

**Aus dem Institut für Pathologie**

**Direktor: Prof. Dr. H. E. Gabbert**

**Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53* im Verlauf der Metaplasie-  
Dysplasie-Karzinom Sequenz des Barrett-Ösophagus**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der**

**Medizin/Zahnmedizin/Gesundheitswissenschaften und**

**Sozialmedizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität**

**Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Özcan Iskender**

**2003**

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der**

**Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**gez.: Univ.-Prof.Dr.med.dent. Wolfgang H.-M. Raab**

**Dekan**

**Referent : Priv.-Doz.Dr. Sarbia**

**Korreferent : Priv.-Doz.Dr. Franke**

## Abkürzungen

<b>APC</b>	Adenomatosis polyposis coli
<b>BÖ</b>	Barrett-Ösophagus
<b>CA</b>	Karzinom
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HGD</b>	Hochgradige Dysplasie
<b>LOH</b>	Loss of heterozygosity
<b>NGD</b>	Niedriggradige Dysplasie
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>SE</b>	Spezialisiertes Epithel (metaplastische Barrettmukosa )
<b>SSCP</b>	single-stranded conformation polymorphism
<b>PAA</b>	Polyacrylamid
<b>Taq</b>	DNA-Polymerase d. Eubacteriums Thermus aquatias
<b>dNTPs</b>	<b>d</b> esoxyribonukleotid <b>tr</b> iphosphate, DNA-Basen zusammengesetzt aus <b>d</b> ATP, <b>d</b> CTP, <b>d</b> GTP und <b>d</b> TTP, <b>A</b> =Adenosin, <b>C</b> =Cytosin, <b>G</b> =Guanin, <b>T</b> =Thymin
<b>TBE</b>	Tris/Börsäure/EDTA Puffer

<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	
1.1 Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms	1
1.2 Pathogenese des Barrett-Ösophagus	2
1.3 Diagnose des Barrett-Ösophagus	3
1.4 Identifikation von Barrett-Ösophagus-Patienten mit einem erhöhten Risiko zur Karzinomentstehung	4
1.5 Dysplasie als histologischer Risikoparameter für die Karzinomentstehung	5
1.6 Alternative Risikoparameter	7
<b>2. Aufgabenstellung</b>	<b>11</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	
3.1 Untersuchungsgut	12
3.2 Histologische Untersuchungen	12
3.3 Molekulargenetische Untersuchungen	15
3.3.1 DNA-Präparation	15
3.3.2 PCR	16
3.3.3 Agarosegel Elektrophorese	18
3.3.4 Polyacrylamidgel Elektrophorese	20
3.3.5 Silberfärbung des Polyacrylamidgels	23
3.3.6 Auswertung des Polyacrylamidgels	24
3.4 Chemikalien	27
3.5 Puffer und Lösungen	28
3.6 Färbelösungen für Polyacrylamidgele	29
3.7 Enzyme	29
3.8 PCR Primer	30

<b>3.9</b>	<b>DNA-Längenstandards</b>	<b>30</b>
<b>3.10</b>	<b>Geräte</b>	<b>31</b>
<b>3.11</b>	<b>Patienten- und Tumorcharakteristika</b>	<b>32</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
<b>4.1</b>	<b>Ergebnisse der SSCP-Analyse der Exone 5, 6, 7 und 8</b>	<b>33</b>
<b>4.2</b>	<b>Auswertung der SSCP-Analyse der Exone 5, 6, 7 und 8</b>	<b>36</b>
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	
<b>5.1</b>	<b><i>p53</i> Tumorsuppressorgen</b>	<b>39</b>
<b>5.2</b>	<b>Die Bedeutung von Mutationsanalysen im p53-Gen bei Barrett-Ösophagus Patienten</b>	<b>42</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>47</b>

# Einleitung

## 1.1 Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms

Das Ösophaguskarzinom ist weltweit der 9. häufigste maligne Tumor (Parkin *et al.*, 1993). Die Häufigkeit der Neuerkrankungen pro Jahr liegt zwischen 2,5 bis 6 pro 100.000 Männer und 1,5 bis 2,5 pro 100.000 Frauen weltweit. Bezüglich der Inzidenz sind jedoch deutliche regionale Unterschiede nachweisbar. Am häufigsten ist das Ösophaguskarzinom in Entwicklungsländern wie z.B. in China, Iran, Kasachstan, Singapur, Südamerika und Südafrika, während es in Europa deutlich seltener auftritt. So ist das Ösophaguskarzinom im Norden Chinas mit einer Häufigkeit von über 100 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr die häufigste Tumorart dieser Region (Hamilton *et al.*, 2000). Auch in manchen Teilen Frankreichs kommt diese Erkrankung mit mehr als 16 Neuerkrankungen jährlich je 100.000 Einwohner überdurchschnittlich häufig vor. In der Bundesrepublik Deutschland erkranken jedes Jahr nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts Berlin etwa 4100 Menschen neu an Speiseröhrenkrebs, davon 3200 Männer. Bezogen auf die absolute Zahl der Karzinomerkrankungen zählt das Ösophaguskarzinom damit zu den vergleichsweise seltenen Tumoren. Dennoch macht das Ösophaguskarzinom etwa 9,5 % der malignen Tumoren des Verdauungstraktes in der Bundesrepublik Deutschland aus (Bundesamt für Statistik, 1998).

Die beiden histologischen Haupttypen des Ösophaguskarzinoms sind das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom. Weltweit gesehen ist das Plattenepithelkarzinom etwa 5 bis 10 mal so häufig wie das Adenokarzinom, die Inzidenz des Adenokarzinoms hat jedoch insbesondere in den USA und in Westeuropa in den letzten drei Jahrzehnten deutlich zugenommen. So konnten

beispielsweise Blot *et al.* (1991) in einer Untersuchung zur Häufigkeit des Ösophaguskarzinoms in den USA für den Zeitraum zwischen 1976 und 1987 eine 100%-ige Zunahme der Inzidenz des Adenokarzinoms im Ösophagus zeigen, sodaß in einigen Zentren das Adenokarzinom bereits genauso häufig ist wie das Plattenepithelkarzinom (Devesa *et al.*, 1998). Die Ursachen für die deutliche Häufigkeitszunahme des Adenokarzinoms bei gleichbleibender Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms sind nicht bekannt. Allerdings kann als gesichert gelten, dass die überwiegende Mehrzahl der Adenokarzinome auf dem Boden eines Barrett-Ösophagus entstehen, der definiert ist durch den teilweisen Ersatz des normalen, ösophagealen Plattenepithels durch ein metaplastisches Zylinderepithel, welches als Barrett-Schleimhaut bezeichnet wird.

## 1.2 Pathogenese des Barrett-Ösophagus

Bei der überwiegenden Mehrzahl der Barrett-Ösophagi handelt es sich um eine erworbene Veränderung. Als Hauptursache für die Entstehung des Barrett-Ösophagus wird die gastroösophageale Refluxkrankheit angesehen. So führt ein schwerer und chronischer gastroösophagealer Reflux zu einer chronischen Ösophagitis mit nachfolgender Destruktion und Desquamation des ösophagealen Plattenepithels. Bei etwa 10% der Patienten mit einer gastroösophagealen Refluxkrankheit kommt es zu einem metaplastischen Ersatz der refluxbedingten Epitheldefekte durch ein vermehrt säureresistentes Zylinderepithel. Als Ausgangspunkt für diese metaplastische Regeneration wird zum einen das Einwachsen benachbarter Kardiaschleimhaut in den Ösophagus, zum anderen eine Um-differenzierung von ösophagealen Stammzellen diskutiert (Jankowski *et al.*, 2000) .

Neben dem sauren Reflux aus dem Magen wird auch dem alkalischen Reflux aus dem Dünndarm eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Barrett-Ösophagus

zuerkannt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass auch Patienten nach einer Gastrektomie und folglich ohne Einwirkung eines sauren Refluxes einen Barrett-Ösophagus entwickeln können (Meyer *et al.*, 1979, Kuster *et al.*, 1989, Tada *et al.*, 1990). Im Zusammenhang mit der pathogenetischen Rolle des alkalischen Refluxes wird insbesondere der Bilirubinreflux als ein wichtiger Faktor für die Entstehung des Barrett-Ösophagus angesehen.

### 1.3 Diagnose des Barrett-Ösophagus

Die Diagnose des BÖ erfolgt gewöhnlich endoskopisch, wobei sich das normale Plattenepithel des Ösophagus grauweiß darstellt und von der rötlich-lachsfarbenen Barrett-Schleimhaut abgegrenzt werden kann (Bozymski 1985). Obligat für die Diagnosesicherung ist jedoch die Entnahme von zahlreichen Biopsien für die nachfolgende histologische Untersuchung. Das histologische Spektrum der Barrett-Schleimhaut umfasst insgesamt drei Typen metaplastischer Schleimhaut (Paull *et al.*, 1976).

1) Spezialisiertes Zylinderepithel: Das spezialisierte Zylinderepithel ist der häufigste Typ der Barrett-Mukosa und die für den BÖ charakteristische Form der Metaplasie (Spechler *et al.*, 1996). Es ähnelt in seiner Architektur der intestinalen Mukosa bestehend aus Zylinderzellen, Becherzellen, einer villiformen Oberfläche und Ausbildung von Krypten. Allerdings ist das spezialisierte Epithel als inkomplette Form der intestinalen Metaplasie anzusehen, da keine Absorptivzellen nachweisbar sind (Spechler *et al.*, 1986, Crooks *et al.*, 1996).

2) Der junctionale Typ: Der junctionale Schleimhauttyp ist der Magenschleimhaut im Kardiabereich sehr ähnlich. An der Oberfläche sind Foveolarzellen, in der Tiefe muköse Drüsen, aber keine Paneth-Zellen, Becherzellen, Haupt-, Parietalzellen und enteroendokrinen Zellen nachweisbar.



3) Der Magenfundus-Typ: Dieser Typ zeigt Ähnlichkeiten mit der Schleimhaut im Fundus und Corpus des Magens. Das Drüsenlager ist u. a. aus Parietalzellen und Hauptzellen aufgebaut, im Vergleich zur Korpusschleimhaut des Magens sind die Drüsen jedoch verkürzt und weniger dicht stehend.

#### **1.4 Identifikation von Barrett-Ösophagus Patienten mit einem erhöhten Risiko zur Karzinomentstehung**

Von besonderem medizinischem Interesse bei der Betreuung von Patienten mit einem BÖ ist die Risikoabschätzung für die Entstehung eines Ösophaguskarzinoms. Da der BÖ selbst keine Symptome verursacht, suchen die Patienten zumeist wegen der Symptome der gastroösophagealen Refluxkrankheit, wie z.B. Sodbrennen und Regurgitation, den Arzt auf. Allerdings zeigen 40% der Patienten mit BÖ keine Symptome des gastroösophagealen Refluxes, der BÖ bleibt daher u.U. für viele Jahre unerkant (Sampliner *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wird bei der Erstdiagnose des BÖ in etwa 10% der Fälle gleichzeitig die Diagnose eines ösophagealen Adenokarzinoms gestellt (Reid *et al.*, 1992, Weinstein *et al.*, 1987, Haggitt *et al.*, 1992, Crooks *et al.*, 1996, Streitz *et al.*, 1998).



**Abb. 1 :** Fortgeschrittenes Adenokarzinom des distalen Ösophagus, entstanden auf dem Boden eines Barrett-Ösophagus (Formalin-fixiertes Operationspräparat)

Aber auch bei den Patienten mit einem zum Zeitpunkt der Erstdiagnose unkomplizierten BÖ ist ein im Vergleich zur Gesamtbevölkerung deutlich erhöhtes Risiko zur Entstehung eines Ösophaguskarzinoms als gesichert anzusehen. Mit einer Rate zwischen 2,3 und 19,2 in 1000 Patientenjahren neu auftretenden Karzinomen besteht bei Patienten mit einem Barrett-Ösophagus ein im Vergleich zur Normalbevölkerung etwa 30 bis 50-fach erhöhtes Risiko, an einem Ösophaguskarzinom zu erkranken (Haggitt *et al.*, 1992, Wang 1994, Crooks *et al.*, 1996).

Aus diesem Grund wird empfohlen, Patienten mit einem BÖ in zweijährigen Abständen einer regelmäßigen endoskopisch-bioptischen Kontrolle zu unterziehen, um eine Tumorentstehung in einem möglichst frühen Stadium zu entdecken (Wang *et al.*, 1994, Crooks *et al.*, 1996). Dass eine frühzeitige Tumordiagnose durch regelmäßige endoskopisch-bioptische Kontrollen erreichbar ist, konnte zwischenzeitlich durch prospektive Untersuchungen gezeigt werden (Streitz *et al.*, 1993, Wright *et al.*, 1996).

Andererseits wird nur ein relativ kleiner Teil der Patienten mit einem BÖ im Verlauf der Erkrankung ein Ösophaguskarzinom entwickeln, weshalb der finanzielle Aufwand zur Entdeckung von Barrett-Karzinomen im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen nicht unerheblich ist. So wurden die Kosten für ein solches Vorsorgeprogramm mit etwa 30.000 bis 45.000 Euro pro entdeckten Tumor berechnet (Achkar *et al.*, 1988, Wright *et al.*, 1996, Streit *et al.*, 1998). Obwohl zwischenzeitlich entsprechende Empfehlungen durch internistische Fachgesellschaften vorliegen (Sampliner *et al.*, 1998), hat sich das regelmäßige Screening von allen Patienten mit einem BÖ in der Praxis, insbesondere aus Kostengründen, bislang nicht allgemein durchgesetzt.

