (2010). "Inhibition of carcinoma cell motility by epoxyeicosatrienoic acid (EET) antagonists." *Cancer Sci*. 101(12): 2629-2636.
- Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Süess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Rist M, Anabitarte M, Hering F, Hardmeier T, Schoenenberger AJ, Flury R, Jäger P, Fehr JL, Schraml P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G. (2001). "Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade." *J Pathol* 194(3): 349-57.
- Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. (2001). "Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research." *Int J Cancer* 94(1): 1-5.
- O'Connor JB, Falk GW, Richter JE. (1999). "The incidence of adenocarcinoma and dysplasia in Barrett's esophagus: report on the Cleveland Clinic Barrett's Esophagus Registry." *Am J Gastroenterol*. 94(8): 2037-2047.
- Omura T, S. R. (1964). "The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. ." *J Biol Chem*. 239: 2370-2378.
- Ortiz de Montellano PR (2010). "Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes." *Chem Rev*. 110(2): 932-948.

- Ozawa S, Schoket B, McDaniel LP, Tang YM, Ambrosone CB, Kostic S, Vincze I, Kadlubar FF. (1999). "Analyses of bronchial bulky DNA adduct levels and CYP2C9, GSTP1 and NQO1 genotypes in a Hungarian study population with pulmonary diseases." *Carcinogenesis* 20(6): 991-995.
- Pandeya N, Williams G, Green AC, Webb PM, Whiteman DC. (2009). "Alcohol Consumption and the Risks of Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus." *Gastroenterology* 136(4): 1215-1224.
- Panigrahy D, Kaipainen A, Greene ER, Huang S. (2010). "Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer." *Cancer Metastasis Rev.* 29(4): 723-735.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). "Global Cancer Statistics, 2002." *CA Cancer J Clin* 55: 74-108.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. (1999). "Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990." *International Journal of Cancer* 80(6): 827-841.
- Pastina I, Giovannetti E, Chioni A, Sissung TM, Crea F, Orlandini C, Price DK, Cianci C, Figg WD, Ricci S, Danesi R. (2010). "Cytochrome 450 1B1 (CYP1B1) polymorphisms associated with response to docetaxel in Castration-Resistant Prostate Cancer (CRPC) patients." *BMC Cancer.* 27(10): 511.
- Patterson LH, Murray GI. (2002). "Tumour cytochrome P450 and drug activation." *Curr Pharm Des.* 8(15): 1335-1347.
- Pera M, Cameron AJ, Trastek VF, Carpenter HA, Zinsmeister AR. (1993). "Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction." *Gastroenterology* 104(2): 510-513.
- Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, Reynolds JV, O'Byrne K, Nie D, Honn KV. (2007). "Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival." *Cancer Metastasis Rev.* 26(3-4): 503-524.
- Pohl H, Welch G. (2005). "The Role of Overdiagnosis and Reclassification in the Marked Increase of Esophageal Adenocarcinoma Incidence " *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 97(2): 142-146.

