

**Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie,
Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
des Universitätsklinikums des Saarlandes
Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. M. K. Schilling**

**IMMUNZYTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG ÖSOPHAGEALER
SCHLEIMHAUTZELLEN DER MAUS NACH
ENTZÜNDUNGSINDUKTION DURCH DUODENALEN REFLUX**

Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2008

vorgelegt von:
Philipp Martin Büch, geboren am 06.12.1975 in Saarbrücken

INHALT

1.	Zusammenfassung	3
1.1	Deutsch	3
1.2	Englisch	4
2.	Einleitung	6
2.1	Ätiologie	6
2.2	Histologie	6
2.3	Karzinome im Ösophagus	7
2.4	Klinik	8
2.5	Epidemiologie	8
2.6	Chirurgische Modelle zur Induktion von Entzündung im Ösophagus	8
2.7	Molekularbiologische Grundlagen der Arbeit	9
2.8	Problemstellung	11
2.9	Ziele der Arbeit	11
3.	Material und Methode	12
3.1	Überblick	12
3.2	Operationsverfahren	14
3.3	Zellpräparation	16
3.4	Immunzytochemische Färbungen	17
3.5	DNA-DNA-Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung	20
3.6	Auswertung der Fluoreszenzsignale	21
3.7	Histologie	22
3.8	Statistik	23
4.	Ergebnisse	25
4.1	Histologie	25
4.2	Immunzytochemische Färbung	27
4.2.1	Zentrosomenfärbung mit Perizentrin-Antikörper	28
4.2.2	Immunzytochemische Färbung mit p53-Antikörper	38
4.3	DNA-DNA-Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung	41
5.	Diskussion	42
5.1	Diskussion der Methoden	42
5.1.1	Chirurgisches Modell im Vergleich zu bestehenden Modellen	42

5.1.2	Zellpräparation	45
5.1.3	DNA-DNA-Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung	47
5.1.4	Immunzytochemische Färbung	49
5.2	Diskussion der Ergebnisse	49
5.2.1	Histologie	49
5.2.2	Perizentrin- und p53-Färbungen	50
5.3	Ziele der Arbeit	53
5.4	Ausblick	54
6.	Anhang	55
6.1	Abkürzungen	55
6.2	Chemikalien	56
6.3	Geräte	57
6.4	Tabellen	58
7.	Literaturverzeichnis	62
8.	Dank	69
9.	Vortrag	69
10.	Lebenslauf	70

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsch

Die Inzidenz des Adenokarzinoms des Ösophagus hat in den letzten Jahren im Vergleich zu anderen Karzinomen überproportional zugenommen. Aus diesem Grund sind Untersuchungen erforderlich, die helfen, die Karzinomentstehung zu verstehen und gleichzeitig Möglichkeiten der Früherkennung aufzeigen.

Epidemiologische Daten belegen, dass das Adenokarzinom letztlich eine Folge des metaplastischen Umbaus des Epithels des Ösophagus, des so genannten Barrett-Ösophagus, ist. Beim Menschen kann bisher die Dysplasie im Rahmen des Barrett-Ösophagus als einziger relevanter prognostischer Marker für die Entstehung eines Adenokarzinoms angesehen werden. Um die Karzinomentstehung histologisch und molekularbiologisch zu erhellen, kam in dieser Arbeit eine Modell der Maus zum Einsatz. Dreißig Mäuse erhielten eine totale Gastrektomie mit Ösophagojejunostomie, um mittels Reflux eine Entzündung im Ösophagus zu induzieren. Nach unterschiedlichen Standzeiten von 6, 21, 42 und 168 Tagen wurde der Ösophagus der Maus entnommen und histologisch und molekularbiologisch untersucht.

Ziel der molekularbiologischen Untersuchung war die Bestimmung der Zentrosomenzahl pro Zelle mittels Immunzytochemie. Das Zentrosom ist als Ausbildungsort der Spindel im Rahmen der Zellteilung eng an den Zellzyklus gebunden. Der Nachweis der Anzahl und der Verteilung der Zentrosomen erlaubte eine Einteilung der untersuchten Zellen in den Zellzyklus. Somit konnte der Anteil der Zellen in Proliferation bestimmt werden. Außerdem konnten Abweichungen von der üblichen Zentrosomenzahl beschrieben werden.