## **1.5 Dysplasie als histologischer Risikoparameter für eine Karzinomentstehung**

Es erscheint daher sinnvoll, ein regelmäßiges endoskopisch-bioptisches Screening zumindest bei Barrett-Ösophaguspatienten mit einem erhöhtem Risiko zur Karzinomentstehung durchzuführen (Crooks *et al.*, 1996). Als einziger derzeit etablierter Marker für die Identifikation von Hochrisikopatienten ist der histologische Nachweis von Dysplasien in einem BÖ anzusehen (Menke-Pluymers *et al.*, 1994, Hamilton *et al.*, 2000). Dysplasien sind präkanzeröse epitheliale Veränderungen, die durch eine Kombination von zytologischen und strukturellen Veränderungen gekennzeichnet sind (Lewin *et al.*, 1995, Hamilton *et al.*, 2000). Die Graduierung von Dysplasien im BÖ unterscheidet in Analogie zur Dysplasiediagnostik im Rahmen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Riddell *et al.*, 1983) die Kategorien hochgradige Dysplasie, niedriggradige Dysplasie und fragliche Dysplasie (Lewin *et al.*, 1995). Die Kategorie fragliche Dysplasie trägt der Tatsache Rechnung, dass die eindeutige histologische Abgrenzung zwischen dysplastischen Epithelveränderungen und reaktiven, nicht-dysplastischen Epithelveränderungen, insbesondere bei

schwerer Entzündung oder im Bereich von Erosionen oder Ulzerationen u.U. nicht möglich ist.

Als Evidenz für das besondere Risikopotential von Dysplasien für die Entstehung von Adenokarzinomen werden verschiedene Beobachtungen gewertet. Zum einen wurden in retrospektiven Untersuchungen Dysplasien in einem hohen Prozentsatz in Nachbarschaft von invasiven Adenokarzinomen gefunden (Naef *et al.*, 1975, Haggitt *et al.*, 1978, Reid *et al.*, 1988, Reid *et al.*, 1991). Weitere wichtige Hinweise auf die Bedeutung von Dysplasien als Marker für ein erhöhtes Karzinomrisiko liefern prospektive Verlaufsstudien. So konnte beispielsweise in einer Studie an 56 Patienten mit einem BÖ gezeigt werden, dass in einem mittleren Beobachtungszeitraum von 35 Monaten (6 – 108 Monate) 2 von 4 Patienten mit hochgradiger Dysplasie, aber nur ein Patient von den verbleibenden 52 Barrett-Ösophagus Patienten ohne Dysplasien im weiteren Verlauf ein invasives Karzinom entwickelt haben (Robertson *et al.*, 1988). In einer weiteren prospektiven Studie an 62 Patienten fanden Reid *et al.* (1992) bei 25% der Patienten mit initial fraglicher bzw. niedriggradiger Dysplasie einen Übergang in eine hochgradige Dysplasie und bei 66,6% der Patienten mit initial hochgradiger Dysplasie einen Übergang in ein Adenokarzinom. Vor dem Hintergrund dieser Befunde wird angenommen, dass die Mehrzahl der Karzinome im BÖ im Verlauf einer Metaplasie-Dysplasie-Karzinomsequenz entsteht (Haggitt *et al.*, 1994). Auf der anderen Seite muss betont werden, dass der zeitliche Abstand vom Auftreten einer Dysplasie bis zum Übergang in ein Karzinom sehr variabel ist und dass Dysplasien sich nicht in jedem Fall in ein Karzinom weiterentwickeln bzw. dass auch eine Regression von Dysplasien möglich ist (Weston *et al.*, 2000).

Ein wesentliches Problem bei der Bewertung von Dysplasien als Marker für ein erhöhtes Karzinomrisiko ist jedoch die eindeutige histologische Abgrenzung von

nicht-dysplastischen Epithelveränderungen, die im Rahmen einer Regeneration und einer schweren Entzündung auftreten können. So ergab sich in einer Untersuchung eine nur etwa 70%ige Übereinstimmung zwischen verschiedenen auf diesem Gebiet erfahrenen Pathologen bei der Frage, ob eine Barrett-Schleimhautbiopsie als dysplastisch oder als nicht dysplastisch zu klassifizieren sei (Montgomery *et al.*, 2001). Auch bei der histologischen Abgrenzung zwischen hochgradiger Dysplasie und nicht-dysplastischer Barrett-Schleimhaut bzw. niedriggradiger Dysplasie konnte nur eine 86%ige Übereinstimmung zwischen verschiedenen Pathologen festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich bei dieser Fragestellung eine nur 88%ige intraindividuelle Reproduzierbarkeit.

## **1.6 Alternative Risikoparameter**

### **1.6.1 DNA-Aneuploidie**

Die bislang am häufigsten untersuchte Methode zur Objektivierung eines erhöhten Karzinomrisikos im BÖ ist die DNA-Zytometrie, die eine Abweichung vom normalen DNA-Gehalt in Zellen, die sog. Aneuploidie, nachweisen kann (Friedlander *et al.*, 1984, O'Hara *et al.*, 1984). Dabei konnte gezeigt werden, dass Barrett-Karzinome und dysplastische Gewebe in einem hohen Prozentsatz Aneuploidien aufweisen. So fanden Reid *et al.* (1987) bei 7 von 7 Patienten mit einem Barrett-Karzinom und bei 2 von 4 Patienten mit Dysplasien eine Aneuploidie. In einer nachfolgenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einem BÖ der Nachweis von aneuploiden Zellen mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Barrett-Karzinoms einhergeht. So entwickelten 9 von 13 Patienten mit Aneuploidien in der DNA-Zytometrie in einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 34 Monaten eine hochgradige Dysplasie oder ein Adenokarzinom. Dagegen ergab sich

in einem Kontrollkollektiv von 49 Patienten mit einem BÖ ohne DNA-Aneuploidie im weiteren Verlauf in keinem Fall eine Dysplasie oder ein Karzinom (Reid *et al.*, 1992).

### **1.6.2 Inaktivierung des *p53* Tumorsuppressorgens**

Die DNA-Aneuploidie ist jedoch ein genetisches Ereignis, das in der Tumorphysion zumeist relativ spät und nur bei einem Teil der Fälle auftritt (Garewal *et al.*, 1991). Aus diesem Grund hat sich die Forschung der letzten Jahre auf die Untersuchung spezifischer genetischer Veränderungen konzentriert, die zu einem möglichst frühen Zeitpunkt in der Metaplasie-Dysplasie-Karzinomsequenz auftreten (Van Laethem *et al.*, 1995). In diesem Zusammenhang hat das Tumorsuppressorgen *p53* bislang das größte Interesse erregt. Mutationen im *p53* Gen gehören zu den häufigsten Veränderungen in malignen Tumoren überhaupt (Harris *et al.*, 1993) und beim Barrett-Karzinom wurden *p53* Mutationen in etwa 50% der Fälle gefunden (Ireland *et al.*, 1997). Dabei ergab sich, dass Mutationen fast ausschließlich in den Exonen 5, 6, 7, und 8 des *p53* Gens nachweisbar waren. Bisherige Untersuchungen legen darüber hinaus nahe, dass Mutationen im *p53* Gen bzw. eine dadurch bedingte Akkumulation des *p53* Proteins früh in der Sequenz von niedriggradiger Dysplasie zu hochgradiger Dysplasie und Adenokarzinom im Barrett-Ösophagus auftreten (Casson *et al.*, 1991, Casson *et al.*, 1994, Hamelin *et al.*, 1994, Neshat *et al.*, 1994, Schneider *et al.*, 1994). So konnten beispielsweise Jones *et al.* (1994) bei der immunhistochemischen Untersuchung von Biopsien aus Barrett-Ösophagi eine Expression vom *p53* Protein in 10% der Patienten mit einem BÖ ohne Dysplasien, in 60% mit niedriggradigen Dysplasien, in 100% mit hochgradigen Dysplasien und in 70% mit Adenokarzinomen nachweisen. Mutationen im *p53* Gen konnten Hamelin *et al.* (1994) in 15 von insgesamt 17 Barrett-Karzinomen und in 3 von 5 hochgradigen Dysplasien aus den Randbereichen der Tumoren nachweisen. In einer weiteren

Studie an 98 Patienten mit einem BÖ fanden Schneider *et al.*, (1996) Mutationen im *p53* Gen in 23 von 50 Adenokarzinomen (46%), in einem von drei Fällen mit hochgradiger Dysplasie (33,3%), aber in keinem der Fälle mit nicht-dysplastischer Barrett-Schleimhaut (n = 32) oder niedriggradigen Dysplasien (n = 13).

Bei der Interpretation der bisherigen Untersuchungsergebnisse zu Mutation des *p53*-Genes im Barrett-Karzinom bzw. dessen Vorläuferveränderungen sind verschiedene Punkte zu berücksichtigen. Zum einen ist anzumerken, dass alle hier angeführten Untersuchungen auf relativ kleinen Patientenkollektiven beruhen, sodass die Repräsentativität des Untersuchungsmaterials bislang mit Fragezeichen versehen werden muss. Weiterhin ist zu beachten, dass die Patientenkollektive in den angeführten Untersuchungen aus sehr unterschiedlichen Ländern und Kulturen stammen. In diesem Zusammenhang ist es zumindest denkbar, dass Unterschiede der in den verschiedenen Ländern der Karzinogenese zugrunde liegenden Noxen, zu Unterschieden bei den an der Tumorentstehung beteiligten Genen geführt haben. Derartige Unterschiede im Auftreten genetischer Veränderungen in Abhängigkeit von der geographischen Herkunft konnten für das *p53* Gen bereits für das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus gezeigt werden. So ist die Prävalenz von Mutationen des *p53* Gens in Regionen mit hohem Risiko für das ösophageale Plattenepithelkarzinom etwa doppelt so hoch als in Niedrigrisikoregionen (Montesano *et al.*, 1996).

## 2. Aufgabenstellung

In der hier vorgestellten Untersuchung sind wir der Frage nachgegangen, ob und an welcher Stelle in der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom Sequenz im Barrett-Ösophagus Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53* auftreten. Unser Ziel war es zu überprüfen, ob molekulargenetische Untersuchungen an diesem Gen geeignet sind die histologische Dysplasiediagnostik zu objektivieren und damit Hochrisikopatienten frühzeitig zu identifizieren.



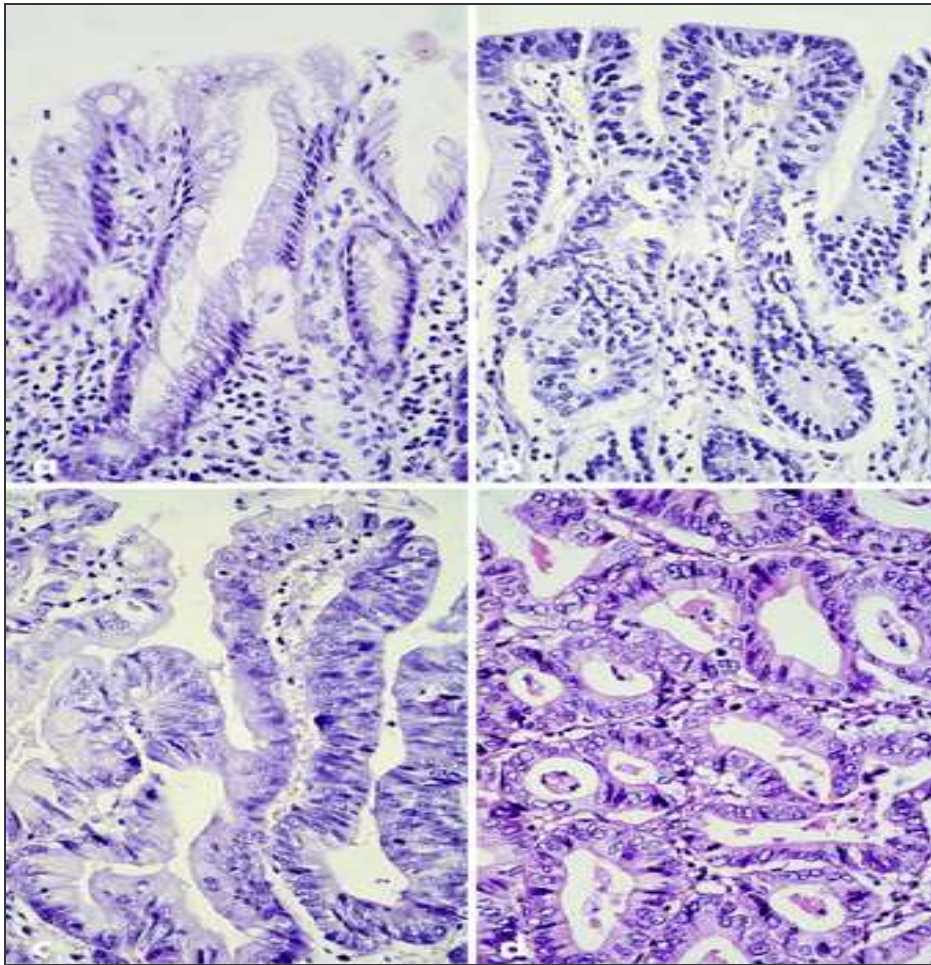
### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Untersuchungsgut**

Die vorliegende Untersuchung wurde anhand von Geweben aus 42 Ösophagusresektaten durchgeführt (siehe Tabelle 1). Die Operation erfolgte bei 39 Patienten wegen eines ösophagealen Adenokarzinoms (Barrett-Karzinom) und bei 3 Patienten wegen hochgradiger Dysplasien im Barrett-Ösophagus. Keiner der Patienten erhielt eine präoperative Radio- oder Chemotherapie. 37 Patienten waren männlich und 5 waren weiblich. Das Patientenalter betrug zwischen 36 und 81 Jahren (Median: 62 Jahre).

