

**Aus der Medizinischen Klinik I
Gastroenterologie/Infektiologie/Rheumatologie
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. M. Zeitz**



**Zweitneoplasien des Ösophagus bei Patienten
mit Kopf-Hals-Tumoren.
Untersuchungen zur COX-2-Expression während der
Karzinogenese von Plattenepithelkarzinomen des
Ösophagus.**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin**

**vorgelegt von Peter Däubler
aus Tübingen**

– Berlin, September 2004 –

Referent: Prof. Dr. med. Hans Scherübl

Koreferent: Prof. Dr. med. I. Anagnostopoulos

**gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin**

Datum der Disputation: 21. Juni 2005

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einführung in die Thematik und Fragestellungen	7
1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre	7
1.2 Ösophaguszweitneoplasien bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumor	10
1.3 Die Rolle von COX-2 in der Karzinogenese	11
1.4 Fragestellungen	13
2. Methoden	14
2.1 Patientengut und Gewinnung der Proben	14
2.2 Messung der COX-2-Expression auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR	15
2.2.1 Gewebehomogenisierung und Isolierung der Gesamt-RNA	16
2.2.2 DNase-Verdau und cDNA-Synthese	16
2.2.3 Real-Time PCR	18
2.2.3.1 Prinzip der Real-Time PCR	18
2.2.3.2 Auswahl der Primer	20
2.2.3.3 Herstellung eines Reaktionsstandards	24
2.2.3.4 Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes der Reaktionsstandards	26
2.2.3.5 Ablauf der Real-Time PCR	27
2.2.4 Bestimmung der COX-2 Expression auf Proteinebene durch eine immunhistochemische Färbung	28
2.2.4.1 Prinzip der APAAP-Methode	28
2.2.4.2 Ablauf der APAAP-Färbung	29
2.2.4.3 Auswertung der Färbung	30
2.3 Statistische Auswertung	30

3.	Ergebnisse	32
3.1	Ergebnisse des endoskopischen Screenings	32
3.1.1	Plattenepitheldysplasien des Ösophagus	33
3.1.2	Zweitkarzinome des Ösophagus	35
3.2	COX-2-Expression während der ösophagealen Karzinogenese bei Kopf-Hals-Tumorpatienten	38
3.2.1	Etablierung der PCR	38
3.2.2	Vergleich der COX-2-Expression auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR	38
3.2.3	Untersuchungen zur COX-2-Expression auf Proteinebene während der ösophagealen Karzinogenese	41
3.2.4	Histologische Auswertung	44
4.	Diskussion	49
4.1	Screening nach ösophagealen Plattenepithelneoplasien bei Kopf- Hals-Tumorpatienten	49
4.2	Hochregulation von COX-2 während der Karzinogenese von ösophagealen Plattenepithelkarzinomen bei Kopf-Hals-Tumor- patienten	51
5.	Zusammenfassung	56
6.	Literaturverzeichnis	58
7.	Veröffentlichungen	69
8.	Lebenslauf	71
9.	Danksagungen	72

Abkürzungsverzeichnis:

ALDH-Polymorphismen: Isoformen des Enzyms Aldehyddehydrogenase (ALDH). Die ALDH ist unter anderem am Abbau von Ethanol beteiligt und setzt Acetaldehyd zu Acetat um.

Anamnese (adj. anamnestisch): Synonym für Krankengeschichte.

Biopsie: Synonym für Gewebeprobe.

COX: Abkürzung für Cyclooxygenase, ein wichtiges Enzym des zellulären Eicosanoidstoffwechsels und ein zentraler Angriffspunkt von NSAIDs (s. unten). Von der Cyclooxygenase sind bisher drei enzymatisch aktive Unterformen bekannt, wobei COX-1 und COX-2 am besten untersucht sind.

FAP: Abkürzung für familiäre adenomatöse Polyposis – Eine erblich bedingte Krankheit, die mit dem Auftreten multipler adenomatöser Polypen im Gastrointestinaltrakt einhergeht, besonders im Dickdarm. Das Risiko homozygot Betroffener, bis zum 70. Lebensjahr an einem Adenokarzinom des Kolon zu erkranken, liegt bei 100%.

FRET: Abkürzung für einen Fluoreszenzenergietransfer während der PCR von der Fluorescein-Sonde zur LC-Red-640-Sonde (engl. “fluorescence resonance energy transfer“(FRET)). Nachweis- und Quantifizierungsmethode für DNA während der PCR.

IEN: Abkürzung für intraepitheliale Neoplasie (Synonym: Dysplasie), bezeichnet eine maligne Transformation des Epithels, die jedoch noch nicht invasiv wächst.

Kopf-Hals-Tumor: In dieser Arbeit wird dieser Begriff synonym für ein Plattenepithelkarzinom des Mundraumes, des Oropharynx, des Hypopharynx oder des Larynx zusammengefasst. Andere Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches wie beispielsweise Tumoren der Ohren oder der Nasennebenhöhlen sind in dieser Arbeit ausgenommen.

Kopf-Hals-Tumorpatienten: Patienten mit einem oder mehreren oben genannten Tumoren in der Krankengeschichte.

Metachronizität einer Ösophagusneoplasie: Auftreten einer ösophagealen Zweitneoplasie später als sechs Monate nach Erstdiagnose eines Kopf-Hals-Tumors.

NSAIDs: nicht-steroidale Antiphlogistika, eine Gruppe von Medikamenten, die neben entzündungshemmenden auch chemopräventive Eigenschaften besitzen. Hauptangriffspunkt dieser Medikamente sind die Cyclooxygenasen.

Ösophagus: Synonym für Speiseröhre.

Ösophagektomie: Chirurgische Entfernung des Ösophagus.

PBGD: Porphobilinogendeaminase, ein Enzym aus dem Häm-Stoffwechsel. Es dient in dieser Arbeit als quantitativer Standard für die Expression der COX-2, da es in konstanter Menge exprimiert wird.

PCR: Polymerase chain reaction (deutsch: Polymerasekettenreaktion), Methode zu Nachweis und/oder zur Quantifizierung von DNA.

Plattenepithelneoplasie: Maligne Neubildung des Plattenepithels. Unter diesem Begriff werden Plattenepitheldysplasien und Plattenepithelkarzinome zusammengefasst.

RT-PCR: Polymerasekettenreaktion mit vorgeschalteter reverser Transkription (RT), in der RNA in DNA umgeschrieben wird. Die RT-PCR ist somit eine Methode zum Nachweis und/oder zur Quantifizierung von RNA.

Synchronizität einer Ösophagusneoplasie: Auftreten einer ösophagealen Zweitneoplasie früher als sechs Monate nach Erstdiagnose eines Kopf-Hals-Tumors.