- Purnapatre K, Khattar SK, Saini KS. (2008). "Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs." *Cancer Lett.* 259(1): 1-15.
- Reid AH, Attard G, Barrie E, de Bono JS. (2008). "CYP17 inhibition as a hormonal strategy for prostate cancer." *Nat Clin Pract Urol.* 5(11): 610-620.
- Remmele W, Stegner HE. (1987). "Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue." *Pathologie.* 8 (3): 138-140.
- Remmele W, Schicketanz KH. (1993). "Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS)." *Pathol Res Pract.* 189 (8): 862-866.
- Riemsma R, F. C., Kessels A, Lycopoulos K, Amonkar MM, Rea DW, Kleijnen J. (2010). "Systematic review of aromatase inhibitors in the first-line treatment for hormone sensitive advanced or metastatic breast cancer." *Breast Cancer Res Treat.* 123(1): : 9-24.
- Risk JM, Mills HS, Garde J, Dunn JR, Evans KE, Hollstein M, Field JK. (1999). "The tylosis esophageal cancer (TOC) locus: more than just a familial cancer gene." *Dis Esophagus.* 12(3): 173-176.
- Robert Koch Institut (2008). "Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends." 6. überarbeitete Auflage.
- Schauer M, Knoefel WT (2010). "Neoadjuvant chemotherapy in Barrett's carcinoma - prognosis and response prediction." *Anticancer Res.* 30(4):: 1065-1070.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. (1994). "Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians." *J Pharmacol Exp Ther.* 270(1): 414-423.
- Sideras K, Ingle JN, Ames MM, Loprinzi CL, Mrazek DP, Black JL, Weinshilboum RM, Hawse JR, Spelsberg TC, Goetz MP. (2010). "Coprescription of tamoxifen and medications that inhibit CYP2D6." *J Clin Oncol.* 28(16): 2768-2776.
- Siewert JR, Ott K. (2007). "Are squamous and adenocarcinomas of the esophagus the same disease?" *Semin Radiat Oncol.* 17(1): 38-44.

- Siewert JR, Stein HJ, Feith M, Bruecher BL, Bartels H, Fink U. (2001). "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.* 234(3): 360-369.
- Slater MS, Holland J, Faigel DO, Sheppard BC, Deveney CW. (2001). "Does neoadjuvant chemoradiation downstage esophageal carcinoma?" *Am J Surg.* 181(5): 440-444.
- Spector AA (2009). "Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway." *J Lipid Res.* 50: 52-56.
- Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. (2004). "Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function." *Prog Lipid Res.* 43(1): 55-90.
- Streitz JM Jr, Ellis FH Jr, Gibb SP, Heatley GM. (1995). "Achalasia and squamous cell carcinoma of the esophagus: analysis of 241 patients." *Ann Thorac Surg.* 59(6): 1604-1609.
- Sur M, Cooper K. (1998). "The role of the human papilloma virus in esophageal cancer." *Pathology.* 30(4): 348-354.
- Swisher SG, Erasmus J, Maish M, Correa AM, Macapinlac H, Ajani JA, Cox JD, Komaki RR, Hong D, Lee HK, Putnam JB Jr, Rice DC, Smythe WR, Thai L, Vaporciyan AA, Walsh GL, Wu TT, Roth JA. (2004). "2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography imaging is predictive of pathologic response and survival after preoperative chemoradiation in patients with esophageal carcinoma." *Cancer* 101(8): 177-1785.
- Syrjänen KJ (2002). "HPV infections and oesophageal cancer." *J Clin Pathol* 55(10): 721-728.
- Terry P, Lagergren J, Hansen H, Wolk A, Nyrén O. (2001). "Fruit and vegetable consumption in the prevention of oesophageal and cardia cancers." *Eur J Cancer Prev.* 10(4): 365-369.
- Thompson SK, Ruzskiewicz AR, Jamieson GG, Esterman A, Watson DI, Wijnhoven BP, Lamb PJ, Devitt PG. (2008). "Improving the accuracy of TNM staging in esophageal cancer: a pathological review of resected specimens." *Ann Surg Oncol.* 15(12): 3447-3458.