#### **3.2 Histologische Untersuchungen**

Die Ösophagusresektate wurden in 4%-igem, gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte mit Hämatoxylin und Eosin (HE) angefärbt und von dem Pathologen Herrn Priv. – Doz. Dr. M. Sarbia hinsichtlich des Vorhandenseins von spezialisiertem Epithel (SE), niedriggradiger Dysplasie (NGD), hochgradiger Dysplasie (HGD) und invasivem Adenokarzinom (CA) histologisch beurteilt, wobei die metaplastischen bzw. dysplastischen Gewebe sich in der Nachbarschaft der invasiven Adenokarzinome befanden.



**Abb. 2** : Beispielhafte histologische Darstellung von metaplastischer Barrettmukosa (spezialisiertes Epithel) (a), niedriggradiger Dysplasie (b), hochgradiger Dysplasie (c) und Adenokarzinom (Barrett-Karzinom) (d)

Das Grading der invasiven Adenokarzinome richtete sich nach den Kriterien der WHO (2001) und die pTNM-Klassifikation wurde nach den Kriterien der UICC durchgeführt (Wittekind *et al.*, 1998). Die histologische Graduierung niedriggradiger und hochgradiger Dysplasien erfolgte nach Standardkriterien (Reid *et al.*, 1988). Dabei fand das Ausmaß histoarchitektonischer und zytologischer Abnormitäten Berücksichtigung. Architektonische Veränderungen beinhalten u.a. den Verzweigungsgrad von Drüsen, eine Papillenbildung in Drüsenlumina und eine villiforme Konfiguration der Mukosaoberfläche. Zytologische Abnormalitäten schließen insbesondere Kernveränderungen ein, die durch Anisonukleose,

Verschiebung der Kern-Plasma-Relation, Verlust der polaren Kernposition, Hyperchromasie und abnorme Mitoseaktivität gekennzeichnet sind.

In niedriggradigen Dysplasien sind die architektonischen Veränderungen durch eine geringe Verformung und einen geringen Verzweigungsgrad der Drüsen gekennzeichnet. Die Kerne sind an der Basis der Drüsen mehrreihig, aber diese Stratifikation reicht nicht bis an die Schleimhautoberfläche. Auch die zytologischen Veränderungen sind gering ausgeprägt mit leicht vergrößerten und hyperchromatischen Zellkernen und einer Basophilie des Zytoplasmas. Mitosefiguren sind in den apikalen Bereichen der Krypten nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeichnet sich die hochgradige Dysplasie durch eine stärkere Veränderung der Schleimhautarchitektur aus. Diese beinhaltet ein stark gewundenes, knospendes oder kribriiformes Drüsenmuster und/ oder eine villiforme Mukosaoberfläche. Die nukleären Veränderungen sind dadurch charakterisiert, dass die Stratifikation der Zellkerne bis zur luminalen Oberfläche reicht. Außerdem verlieren die Zellkerne ihre polare Position innerhalb der Zelle, variieren stark in Größe und Form und zeigen ein grobes Chromatinmuster.

Entsprechend diesen Kriterien waren in 20 der 42 Ösophagusresektate niedriggradige Dysplasien und in 19 Fällen hochgradige Dysplasien nachweisbar. Darüber hinaus standen in 32 Fällen nicht-dysplastisches spezialisiertes Epithel und in 39 Fällen Adenokarzinomgewebe für die nachfolgenden molekulargenetischen Analysen zur Verfügung (siehe Tabelle 1).

### 3.3 Molekulargenetische Untersuchungen

#### 3.3.1 DNA-Präparation

Zunächst wurde auf Grundlage der vorangegangenen histologischen Untersuchungen von jedem der 42 Ösophagusresektate, soweit vorhanden, je ein Paraffinblock mit Normalgewebe (z.B. tumorfreie Magenschleimhaut), metaplastischer Barrettmukosa vom Typ des spezialisierten Epithels, niedriggradiger Dysplasie, hochgradiger Dysplasie und invasivem Karzinom ausgewählt. Von diesen Paraffinblöcken wurden jeweils 5 je 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Anschließend wurden die interessierenden Gewebsareale unter mikroskopischer Kontrolle von Herrn Priv. – Doz. Dr. M. Sarbia mit einem sterilen Skalpell abgekratzt und in ein steriles Eppendorffhütchen mit 200 µl TE-Puffer überführt.

Anschließend wurde das mikrodissezierte Gewebe mit 20 µl Proteinase K (25 mg/ml) über Nacht (16 h) bei 55 °C im Thermoinkubator verdaut. Nach dieser Inkubation wurde die Proteinase K durch Erhitzung (8 min, 94 °C) inaktiviert. 2 µl dieser DNA-Präparation wurden anschließend ohne weitere Aufreinigung für die nachfolgende Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt.

### 3.3.2 PCR

#### Exon 5 des p53 Gens

Die PCR für das Exon 5 des p53 Gens erfolgte als nested-PCR in zwei Ansätzen :

1.PCR Ansatz : (25µl Volumen)

2 µl DNA-Template

0,25 µl 3'-Primer 5N2a (20 pmol/µl)

0,25 µl 5'-Primer 5N1b (20 pmol/µl)

2,5 µl 10 x PCR-Puffer

0,5 µl dNTPs (je 10 mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP )

0,25 µl Taq-DNA-Polymerase (HotStar, 2 units/µl)

Aqua dest. ad 25 µl

2.PCR Ansatz:

1 µl PCR-Produkt aus dem 1.PCR-Ansatz

0,25 µl 3'-Primer 5a (20 pmol/µl)

0,25 µl 5'-Primer 5b (20 pmol/µl)

2,5 µl 10 x PCR-Puffer

0,5 µl dNTPs (je 10 mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

0,25 µl Taq-DNA-Polymerase (HotStar, 2 units/µl)

Aqua dest. ad 25 µl

Jede PCR schloss eine Negativkontrolle ein, bei der das DNA-Template durch Aqua dest. ersetzt wurde.

**Exone 6, 7 und 8 des p53 Gens**

Die PCR erfolgte jeweils in einem Gesamtvolumen von 50 µl, das sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte:

2 µl DNA-Template

0,5 µl 3'-Primer (20 pmol/µl) jeweils 6a, 7a oder 8a

0,5 µl 5'-Primer (20 pmol/µl) jeweils 6b, 7b oder 8b

5 µl 10 x PCR-Puffer

2µl dNTPs (je 10 mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

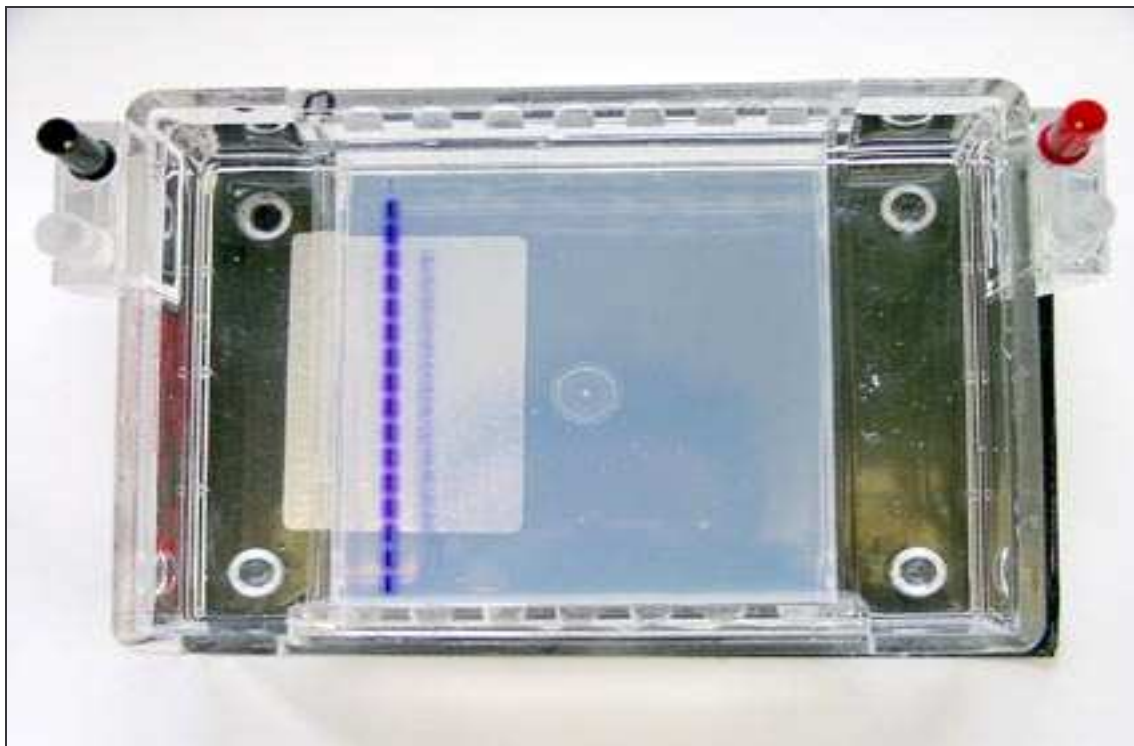
1µl Taq-DNA-Polymerase (HotStar, 2 units/µl)

Aqua dest. ad 50 µl

Jede PCR schloss eine Negativkontrolle ein, bei der das DNA-Template durch Aqua dest. ersetzt wurde.

### 3.3.3 Agarosegel-Elektrophorese

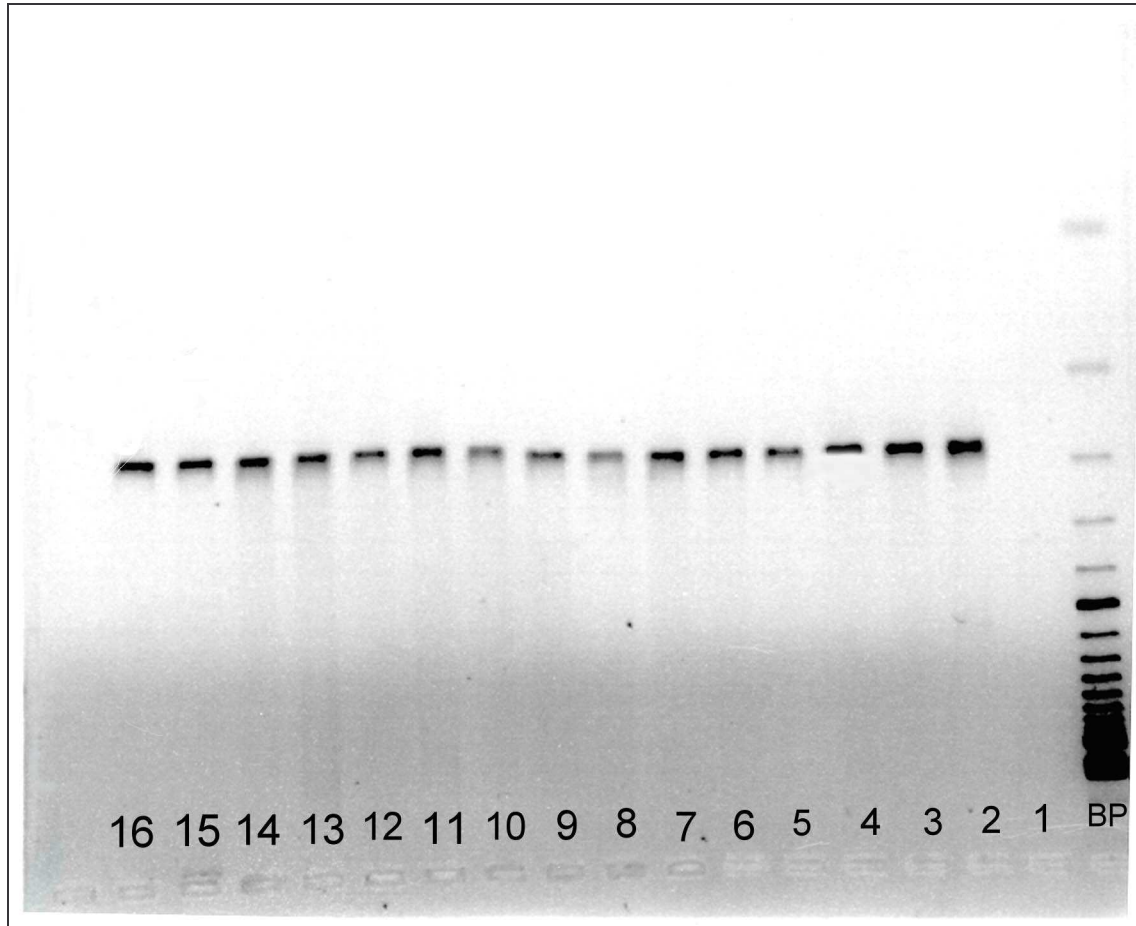
Zur Überprüfung des PCR-Ergebnisses wurde eine Agarose (2%)-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde Agarosepulver mit 1x TBE-Puffer durch 90 Sekunden langes Erhitzen in einer Mikrowelle aufgelöst und anschließend auf 60°C abgekühlt. Dann wurde das Gel in einen Gelträger gegossen und ein Gelkamm zur Herstellung von Geltaschen eingesetzt. Das nach Abkühlung polymerisierte Gel wurde anschließend in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, die Kammer mit 1x TBE-Puffer gefüllt und der Kamm entfernt. Die dadurch entstandenen Geltaschen wurden mit je 8 µl PCR-Produkt und 2 µl Ladepuffer gefüllt (Abb.3).



**Abb. 3:** Auftragung der PCR-Produkte auf das Agarosegel



Für die Auswertung der Elektrophorese wurde das Agarosegel nach Auftrennung der Proben für 30 - 45 min in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml) gefärbt. Danach wurden die PCR-Produkte unter UV-Licht ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ) photographiert (Abb. 4)



**Abb. 4:** – Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel

BP = 100-Basenpaarleiter (Längenstandard)

1 = Leerkontrolle

2 = Positiv-Kontrolle

3 – 16 = Proben der PCR-Produkte



### 3.3.4 Polyacrylamidgel Elektrophorese (SSCP-Gel)

Die Untersuchungen zum Nachweis einer Mutation im *p53*-Gen wurden mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Um eine höhere Aussagekraft bezüglich der *p53*-Mutationen zu erhalten, wurde die SSCP-Gelelektrophorese für jedes der 4 untersuchten Exone unter zwei verschiedenen Versuchsbedingungen durchgeführt (Reifenberger *et al.*, 1996). Dabei erfolgten die Gelläufe entweder bei unterschiedlichen Temperaturen (27°C bzw. 4°C) oder für die SSCP-Gele wurden Stammlösungen mit unterschiedlichen Bisarcylamid-Konzentrationen verwendet:

1. 10% Stammlösung 1:29 für SSCP

40% Acrylamid	48,34 ml
2% Bisarcylamid	33,34 ml
10X TBE	20,00 ml
Urea	24,0 g
aqua dest ad	200,00 ml

2. 10% Stammlösung 1:49 für SSCP

40% Acrylamid	49,00 ml
2% Bisarcylamid	20,00 ml
10X TBE	20,00 ml
Glycerin	10,00 ml
Urea	24,0 g
aqua dest ad	200,00 ml

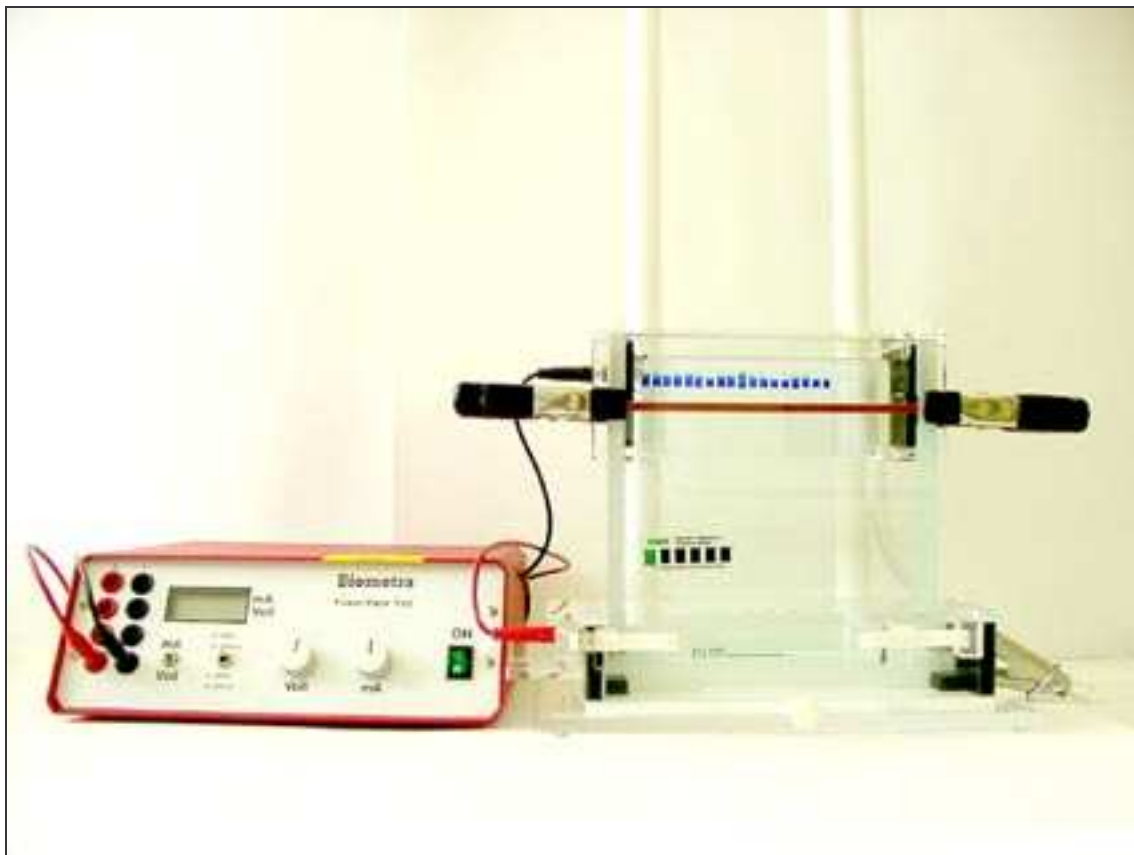
Im Einzelnen wurde die Mutationsanalyse der Exone 5 bis 8 mit SSCP-Gelen unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

**P53-SSCP-Bedingungen**

	<b>Bedingung 1</b>	<b>Bedingung 2</b>
<b>EXON 5</b>	10%Stammlösung(1:29, <b>27°C</b> )	10%Stammlösung(1:29, <b>4°C</b> )
<b>EXON 6</b>	10%Stammlösung(1:29, <b>27°C</b> )	10%Stammlösung(1:29, <b>4°C</b> )
<b>EXON 7</b>	10%Stammlösung( <b>1:29</b> , <b>27°C</b> )	10%Stammlösung( <b>1:49</b> , <b>27°C</b> )
<b>EXON 8</b>	10%Stammlösung(1:29, <b>27°C</b> )	10%Stammlösung(1:29, <b>4°C</b> )

Vor der Durchführung des Gellaufs wurden die Gelplatte, die Deckplatte, der Kamm und die Abstandshalter mit Ethanol (100%) gereinigt. Dann wurde auf die Gelplatte ein 5 ml großer Wassertropfen aufgegeben und der Gelfilm mit der hydrophoben Fläche unter Vermeidung von Luftblasen aufgelegt. Danach wurden die Abstandhalter seitlich und unten sowie anschließend die Deckplatte auf die Gelträgerplatte gelegt. Deckplatte und Gelträgerplatte wurden mit 5 Klammern seitlich und an der Unterkante fixiert. Dieser Aufbau wurde dann in einem 30-45° Winkel aufgestellt. Vor Einfüllen der Polaacrylamidstammlösung in den Gelaufbau wurden 50 µl TEMED und 500 µl APS hinzu gegeben, welche den Polymerisationsvorgang des Polyacrylamids induzieren. Diese Mischung wurde kurz geschüttelt und anschließend zwischen die vorbereiteten Glasplatten eingefüllt. Dann wurde der Gelkamm an die Oberseite des Gels eingelegt und die Platten wurden für eine Stunde in einer horizontalen Position gelagert. Nach Abschluss der Polymerisationszeit wurde der Gelkamm entfernt und die Geltaschen gespült. Nach

Einbau des Gels in die Gelkammer, schloss sich eine 30-minütige Vorlaufzeit des Gels bei 30 Watt an, wobei das Gel auf 45 bis 50°C erhitzt wurde. Parallel dazu wurden die PCR-Produkte denaturiert, um die Auftrennung von DNA-Einzelsträngen im SSCP-Gel zu ermöglichen. Die Denaturierung der PCR-Produkte erfolgte durch Erhitzung auf 94°C für 10 Minuten, danach wurden die Proben auf 4°C gekühlt. Die Renaturierung der PCR-Produkte bei der Abkühlung wurde durch Zugabe von Formamid in dem Gelladepuffer verhindert. Die Geltaschen wurden nun jeweils mit 6 µl PCR-Produkt und 6 µl Ladepuffer (SSCP) gefüllt (Abb. 5). In die beiden äußeren Geltaschen wurden jeweils Größenstandards sowie eine Positivkontrolle mit bekannter *p53* Mutation und eine Probe nicht-denaturierten PCR-Produkts aufgetragen.



**Abb. 5:** SSCP-Gel mit gefüllten Geltaschen, Gelkammer und Spannungsgerät vor dem Start der Elektrophorese

In Abhängigkeit von der gewählten Lauftemperatur waren unterschiedliche Laufzeiten der Gele notwendig. Bei einer Lauftemperatur von 4°C erfolgte die Elektrophorese bei 400 mV für 4 Stunden. Bei einem Gellauf bei Raumtemperatur erfolgte die Auftrennung bei 85 mV für 19 Stunden. Aufgrund des Grössenunterschiedes der PCR-Produkte der Exone 5 bis 8 und der dadurch bedingten unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten, variierten die o.g. Laufzeiten von Exon zu Exon um 1 bis 2 Stunden, wobei die PCR-Produkte von Exon 5 die geringste Laufgeschwindigkeit, die von Exon 6 und 7 die höchste Laufgeschwindigkeit aufwiesen.

#### **3.3.5 Silberfärbung der Polyacrylamidgele**

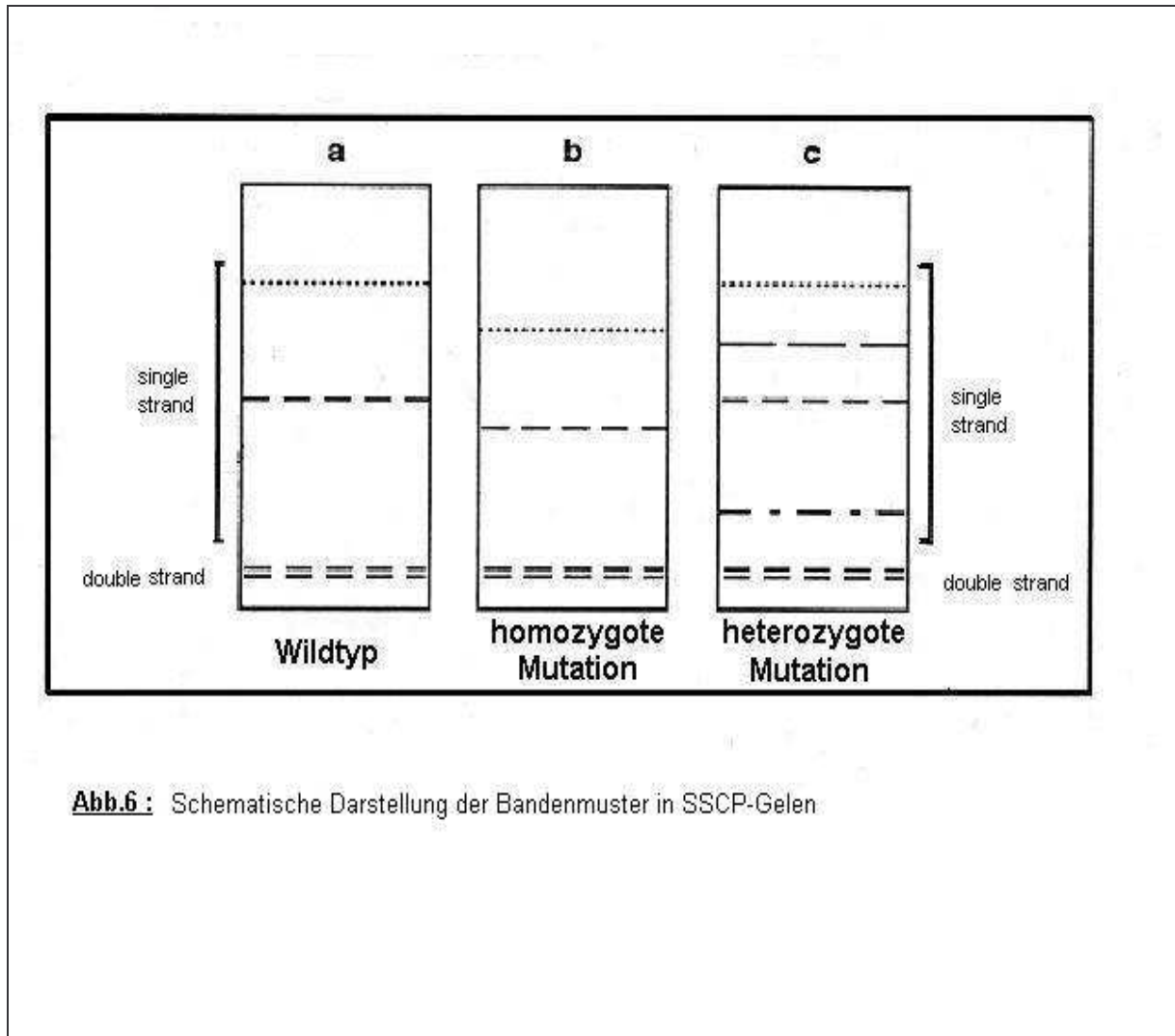
Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel für 20 Minuten in einer Lösung aus 200 ml 100%-igem Ethanol und 20 ml 100%-igem Eisessig ad 2000 ml Aqua dest fixiert. Nach 5-minütigem Spülen mit Aqua dest wurde das Gel für 20 Minuten mit 0,2%-iger Silberlösung (0,6 g  $\text{AgNO}_3$  ad 400 ml Aqua dest) unter Abdunklung gefärbt. Hiernach wurde erneut für 5 Minuten mit Aqua dest gespült. Nach dem Spülen mit Aqua dest wurde 10 ml von der frisch angesetzten Entwicklerlösung (22,4 g NaOH + 7,6 ml Formaldehyd ad 2000 ml Aqua dest.) auf das Gel gegeben und der entstehende Farbniederschlag abgegossen. Der restliche Entwickler wurde nun aufgetragen und bis zur gewünschten Farbintensität der Gelbanden belassen. Nach Abgießen des Entwicklers und Spülen mit Aqua dest für 5 Minuten wurde das Gel mit der Neutralisationlösung (0,75%-ige Natriumcarbonatlösung) für 5 Minuten neutralisiert. Nach erneutem Spülen für 5 Minuten und der darauf folgenden Trocknung für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Gel in eine Plastikfolie eingeschweißt.