- Tranah GJ, Chan AT, Giovannucci E, Ma J, Fuchs C, Hunter DJ. (2005). "Epoxide hydrolase and CYP2C9 polymorphisms, cigarette smoking, and risk of colorectal carcinoma in the Nurses' Health Study and the Physicians' Health Study. ." *Mol Carcinog* 44 (1): 21-30.
- Urschel JD, Vasan H, Blewett CJ. (2002). "A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemotherapy and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer." *Am J Surg.* 183(3): 274-9.
- Urschel JD, Vasan H. (2003). "A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemoradiation and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer." *Am J Surg.* 185(6): 538-43.
- Watts J McK. (1961). "The Importance of Plummer-Vinson Syndrome in the aetiology of carcinoma of the upper gastro-intestinal tract." *Postgrad. Med. J.* 37: 523-533.
- Wijnen PA, Op den Buijsch RA, Drent M, Kuijpers PM, Neef C, Bast A, Bekers O, Koek GH. (2007). "The prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms." *Aliment Pharmacol Ther* 26: 211-219.
- Wijnhoven BP, Louwman MW, Tilanus HW, Coebergh JW. (2002). "Increased incidence of adenocarcinomas at the gastro-oesophageal junction in Dutch males since the 1990s." *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 14(2): 115-122.
- Winters C Jr, Spurling TJ, Chobanian SJ, Curtis DJ, Esposito RL, Hacker JF 3rd, Johnson DA, Cruess DF, Cotelingam JD, Gurney MS, et al. (1987). "Barrett's esophagus. A prevalent, occult complication of gastroesophageal reflux disease." *Gastroenterology* 92(1): 118-124.
- Wu AH, Tseng CC, Bernstein L. (2003). "Hiatal Hernia, Reflux Symptoms, Body Size, and Risk of Esophageal and Gastric Adenocarcinoma." *Cancer* 98(5): 940-948.
- Wu AH, Wan P, Bernstein L. (2001). "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* 12(8): 721-732.
- Wu Y, Rosenberg JE, Taplin ME. (2011). "Novel agents and new therapeutics in castration-resistant prostate cancer." *Curr Opin Oncol.* [Epub ahead of print].

- Yang CX, Matsuo K, Wang ZM, Tajima K. (2005). "Phase I/II enzyme gene polymorphisms and esophageal cancer risk: A meta-analysis of the literature." *World J Gastroenterol* 11(17): 2531-2538.
- Zagorac D, Jakovcevic D, Gebremedhin D, Harder DR. (2008). "Antiangiogenic effect of inhibitors of cytochrome P450 on rats with glioblastoma multiforme." *J Cereb Blood Flow Metab.* 28(8):: 1431-1439.
- Zhang L, Tu J, Yu ZL, Wu YD, Xu CM, Zhang ST. (2009). "Effects of the inhibition of cyclooxygenase-2 on human esophageal cancer cells: inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis." *Pathol Oncol Res* 16(1): 39-45.
- Zhi H, Wang L, Zhang J, Zhou C, Ding F, Luo A, Wu M, Zhan Q, Liu Z. (2006). "Significance of COX-2 expression in human esophageal squamous cell carcinoma." *Carcinogenesis.* 27 (6): 1214-1221.
- Zhou SF, Zhou ZW, Yang LP, Cai JP. (2009). "Substrates, Inducers, Inhibitors and Structure-Activity Relationships of Human Cytochrome P450 2C9 and Implications in Drug Development." *Curr Med Chem.* 16(27): 3480-3675.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

<b>7-AAD</b>	7-Aminoactinomycin
<b>Akt</b>	Proteinkinase B
<b>BrdU</b>	Bromodeoxyuridine
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>C<sub>t</sub></b>	Cycle Threshold
<b>Cy3</b>	Cyanine
<b>CYP</b>	Cytochrom P450
<b>CYPs</b>	Cytochrom P450 Enzyme
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<b>DPBS</b>	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
<b>EAC</b>	Adenokarzinom des Ösophagus
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EETs</b>	Epoxyeicosatriensäuren
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>ESCC</b>	Plattenepithelkarzinom des Ösophagus
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FFPE</b>	in Paraffin eingebettet
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>IRS</b>	Immunoreaktive Score
<b>Ki67 LI</b>	Ki67 Proliferationsindex
<b>LOX</b>	Lipoxygenase
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>mRNA</b>	messenger Ribonukleinsäure
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<b>NADH</b>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
<b>NADPH</b>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
<b>NEM</b>	ösophageale Normalmukosa
<b>nm</b>	nanometer
<b>p</b>	Signifikanzwert
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PET</b>	Positronen- Emissions- Tomographie
<b>PFA</b>	Perfluoralkoxylalkan
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinasen

<b>POL</b>	Polymerase
<b>r</b>	Korrelations-Koeffizient
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	revolutions per minute
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>SDS</b>	Sodium-Dodecylsulfat
<b>Taq</b>	Thermus aquaticus
<b>TMA</b>	Tissue Mikro Array
<b>UICC</b>	Union International Contre le Cancer

## 10. Publikationen

### Originalarbeiten

Schmelzle M<sup>1</sup>, **Dizdar L**<sup>1</sup>, Matthaei H, Baldus SE, Wolters J, Lindenlauf N, Bruns I, Cadeddu RP, Kröpil F, Topp SA, Schulte am Esch J 2nd, Eisenberger CF, Knoefel WT, Stoecklein NH. (2011). "Esophageal cancer proliferation is mediated by cytochrome P450 2C9 (CYP2C9)." Prostaglandins Other Lipid Mediat. 94(1-2): 25-33.

<sup>1</sup> Beide Autoren hatten gleichen Anteil an der Arbeit.

Schmelzle M, Alldinger I, Matthaei H, Aydin F, Wallert I, Eisenberger CF, Schulte Am Esch J 2nd, **Dizdar L**, Topp SA, Yang Q, Knoefel WT. (2010). "Long-term vacuum-assisted closure in open abdomen due to secondary peritonitis: a retrospective evaluation of a selected group of patients." Dig Surg. 27(4): 272-8.

### Abstracts

**Dizdar L**, Schmelzle M, Wolters J, Lindenlauf N, Baldus SE, Topp SA, Schulte am Esch J 2nd, Eisenberger CF, Stoecklein NH, Knoefel WT. (2010). "Esophageal cancer proliferation is mediated by cytochrome P450 2C9 (CYP2C9)." European journal of cancer. Supplement. 8 (5): 134.

Schmelzle M, **Dizdar L**, Matthaei H, Baldus SE, Knoefel WT, Stoecklein NH. (2009). " Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) Expression in Esophageal Cancer- a Prognostic Marker and Potential Therapeutic Target." Gastroenterology. Supplement. 136 (5): A-751.

## 11. Curriculum Vitae

### Persönliche Angaben

Name: Dizdar  
Vorname: Levent  
Geburtsdatum: 19.05.1983  
Geburtsort: Daun  
Familienstand: ledig

### Schulische Ausbildung

1989-1993 Grundschole, Daun  
1993-2002 Thomas Morus Gymnasium Daun  
Juni 2002 Abitur

### Universitäre Ausbildung

10/2003-05/2010 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Studium der Humanmedizin  
09/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
08/2008-07/2009 Praktisches Jahr  
06/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Berufliche Weiterbildung

06/2011 Erteilung der Approbation als Arzt  
Ab 15.09.2011 Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und  
Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf

## **12. Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keinem anderen Institut eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf den 06.06.2011

Levent Dizdar

### **13. Danksagung**

Danken möchte ich zunächst Prof. Dr. med. W. T. Knoefel dafür, dass ich meine Dissertation in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Kinderchirurgie durchführen konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. N. Stoecklein für die Überlassung des Themas, die großartige Betreuung sowie seine guten Ideen und Vorschläge die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Des weiteren danken möchte ich Dr. med. M. Schmelzle für die sehr gute Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und Auswertung der Daten sowie die großartige Zusammenarbeit bei der Erstellung der Publikation.

Allen anderen Mitgliedern des chirurgischen Forschungslabors danke ich ganz herzlich für ihre Hilfsbereitschaft, technische Unterstützung und eine tolle Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders erwähnt sei an dieser Stelle Frau Imke Hoffmann.

Meinen Eltern danke ich für ihre stetige Unterstützung ohne die das Studium der Humanmedizin und die Durchführung der Dissertation in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Besonders danken möchte ich auch meiner Freundin Anca die mich immer unterstützt hat. Dank ihr habe ich den nötigen Abstand zur Arbeit gefunden, der ein Vorankommen oft erst ermöglichte.