### 3.3.6 Auswertung der Polyacrylamidgele (SSCP-Gele)

Die SSCP-Analyse dient als Screening-Verfahren zum Nachweis von Mutationen z.B. Punktmutationen, (Nukleotid-) Insertionen, (Nukleotid-) Deletionen oder Substitutionen. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass einzelsträngige DNA aufgrund ihrer Sequenz eine spezifische dreidimensionale Struktur besitzt und daher bei einer elektrophoretischen Auftrennung in einem Polyacrylamidgel immer ein bestimmtes Bandenmuster erzeugt (Orita *et al.*, 1989). Ist die untersuchte Probe von einer Mutation betroffen, so wird ihre dreidimensionale Struktur von der des Wildtyps abweichen und daher eine unterschiedliche Motilität im Polyacrylamidgel besitzen. Die Laufgeschwindigkeit wird also von der des Wildtyps verschieden sein, es tritt ein sog. „bandshift“ auf, der im silbergefärbten Polyacrylamidgel sichtbar wird oder es entstehen zusätzliche Banden. Die Sensitivität dieser Methode ist hoch genug, um selbst Mutationen eines einzigen Nukleotids durch deutliche Laufaberrationen sichtbar werden zu lassen. In jedem Fall sind die Wahl der geeigneten Gelmatrix und vor allem die Konzentration des Acrylamids von entscheidender Bedeutung für das Trennergebnis (Dockhorn-Dworniczak *et al.*, 1991).

Die Auswertung der SSCP-Gele erfolgte durch Herrn Priv.-Doz. Dr. Sarbia und mich. Dazu wurden die Silber-gefärbten SSCP-Gele auf einen Leuchtkasten gelegt um die Erkennung von Bandenshifts zu erleichtern. Nach Überprüfung der im Gel mitgeführten Positivkontrolle wurde jede Abweichung vom Laufverhalten des Wildtypfragments als Mutation in dem betreffenden Exon gewertet. Diese Ergebnis wurde für alle Proben durch eine 2. unabhängige PCR und anschließende SSCP-Analyse überprüft. Als Mutation gewertet wurden Bandenshifts sowohl wenn sie unter beiden Gellaufbedingungen als auch wenn sie nur unter einer Laufbedingung nachweisbar waren (Reifenberger *et al.*, 1996).

Die Interpretation der in einer SSCP auftretenden unterschiedlichen Bandenmuster setzt einige Erfahrung voraus. Die folgende schematische Darstellung zeigt die dabei auftretenden Laufaberrationen



**Abb.6 :** Schematische Darstellung der Bandenmuster in SSCP-Gelen

a) **Wildtyp**

b) **Homozygote Mutation:** In diesem nur theoretisch denkbarem Fall sind beide Allele des Gens von einer identischen Mutation betroffen. Hier werden im entstehenden Bild zwar Einzelstrangbanden sichtbar, die jedoch im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Laufhöhe erkennen lassen, da die Einzelstränge durch die geänderte Sequenz auch eine veränderte Konformation besitzen .

c) **Heterozygote Mutationen:** Hier ist nur eines der beiden Allele von der Mutation betroffen. Es werden auf dem Gel meist vier Einzelstrangbanden und die Doppelstrangbande erkennbar. Wegen der nur ein Allel betreffenden Mutation bilden sich zwei Einzelstränge des Wildtypallels und parallel dazu zwei Einzelstränge des mutierten Allels mit entsprechend verändertem Laufverhalten. In einigen Fällen sind nur drei Einzelstrangbanden sichtbar, was darauf beruht, dass einer der mutierten Einzelstränge in seiner Konformation dem Wildtyp ähnlich ist und somit eine nur unerhebliche und damit schwer feststellbare Veränderung der Laufgeschwindigkeit zeigt.

### 3.4 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Quelle</b>
Agarosepulver	GIBCO BRL
Ammoniumpersulfat	Merck
Aqua dest./ iniectionabilia	Braun
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma
Dimethylsilan (2%)	Merck
EDTA	Merck
dNTPs	Qiagen
Essigsäure (Eisessig) (100%)	Merck
Ethanol (100%, 75%)	Riedel – de Haen
Ethidiumbromid	Sigma
Formaldehyd (Formalin, 37%)	Merck
Formamid	Merck
Glycerin	Sigma
Harnstoff (flüssig)	National Diagnostics
Natriumhydroxid	Merck
Natriumcarbonat	Merck
PCR-Puffer	Qiagen
Propanol (100%)	Merck
Polyacrylamid (10%)	National Diagnostics
Salzsäure (HCl)	Merck
Silbernitrat	Merck



Tris	Merck
Xylencyanol	Merck

### 3.5 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	
Gelladepuffer (Agarosegel)	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30,0% Glycerin
Gelladepuffer (Polyacrylamidgel)	95% Formamid 20 mM EDTA, pH 8,0 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol
10 x PCR-Puffer	Tris/HCL, pH 8,7 (20 °C) KCl (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 15 mM MgCl <sub>2</sub>
1 x TBE-Puffer	0,09 M Tris/HCl, pH 8,0 0,09 M Borsäure 0,002 M EDTA

### 3.6 Färbelösungen für SSCP-Gele

Fixierlösung	10% Ethanol 1% Eisessig
Entwicklerlösung	0,38% Formaldehyd 1,12% Natriumhydroxid
Neutralisationslösung	0,75% Natriumcarbonat
Färbelösung	0,2% Silbernitrat

### 3.7 Enzyme

<b>Enzyme</b>	<b>Firma</b>
Taq-DNA-Polymerase ( HotStar)	Qiagen
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen
Proteinase K	Merck

### 3.8 PCR-Primer

Gen	Exon	Richtung	Sequenz	Firma
P 53	5N2a	Upstream	5' - CCTGACTTTCAACTCTGTCTC-3'	MWG Oligo
	5N1b	Downstream	5' - GACTAACGAGAATCCAGACC-3'	
	5 a	Upstream	5' -CTGTCTCCTTCCTCCTTCTAC- 3'	
	b	Downstream	5' - GAATCAGAGGCCTGGGGAC- 3'	
P 53	6 a	Upstream	5' -GTCCCCAGGCCTCTGATTC- 3'	MWG Oligo
	b	Downstream	5' - CAGTTGCAAACCAGACCTCAG - 3'	
P 53	7 a	Upstream	5' -CTCATCTTGGGCCTGTGTTATC- 3'	MWG Oligo
	b	Downstream	5' - GCACAGCAGGCCAGTGTG- 3'	
P 53	8 a	Upstream	5' -GAGTAGTGGTAATCTACTGGGAC- 3'	MWG Oligo
	b	Downstream	5' - CTCCACCGCTTCTTGTCTG - 3'	

### 3.9 DNA-Längenstandard

Name	Firma	Fragmente
100 Basenpaarleiter	GIBCO BRL	100,200-1500,2072 Basenpaare (Bp)

**3.10 Geräte / sonstige Materialien**

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Elektrophoresekammer (Agarosegel)	Pharmacia
Elektrophoresekammer (Polyacrylamid-gel)	BioRad
Mikrowelle, Mikromat	AEG
PCR-Gerät	Biometra
Spannungsgerät, Biometra PowerPack P25	Biometra
Thermoinkubator	Eppendorf
UV-Lichtquelle, BioDocAnalyse	Biometra
PowerPAC 3000 Spannungsgerät	BioRad
Schüttlergerät, MS1 Minishaker	IKA
Thermomixer compact	Eppendorf
Waage, Kern 440-33	KERN
Zentrifuge MicroD	Fisher Scientific
<b>Sonstige Materialien</b>	
GelBond PAG Film Folien (199 X 264 mm )	BMA

## 3.11 Tabelle 1. Patienten- und Tumorcharakteristika

Pat.Nr.	Geschlecht	Alter	Tumor (T)	Nodal (N)	GRADING
1	M	47	T2	N1	2
2	M	55	T1	N0	3
3	M	56	T3	N1	3
4	M	62	T3	N0	2
5	M	64	T3	N0	3
6	M	76	T1	N0	2
7	W	74	T1	N0	3
8	M	52	T2	N1	3
9	M	41	T3	N1	4
10	M	36	T3	N1	3
11	M	54	T3	N1	2
12	M	73	T3	N1	2
13	M	54	T1	N0	2
14	M	67	T1	N0	2
15	M	67	T1	N0	2
16	M	49	T3	N0	3
17	M	74	T3	N1	2
18	M	70	T1	N0	2
19	M	54	-1	N0	-1
20	M	70	T3	N1	3
21	M	48	T3	N1	2
22	M	50	T2	N1	2
23	M	62	T1	N0	3
24	M	69	T2	N0	3
25	M	57	T2	N0	2
26	M	68	T3	N1	3
27	M	63	T1	N0	1
28	M	61	T3	N1	2
29	M	61	T3	N1	3
30	M	71	T3	N0	3
31	W	67	T1	N0	3
32	M	59	T2	N1	3
33	W	67	T1	N1	3
34	M	62	T1	N0	2
35	M	70	T3	N1	3
36	M	72	-1	N0	-1
37	W	41	-1	N0	-1
38	M	61	T2	N0	3
39	W	69	T1	N0	3
40	M	69	T1	N1	3
41	M	56	T2	N0	2
42	M	71	T1	N0	2

**Tab. 1 :** -1 = kein Karzinom, Operation wegen hochgradiger Dysplasie

## 4 Ergebnisse

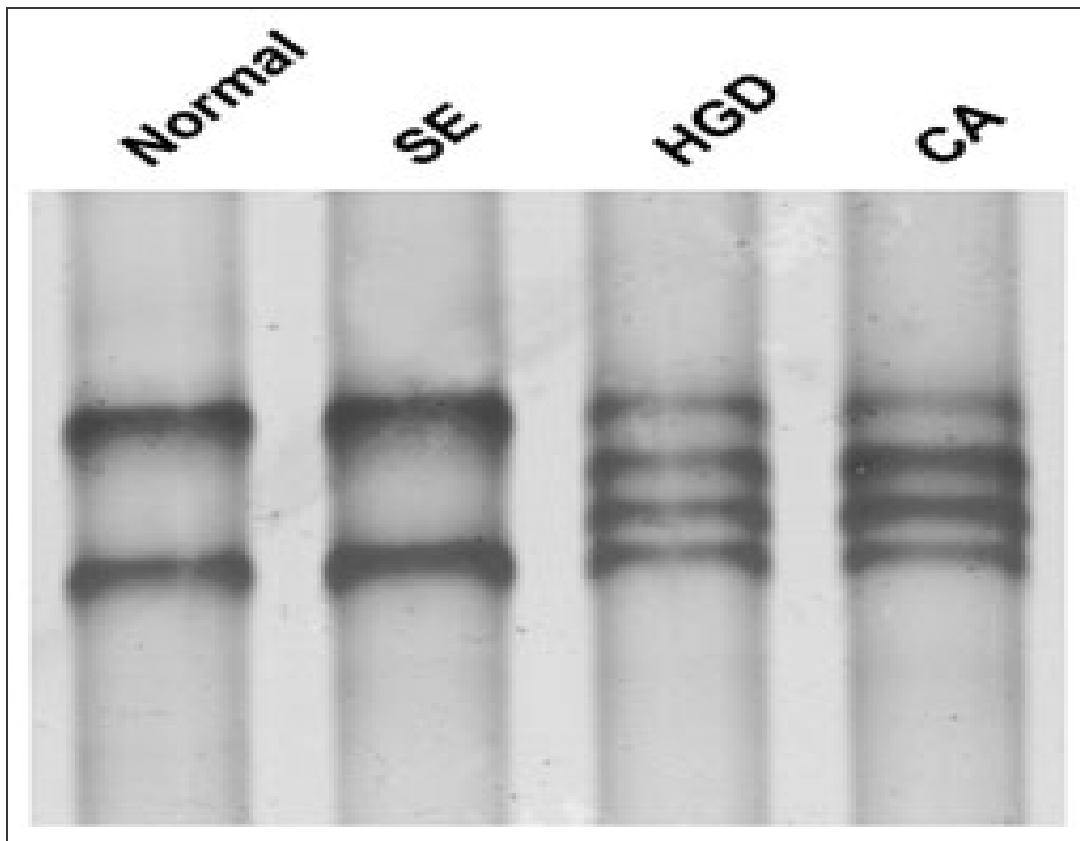
### 4.1 Ergebnisse der SSCP-Analyse der Exone 5, 6, 7 und 8

Die Ergebnisse der SSCP-Analysen der Exone 5-8 des *p53*-Gens können in Tabelle 2 abgelesen werden. Insgesamt konnte bei 51% (20 von 39) der Karzinomgeweben, bei 48% (9 von 19) der hochgradigen Dysplasien, bei 30% (6 von 20) der niedriggradigen Dysplasien und bei 6% (2 von 32) der Metaplasien eine *p53*-Mutation nachgewiesen werden.

Bei separater Analyse der Ergebnisse bezüglich der untersuchten Exone ergab sich folgende Situation:

#### 4.1.1 SSCP-Analyse des Exons 5

Von den 42 untersuchten Patienten konnte bei 7 Patienten eine Mutation im Exon 5 nachgewiesen werden. Dies betraf bei einem Patienten ausschließlich das Karzinomgewebe, bei 3 Patienten Karzinomgewebe und benachbarte HGD (Abb. 7), bei einem Patienten Karzinomgewebe und benachbarte HGD und NGD. Bei 2 Patienten fand sich die Mutation in der HGD, aber nicht im Karzinom.



**Abb. 7 :** SSCP-Gel mit Auftragung von PCR-Produkten des Exons 5 des *p53* Gens. Untersucht wurde Normalgewebe, spezialisiertes Epithel (SE), hochgradige Dysplasie (HGD) und Adenokarzinomgewebe (CA) desselben Patienten: deutlicher Bandenshift in HGD und CA als Hinweis auf eine Mutation in diesen Geweben

#### 4.1.2 SSCP-Analyse des Exons 6

Es konnte nur bei einem Patienten eine Mutation im Karzinomgewebe nachgewiesen werden.

#### **4.1.3 SSCP-Analyse des Exons 7**

Von den 42 untersuchten Patienten konnte bei 6 Patienten eine Mutation im Exon 7 nachgewiesen werden. Dies betraf bei einem Patienten ausschließlich das Karzinomgewebe, bei 2 Patienten Karzinomgewebe und benachbarte HGD, bei 2 Patienten Karzinomgewebe und benachbarte NGD. Bei einem Patienten fand sich die Mutation in der NGD, aber nicht im Karzinom.

#### **4.1.4 SSCP-Analyse des Exons 8**

Von den 42 untersuchten Patienten konnte bei 12 Patienten eine Mutation im Exon 8 nachgewiesen werden. Dies betraf bei 8 Patienten ausschließlich das Karzinomgewebe, bei einem Patienten Karzinomgewebe und benachbarte SE, bei einem Patienten HGD und NGD. Bei einem Patienten fand sich die Mutation in der NGD und bei einem Patienten in dem SE, aber bei beiden nicht im Karzinom.



## 4.2 Tabelle 2. Auswertung der SSCP-Gele für die Exone 5 bis 8

FALL Gewebe EXON 5 EXON 6 EXON 7 EXON 8  
 4°C 27°C 4°C 27°C 01:49 01:29 4°C 27°C

FALL	Gewebe	EXON 5 4°C	EXON 5 27°C	EXON 6 4°C	EXON 6 27°C	EXON 7 01:49	EXON 7 01:29	EXON 8 4°C	EXON 8 27°C
1	NS	Pcr-	Pcr-	WT	WT	WT	WT	Pcr-	Pcr-
	CA	Pcr-	Pcr-	WT	WT	MU	WT	Pcr-	Pcr-
2	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	HGD	WT	WT	WT	Pcr-	Pcr-	Pcr-	WT	WT
3	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MU	MU
4	NS	WT	WT	Pcr-	Pcr-	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	MU	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
5	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	MU	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
6	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	HGD	MU	MU	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	MU	MU	WT	WT	WT	WT	WT	WT
7	NS	WT	WT	Pcr-	Pcr-	WT	WT	Pcr-	Pcr-
	NGD	WT	WT	WT	Pcr-	MU	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	Pcr-	Pcr-	MU	WT	WT	WT
8	NS	Pcr-	Pcr-	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	Pcr-	WT	Pcr-
	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MU	WT
9	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MU	WT
	CA	Pcr-	Pcr-	WT	WT	WT	WT	WT	WT
10	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	HGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MU
11	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
12	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	Pcr-	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MU	WT
13	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MU	WT
	HGD	MU	MU	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	Pcr-	WT	WT	WT
14	NS	WT	WT	WT	WT	Pcr-	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	Pcr-	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
15	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	HGD	WT	WT	WT	WT	MU	MU	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	MU	MU	WT	WT
16	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	MU	MU	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	MU	MU	WT	WT
17	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
18	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	HGD	MU	MU	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	MU	MU	WT	WT	WT	WT	WT	WT
19	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

	HGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
20	NS	Pcr-	Pcr-	Pcr-	Pcr-	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MU	MU
21	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	Pcr-	WT	WT	WT
	HGD	WT	WT	WT	WT	Pcr-	WT	WT	WT
22	CA	WT	WT	WT	WT	Pcr-	WT	WT	WT
	NS	WT	WT	WT	WT	Pcr-	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	Pcr-	WT	WT	WT
	HGD	MU	MU	WT	WT	Pcr-	WT	WT	WT
	CA	MU	MU	WT	WT	Pcr-	WT	WT	WT
	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
23	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
24	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	HGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
25	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	MU	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	HGD	MU	MU	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	MU	MU	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
26	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	Pcr-	Pcr-	WT	WT
	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
27	HGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
28	HGD	MU	MU	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
29	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	HGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MU	MU
30	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	Pcr-	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
31	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	Pcr-	WT	WT	WT	WT
	HGD	WT	WT	WT	WT	MU	Pcr-	WT	Pcr-
	CA	WT	WT	WT	WT	MU	WT	WT	MU
	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
32	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
33	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	HGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
34	NS	WT	WT	Pcr-	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	HGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MU	MU
	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
35	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
36	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MU	MU
	HGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MU	MU
	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
37	HGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
38	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
39	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
40	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	MU	WT	WT	WT	WT	WT
41	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MU	MU
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	MU	MU
42	NS	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	SE	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	NGD	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CA	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

**Tab. 2 :** Legende der Tabelle für SSCP-Gel Ergebnisse

WT                    Wildtyp  
 MU                    Mutation  
 Pcr -                Proben-DNA für das entsprechende Fragment nicht amplifizierbar

## 5 Diskussion

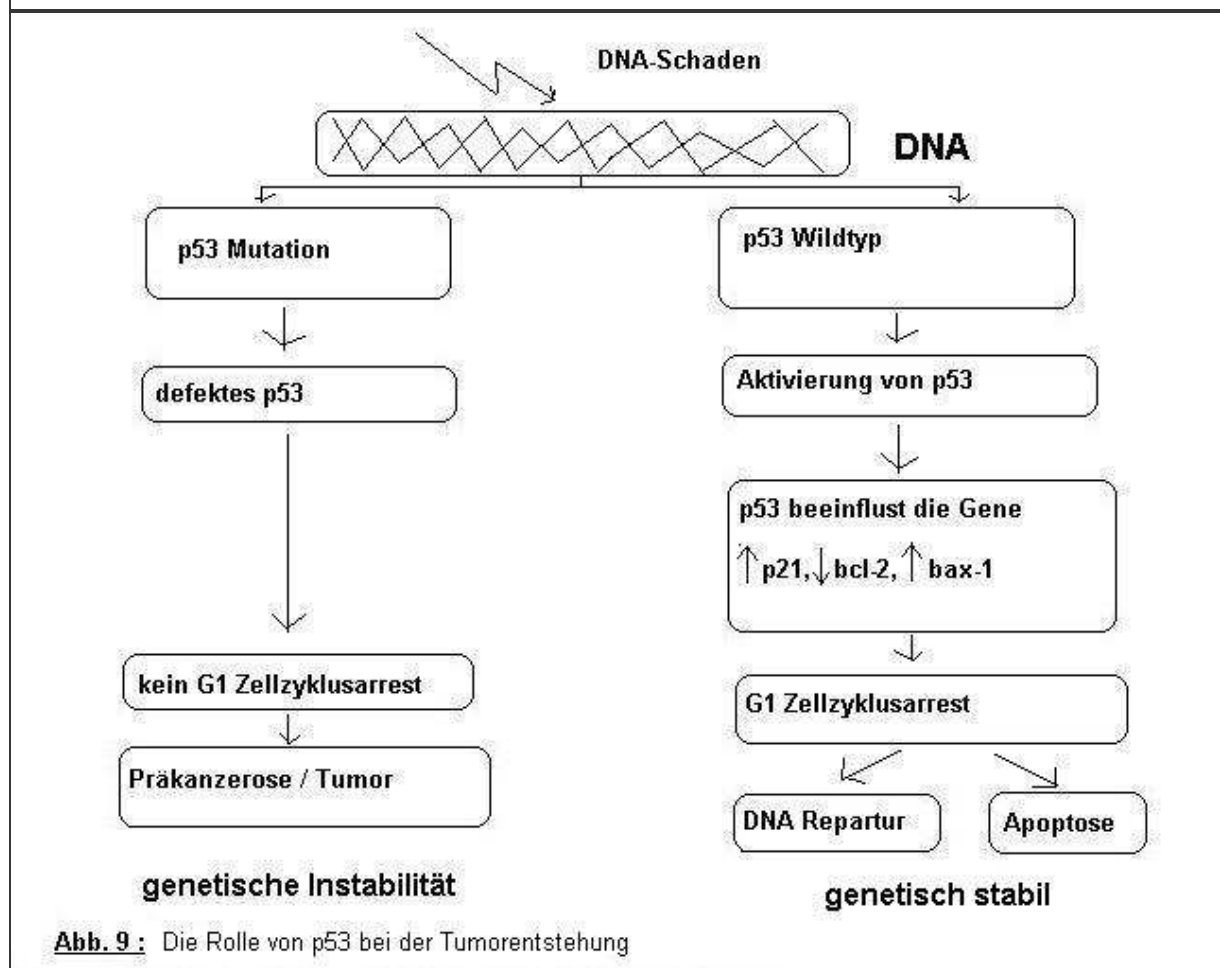
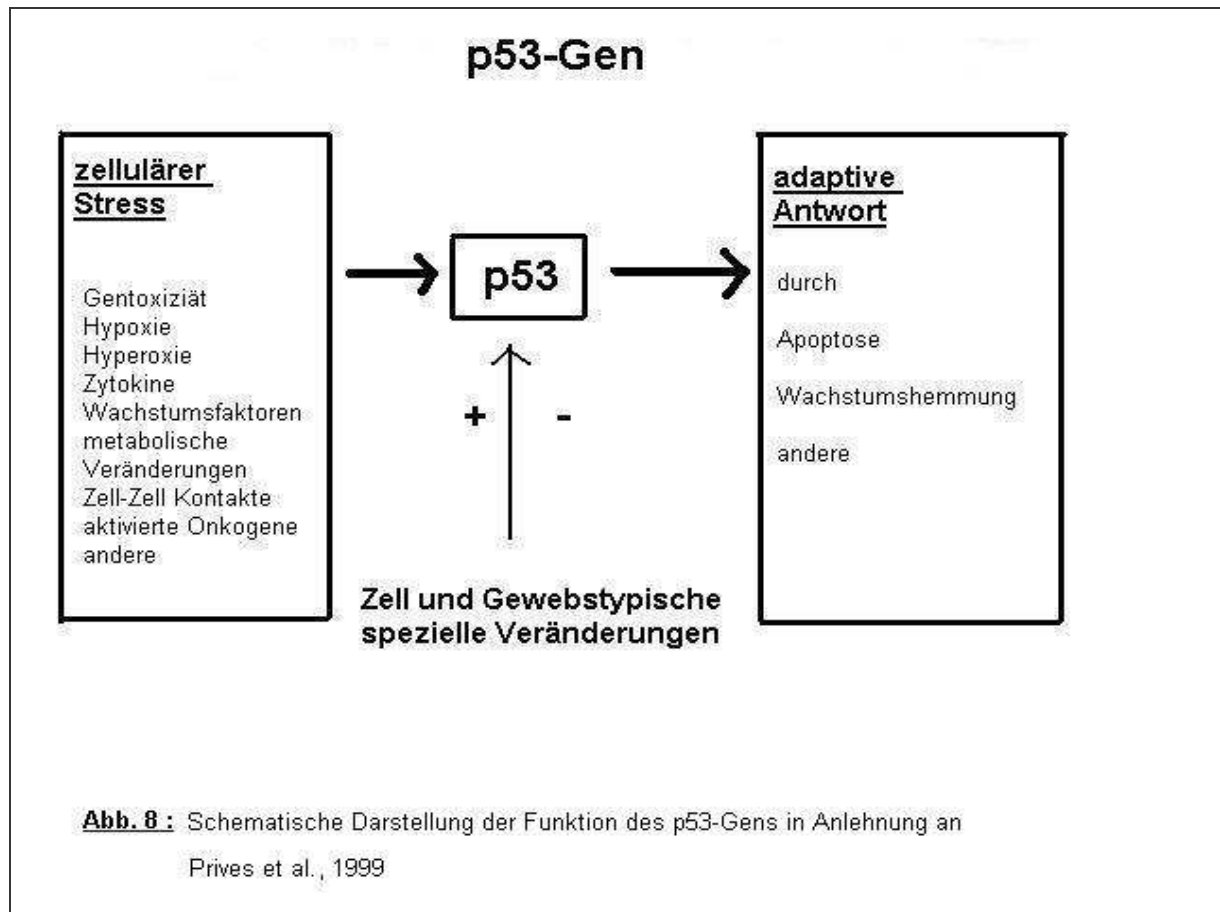
### 5.1 *p53* Tumorsuppressorgen

Das *p53*-Gen wurde erstmals 1979 beschrieben und zunächst als Onkogen angesehen. Erst 10 Jahre später wurde es als bedeutendes Tumorsuppressorgen identifiziert (Vogelstein *et al.*, 2000)

Das *p53*-Gen des Menschen liegt auf dem Chromosom 17p und umfasst 11 Exone. Sein Genprodukt ist ein nukleäres Phosphoprotein aus 393 Aminosäuren, dessen Struktur einem Transkriptionsfaktor ähnelt. Der azidische N-Terminus trägt eine ähnlich hohe Ladung wie sie von transkriptionellen Transaktivatoren bekannt ist, und der C-Terminus ist reich an basischen Aminosäuren, deren Sequenz mit der von DNA-Bindungsdomänen übereinstimmt (Zambetti *et al.*, 1993).

Zwischenzeitlich konnte gezeigt werden, dass das *p53*-Gen in fast 50% der malignen Tumoren des Menschen mutiert ist. Alternative Mechanismen zur Inaktivierung von *p53* bestehen in einer Komplexbildung mit viralen Proteinen, z.B. von humanen Papillomviren, Hepatitisviren und Adenoviren. Darüber hinaus ist über eine Interaktion mit Onkoproteinen, wie z.B. MDM2 ein Einfluss auf die Aktivität des *p53*-Gens möglich (Prives *et al.*, 1999, Vogelstein *et al.*, 2000).

Die vielfältigen Funktionen des Wildtyp *p53*-Proteins, sowie die Auswirkungen einer *p53*-Inaktivierung im Rahmen der Tumorentstehung sind in den Abbildungen 8 und 9 schematisch dargestellt.



Es sind mittlerweile 3 Wege der Aktivierung des *p53*-Gen bekannt

1. DNA-Schaden getriggert : z.B. ionisierende Strahlen

In diesem Zusammenhang werden die Proteinkinasen ATM (Ataxia-Telangiektasia mutated) und Chk2 aktiviert, welche durch eine Phosphorylierung zahlreicher Substratproteine induzieren.

2. Abnormale/erhöhte Wachstumssignale und Aktivitäten einer Zelle

Dabei kommt durch eine Überexpression von Onkogenen wie Ras oder c-Myc zur erhöhten Zellteilungsaktivität.

Das *p53*-Gen wird in Abhängigkeit von dem Protein p14<sup>ARF</sup> aktiviert

3. Induktion von *p53* durch andere Noxen

.Hierzu gehören z.B. Chemotherapeutika, UV-Strahlen oder Proteinkinaseinhibitoren. Dieser Aktivierungsweg wird durch ATR (Ataxia-Telangiektasia related) und Caseinkinase II<sup>6</sup> gesteuert.

Alle 3 Wege hemmen den Abbau vom *p53*-Protein und haben zur Folge, dass sich eine erhöhte Menge von *p53*-Protein in der Zelle sammelt. Dies erlaubt dem *p53*-Protein seine Hauptfunktion zu erfüllen, in dem es sich an eine bestimmte DNA-Sequenz bindet und eine Expression der nachgeschalteten Gene aktiviert. Dies führt letztendlich direkt oder indirekt zum Zelltod oder zur Hemmung der Zellteilung (Vogelstein *et al.*, 2000).

## 5.2 Die Bedeutung von Mutationsanalysen im *p53*-Gen bei BÖ-Patienten

Die Entstehung maligner Tumoren wird durch eine Akkumulation genetischer Ereignisse initiiert, die u.a. die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen beinhalten (Fearon et al. 1990). Dieses Mehrschrittkarzinogenesemodell ist für kolorektale Tumoren bereits gut definiert. Danach führt eine Akkumulation von genetischen Veränderungen, bei denen u.a. Tumorsuppressorgene wie *APC*, *p53* und *DCC* (deleted in colorectal cancer) eine wichtige Rolle spielen, zur Umwandlung des normalen Kolonepithels zu hyperproliferativen Zellen, die dann übergehen in frühe, intermediäre, späte Stadien von Adenomen und schließlich zu Karzinomen und Metastasen führen (Fearon et al. 1990). Die Zeitspanne bis zur Entstehung von Adenomen aus normalen Zellen beträgt ungefähr 5 Jahre und etwa genauso lange dauert es auch bis zur Entwicklung von Karzinomen und Metastasen aus Adenomen (Ahn et al., 1996). Auch bezüglich der Entstehung des Barrett-Karzinoms geht man von einer Mehrschrittkarzinogenese aus. Histologischer Ausdruck dieses Mehrschrittkarzinogenesemodells im BÖ ist die Progression von der einfachen Barrett-Metaplasie, über die niedriggradige und die hochgradige Dysplasie bis hin zum Karzinom, die, wie prospektive Verlaufsstudien zeigen konnten, wahrscheinlich bei der Mehrzahl der Patienten mit einem Barrett-Karzinom durchlaufen wird. Inwieweit diesen distinkten histologischen Läsionen auch bestimmte genetische Aberrationen zugeordnet werden können ist allerdings bislang nicht genau bekannt.

Der histologische Nachweis von Dysplasien in endoskopisch gewonnenen Biopsien ist derzeit die einzige etablierte Methode zur Früherkennung von Hochrisikopatienten mit einem BÖ. Jedoch ist die histologische Dysplasiediagnostik in hohem Maße von

der Erfahrung des untersuchenden Pathologen abhängig und selbst bei auf diesem Gebiet erfahrenen Pathologen wurden erhebliche Unterschiede bei der Beurteilung von Biopsien hinsichtlich des Vorliegens von Dysplasien beobachtet (Montgomery *et al.*, 2001). Vor diesem Hintergrund sind die aktuellen Bemühungen zur Etablierung von zusätzlichen objektiven Methoden zur Risikobeurteilung von Patienten mit einem BÖ zu sehen. Auf der molekularen Ebene haben sich die bisherigen Untersuchungen auf die Rolle des *p53*-Gens konzentriert. Immunhistologisch konnte eine Akkumulation des *p53*-Proteins in einem hohen Prozentsatz der untersuchten Dysplasien und Karzinome nachgewiesen werden (Jones *et al.*, 1994). Tabelle 3 fasst die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen (einschließlich der vorliegenden) zur Häufigkeit von *p53*-Mutationen bei Barrett-Karzinomen sowie bei deren Vorläuferveränderungen zusammen.

**Tabelle 3** *p53* Gen Mutationen in Barrett-Karzinomen und in Vorläuferläsionen.

SE	NGD	HGD	CA	Quelle
0% (0/6)	0% (0/3)	100% (5/5)	88% (15/17)	Hamelin <i>et al.</i> (1994)
–	–	100% (6/6)	64% (9/14)	Neshat <i>et al.</i> , (1994)
0% (0/1)	–	100% (3/3)	69% (11/16)	Gleeson <i>et al.</i> , (1995)
42% (8/19)	–	–	–	Campomenosi <i>et al.</i> , (1996)
0% (0/12)	0% (0/15)	–	14% (2/14)	Gonzales <i>et al.</i> , (1997)
–	0% (0/13)	33% (1/3)	46% (23/50)	Schneider <i>et al.</i> , (1997)
6%(2/32)	30% (6/20)	48% (9/19)	51% (20/39)	Vorliegende Untersuchung



Dabei zeigt sich zum einen, dass die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Häufigkeit von *p53*-Mutationen im Barrett-Karzinom mit den in vorangegangenen Untersuchungen nachgewiesenen Häufigkeiten gut vergleichbar ist. Bezüglich des Mehrschrittkarzinogenesemodells ergibt sich in der vorliegenden Untersuchung eine schrittweise Zunahme der *p53*-Mutationsfrequenz von der Metaplasie (6%), über die niedriggradige Dysplasie (30%) zur hochgradigen Dysplasie (48%) und zum Karzinom (51%). Dieser Befund steht im Gegensatz beispielsweise zur Arbeit von Hamelin *et al.* (1994), die einen sprunghaften Anstieg der Mutationshäufigkeit an der Grenze von der niedriggradigen Dysplasie zur hochgradigen Dysplasie fanden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass Hamelin *et al.* (1994) lediglich ein vergleichsweise kleines Patientenkollektiv untersuchen konnten. Diese Diskrepanz ist dennoch für die Bedeutung von *p53* als Marker für eine Therapieentscheidung bei BÖ-Patienten möglicherweise von großer Bedeutung. So konnten Sampliner *et al.* (1998) folgende Zusammenhänge zwischen dem Karzinomentstehungsrisiko und dem zugrundeliegenden Dysplasiegrad herstellen:

In 5 von 150 Fällen von Barrett-Patienten ohne Dysplasien konnten in einem Zeitraum von 3,4 bis 10 Jahren eine Entwicklung eines Barrett-Karzinoms diagnostiziert werden. Bei niedriggradiger Dysplasie waren es 8 von 150 Fällen, die in 1,4 bis 4,3 Jahren ein Karzinom entwickelten. Und bei hochgradiger Dysplasie entwickelten 21 von 61 Fällen ein Karzinom in 0,2 bis 4,5 Jahren (Sampliner *et al.* 1998).

Aufgrund dieser Beobachtungen wird zur Überwachung bei BÖ-Patienten ohne Dysplasie eine Endoskopie alle 2 Jahre empfohlen. Bei Patienten mit niedriggradiger Dysplasie werden 2 Endoskopien in 6 monatigem Abstand und dann einmal pro Jahr empfohlen. Bei Patienten mit hochgradigen Dysplasien werden zwei alternative Vorgehensweisen empfohlen:

Einmal eine intensive Biopsieserie zum Ausschluss eines intramukosalen Karzinoms oder direkt die chirurgische Resektion und nachfolgende ausführliche histopathologische Untersuchung des Resektates (Sampliner et al. 1998)

Wenn wir nun die *p53*-Genmutation als Entscheidungsmaßstab mit einbeziehen, so ist zu diskutieren, ob künftig Patienten auch mit spezialisiertem Epithel bzw. mit niedriggradiger Dysplasie bei Nachweis einer *p53*-Mutationen einer engmaschigeren Kontrolle unterzogen werden sollten. Diese Frage lässt sich allerdings nur durch zukünftige prospektive Untersuchungen unter Einbeziehung von BÖ-Patienten, die noch kein Karzinom entwickelt haben abschließend klären.

## 6. Zusammenfassung

### **Titel: Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53* im Verlauf der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom Sequenz des Barrett-Ösophagus**

**Doktorand : Özcan Iskender**

Das *p53*-Gen wurde erstmals 1979 beschrieben. Es liegt auf dem Chromosom 17p und umfasst 11 Exone. In der hier vorgestellten Untersuchung sind wir der Frage nachgegangen, ob und an welcher Stelle in der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom Sequenz im Barrett-Ösophagus Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53* auftreten. Unser Ziel war es zu überprüfen, ob molekulargenetische Untersuchungen an diesem Gen geeignet sind die histologische Dysplasiediagnostik zu objektivieren und damit Hochrisikopatienten frühzeitig zu identifizieren. Die vorliegende Untersuchung wurde anhand von Geweben aus 42 Ösophagusresektaten durchgeführt. Die Operation erfolgte bei 39 Patienten wegen eines ösophagealen Adenokarzinoms (Barrett-Karzinom) und bei 3 Patienten wegen hochgradiger Dysplasien im Barrett-Ösophagus. Neben den invasiven Karzinomen (CA) konnten 32 Proben metaplastischer Barrett-Mukosa (SE: spezialisiertes Epithel), 20 Proben niedriggradige Dysplasien (NGD) und 19 Proben hochgradige Dysplasien (HGD) untersucht werden. Nach DNA-Extraktion wurden die verschiedenen Gewebe mittels PCR und SSCP-Gel-Elektrophorese auf das Vorliegen einer *p53*-Mutation hin analysiert. Insgesamt konnte bei 51% (20 von 39) der Karzinomgewebe, bei 48% (9 von 19) der hochgradigen Dysplasien, bei 30% (6 von 20) der niedriggradigen Dysplasien und bei 6% (2 von 32) der Metaplasien eine *p53*-Mutation nachgewiesen werden.

Aufgrund der Ergebnisse könnte der Nachweis von Mutationen im *p53*-Gen als objektiver Parameter die histologische Dysplasiediagnostik ergänzen und die frühe Identifikation von Hochrisikopatienten erleichtern. Aber nur durch prospektive Verlaufsuntersuchungen bei BÖ-Patienten, die noch kein Karzinom entwickelt haben wird der diagnostische und klinische Stellenwert des Nachweises *p53*-Mutationen abschließend zu klären sein.

## 7. Literatur

Achkar E, Carey W (1988) The cost of surveillance for adenocarcinoma complicating Barrett's esophagus. *Am J Gastroent* 83: 291-294.

AFIP, Lewin KJ, FRCPath, Appelman HGD (1995) Tumors of the esophagus and stomach.

Ahnen DJ (1996) The genetic basis of colorectal cancer risk. *Adv Int Med* 41: 531-552.

Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF (1991) Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *J Am Med Assoc* 265: 1287-1289.

Bozymski EM (1985) Barrett's esophagus: endoscopic characteristics. In : Spechler SJ and Goyal RK (eds.). *Barrett's esophagus: pathophysiology, diagnosis, and management*, pp. 113-120, New York: Elsevier Science Publishing.

Casson AG, Mukhopadhyay T, Cleary RR, Ro JY, Levin B, Roth JA (1991) *p53* gene mutations in Barrett's epithelium and esophageal cancer. *Cancer Res* 51: 4495-4499.

Casson AG, Manolopoulos B, Troster M, Kerkvliet N, O'Malley F, Incullet R, Finley R, Roth JA (1994) Clinical implications of *p53* gene mutation in the progression of Barrett's epithelium to invasive esophageal cancer. *Am J Surg* 167: 52-57.

Crooks GW, Lichtenstein GR (1996) Clinical implications of Barrett's esophagus. *Arch Intern Med* 156: 2174-2180.

Dahms BB, Rothstein FC (1984) Barrett's esophagus in children: a consequence of chronic gastroesophageal reflux. *Gastroenterology* 86: 318-323.

Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF (1998): Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 83:2049-2053.

Dockhorn-Dworniczak B. Dworniczak B. Brommelkamp L. Bulles J. Horst J. Bocker WW. (1991) Non-isotopic detection of single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP): a rapid and sensitive technique in diagnosis of phenylketonuria. *Nucleic Acids Research*. 19(9):2500

Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.

Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW (1984) Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. *J Clin Pathol* 37: 961-974.

Garewal HS, Sampliner R, Gerner E, Steinbronn K, Alberts D, Kendall D (1988) Ornithine decarboxylase activity in Barrett's esophagus: a potential marker for dysplasia. *Gastroenterology* 94: 819-821.

Garewal HS, Sampliner RE, Fennerty MB (1991) Flow cytometry in Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 36: 548-551.

Haggitt RC, Tryzelaar J, Ellis FH, Colcher H (1978) Adenocarcinoma complicating columnar epithelial-lined (Barrett's) esophagus. *Am J Clin Path* 70: 1-5.

Haggitt RC (1992) Adenocarcinoma in Barrett's esophagus: a new epidemic *Hum Pathol* 23: 475-476.

Haggitt RC (1994) Barrett's esophagus, dysplasia and adenocarcinoma. *Hum Pathol* 25: 982-992.

Hamelin R, Flejou JF, Muzeau F, Potet F, Laurent PP, Fekete F, Thomas G (1994) *TP53* gene mutations and *p53* protein immunoreactivity in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 107: 1012-1018.

Harris CC, Hollstein M (1993) Clinical implications of the *p53* Tumorsuppressorgens. *N Engl J Med* 329: 1318-1327.

Ireland AP, Clark GWB, DeMeester TR (1997) Barrett's esophagus. *Ann Surg* 225: 17-30.

Jankowski J, McMenemin R, Hopwood D, Penston J, Wormsley KG (1991) Abnormal expression of growth regulatory factors in Barrett's oesophagus. *Clin Sci* 81: 663-668.

Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG, Kerr D, Young LS (1999). Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-

adenocarcinoma sequence in the esophagus. Am J Path 154: 965-973.

Johns BAE (1952) Developmental changes in the oesophageal epithelium in man. J Anat 86: 431-442.

Jones DR , Davidson AG, Summers CL, Murray GF, Quinlan DC (1994) Potential application of *p53* as an intermediate biomarker in Barrett's esophagus. Soc Thorac Surg 57: 598-603.

Kuster G, Foroozan P (1989) Early diagnosis of adenocarcinoma developing in Barrett's esophagus. Arch Surg 124: 925-928.

Menke-Pluymers MBE, Mulder AH, Hop WCJ, van Blankenstein M, Tilanus HW, The Rotterdam Oesophageal Tumour Study Group (1994) Dysplasia and aneuploidy as markers of malignant degeneration in Barrett's oesophagus. Gut 35: 1348-1351.

Meyer W, Vollmar F, Bar W (1979) Barrett-esophagus following total gastrectomy. Endoscopy 11: 121-126.

Montesano R, Hollstein M, Hainaut P (1996) Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. Int J Cancer 69: 225-235.

Montgomery E, Bronner MP, Goldblum JR, Greenson JK, Haber M, Lauwers G, Hart J, Lamps LW, Lauwers GY, Lazenby AJ, Lewin DN, Robert ME, Toledano AY, Washington K (2001) Reproducibility of the diagnosis of dysplasia in Barrett esophagus. *Hum Path* 32: 368-378

Naef AP, Savary M, Ozello L (1975) Columnar-lined lower esophagus: an acquired lesion with malignant predilection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 70: 826-835.

Neshat K, Sanchez CA, Galipeau PC, Blount PL, Levine DS, Joslyn G, Reid BJ (1994) *p53* mutations in Barrett's adenocarcinoma and high-grade dysplasia. *Gastroenterology* 106: 1589-1595.

Nobukawa B, Abraham SC, Gill J, Heitmiller RF, Wu TT (2001). Clinicopathologic and molecular analysis of high-grade dysplasia and early adenocarcinoma in short-versus long-segment Barrett esophagus. *Hum Path.* 32(4):447-54,

O'Hara MG, Bedrossian CWM, Johnson TS, Barlogie B (1984) Flow cytometry in cancer diagnosis. *Prog Clin Path* 9: 135-153

Orita M. Suzuki Y. Sekiya T. Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 5(4):874-9

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1993) Estimates of the world-wide frequency of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 54: 594-606.



Paull A, Trier JS, Dalton MD, Camp RC, Loeb P, Goyal RK (1976) The histologic spectrum of Barrett's esophagus. *N Eng J Med* 9: 476-480.

Prives C, Hall PA (1999) The p53 Pathway, *J of Path* 187:112-116

Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS (1987) Barrett's esophagus: correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterology* 93: 1-11.

Reid BJ, Weinstein WM (1987) Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Annu Rev Med* 38: 477-492.

Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Roth G, Surawicz CM, Van Belle G, Lewin K, Weinstein WM, Antonioli DA, Goldman H, MacDonald W, Owen D (1988) Observer variation in the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Hum Pathol* 19: 166-178.

Reid BJ (1991) Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroent Clin N Am* 20: 817-834.

Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine DS, Haggitt RC, Rabinovitch PS (1992) Flow-cytometric and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterology* 102: 1212-1219.

Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HGD, Fenoglio CM, Haggitt RC, Ahren C, Correa P, Hamilton SR, Morson BC (1983) Dysplasia in inflammatory bowel disease: Standardized classification with provisional clinical implications. Hum Path 14: 931-968.

Robertson CS, Mayberry JF, Nicholson DA, James PD, Atkinson M (1988) Value of endoscopic surveillance in the detection of neoplastic change in Barrett's esophagus. Br J Surg 75: 760-763.

Sampliner RE, The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology (1998) Practice guidelines on the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus. Am J Gastroent 93: 1028-1032.

Schneider PM, Hoelscher AH, Koenig U, Mizumoto S, Dittler HJ, Becker K, Siewert JR (1994) Importance of *p53* and *c-Ki-ras* mutations in the progression of Barrett's metaplasia to Barrett's cancer. Proc Am Assoc Cancer Res 35: 181.

Schneider PM, Casson AG, Levin B, Garewal HS, Hoelscher AH, Becker K, Dittler HJ, Cleary KR, Troster M, Siewert JR, Roth JA (1996) Mutations of *p53* in Barrett's esophagus and Barrett's cancer: a prospective study of ninety-eight cases. J Thorac Cardiovasc Surg 111: 323-331.

Spechler SJ, Goyal RK (1986) Barrett's esophagus. N Engl J Med 315: 362-371.

Spechler SJ, Goyal RK (1996) The columnar-lined esophagus, intestinal metaplasia, and Norman Barrett. Gastroenterology 110: 614-621.

Streitz JM Jr, Andrews CW Jr, Ellis FH Jr (1993) Endoscopic surveillance of Barrett's esophagus. *Thor Cardiovasc Surg* 105:383-388.

Streitz JM Jr, Ellis FH, Tilden RL, Erickson RV (1998) Endoscopic surveillance of Barrett's esophagus: a cost-effectiveness comparison with mammographic surveillance for breast cancer. *Am J Gastroent* 93: 911-915.

Tada T, Suzuki T, Iwafuchi M, Watanabe H, Katayanagi N, Aizawa K, Nishimaki T, Tanaka O, Muto T (1990) Adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus after total gastrectomy. *Am J Gastroent* 85: 1503-1506.

Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 1998

UICC. Hermanek P, Sobin LH (1992) TNM classification of malignant tumours (4th ed., 2<sup>nd</sup> rev.). Springer-Verlag Berlin.

Van Laethem JL (1995) Use of genetic markers during endoscopic screening and follow-up of gastrointestinal precancerous lesions. *Acta Gastro-Enterologica Belgica* LVIII: 187-192.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000): surfing the p53 network, *Nature* 408, 307-310

Wang KK (1994) Barrett's esophagus: current and future management. *Compr Ther* 20: 36-43.

Weston AP, Sharma P, Topalovski M, Richards R, Cherian R, Dixon A (2000) Long-term follow-up of Barrett's high grade dysplasia. *Am J Gastroenterol* 95: 1888-1893.

WHO (World Health Organization). Watanabe H, Jass JR, Sobin LH (1990) Histological typing of oesophageal and gastric tumours. Springer-Verlag.

Wright TA, Gray MR, Morris AI, Gilmore IT, Ellis A, Smart HL, Myskow M, Nash J, Donnelly RJ, Kingsnorth AN (1996) Cost effectiveness of detecting Barrett's cancer. *Gut* 39: 574-579.

Wijnhoven PL, Tilanus HW, Dinjens WNM (2001) molecular biology of barrett's adenoma, *Annals of Surg* 233: 322-337

Wright, TA (1997) High-grade dysplasia in Barrett's oesophagus. *Br J Surg* 84: 760-766.

## **Danksagung**

**Ich danke Herrn Prof. Dr. H. E. Gabbert für die freundliche Aufnahme im Institut für Pathologie.**

**Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. M. Sarbia für die Überlassung des Themas, seine intensive Betreuung und sein persönliches Engagement**

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name Özcan Iskender

geboren am 17. Juli 1971 in Solingen  
Staatsangehörigkeit deutsch  
Familienstand ledig

## Schulausbildung

1978-1982 Städt. Grundschule Rosenkamp in Solingen  
1982-1991 Städt. Gesamtschule Solingen  
Abschluss : Abitur

## Berufsausbildung

1992-1995 Ausbildung zum exam. Krankenpfleger  
an den Med. Einrichtungen der HHU Düsseldorf  
Abschluss : Staatsexamen

## Studium

1995-2002 Humanmedizin an der HHU Düsseldorf  
1997 Ärztliche Vorprüfung  
1997-1998 Wehersatzdienst im Städt. Klinikum Solingen  
Abteilung Chirurgische Ambulanz  
1999 1. Staatsexamen  
2001 2. Staatsexamen  
2002 (Dezember) 3. Staatsexamen

## Studium begleitende Tätigkeiten

1995-2001 Tätigkeit als exam. Krankenpfleger auf allen Stationen  
der Chirurgie der UKD im Nacht- und Wochenenddienst

## Famulaturen

1997-1998 Allgemein und Unfallchirurgie, sowie Polyklinik  
Städt. Klinikum Solingen