Zentrosomamplifikation, d.h. mehr als zwei Zentrosomen pro Zelle, sind schon in mehreren Neoplasien beschrieben worden und werden als mögliche Ursache genetischer Instabilität angesehen.

Im Rahmen der immunzytochemischen Untersuchungen konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass sich eine signifikant erhöhte Anzahl Zellen während der Entzündung in Proliferation befindet. Des Weiteren zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil der Zellen mit Zentrosomamplifikation nach Gastrektomie und Ösophagojejunostomie nach 168 Tagen. Die histologischen Untersuchungen ergaben bei 70% der Mäuse mit induziertem Reflux eine Ösophagitis. Die höchste Rate an Entzündungen fand sich an Untersuchungstag 21, während die schwersten Entzündungen an Tag 168 zu finden waren.

Das häufige Auftreten von Entzündungen an Tag 21 wurde sowohl auf das Operationstrauma, als auch auf den Reflux von duodenalen Sekreten zurückgeführt, während die Tiere an Tag 168 überwiegend eine schwere Refluxösophagitis zeigten.

Zu diesem Zeitpunkt konnte eine signifikante Erhöhung des Anteils der Zellen mit Zentrosomamplifikation gefunden werden, noch bevor histologisch eine Dysplasie nachweisbar war.

Ob die Zentrosomamplifikation tatsächlich ein früher Marker einer Dysplasie und eines metaplastischen Umbaus der Schleimhaut ist und auch beim Menschen als prognostischer Marker Verwendung finden kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

1.2 English

IMMUNOCYTOCHEMICAL CHARACTERISATION OF MURINE OESOPHAGEAL MUCOSA CELLS AFTER INDUCTION OF INFLAMMATION BY DUODENO-OESOPHAGEAL REFLUX

The incidence of oesophageal adenocarcinoma is rapidly growing in the last years compared to other carcinomas. For that reason, examinations are needed, that would help to understand tumourigenesis and to get tools for an early diagnosis.

Epidemiological data show that adenocarcinomas develop in metaplastic oesophageal epithelium, the so called Barrett's oesophagus. Dysplasia is so far the only relevant marker of development of adenocarcinoma out of Barrett's oesophagus in human beings. The aim of this investigation was to clarify histological and molecular patterns of carcinogenesis in a mouse model of surgically induced reflux.

Thirty mice underwent total gastrectomy and oesophagojejunostomy in order to induce reflux and inflammation of the oesophagus. After 6, 21, 42 and 168 days, the oesophagus of the mice was extracted and prepared for examination.

The goal of the molecular examination was to count the number of centrosomes per cell after immunochemistry. The centrosome is the nucleation centre of the spindles in case of cell division and for that reason, it plays an important role in the cell cycle. The description of the numbers and the distribution of the centrosomes permits to sort the cells by phase of the cell cycle. That way, we identified the cells being in proliferation process. Furthermore, we were able to show alterations of the number of centrosomes. Centrosome amplification, i.e. more than two centrosomes per cell, was already described in several neoplasias and is considered to be an origin of genetic instability.

As far as the molecular examination is concerned, we found, that the number of cells in proliferating process is significantly elevated during inflammation. Furthermore we showed a significantly elevated fraction of cells with centrosome amplification at day 168 after gastrectomy and oesophagojejunostomy.

The histological examinations showed oesophagitis in 70% of the mice with induced reflux. The highest rate of oesophagitis is found on day 21, whereas the most severe inflammations are found on day 168.

The frequent appearance of inflammation on day 21 was attributed as to the surgical trauma, as to the reflux of duodenal secretion, whereas the animals on day 168 suffered from a severe reflux oesophagitis. At this time we found a significantly elevated fraction of cells with centrosome amplification, even before dysplasia was seen by the pathologist.

Whether centrosome amplification is truly an early marker of dysplasia and metaplastic differentiation of the mucosa, and whether there are similar findings in humans, has to be shown in further investigations.

2. Einleitung

2.1 Ätiologie

Die Refluxösophagitis (engl.: gastroesophageal reflux disease (GERD)) bezeichnet ganz allgemein eine Veränderung der Ösophagusschleimhaut aufgrund zu langen Kontaktes mit gastroduodenalen Sekreten.

Die häufigste Ursache der Refluxösophagitis ist eine Insuffizienz des distalen Ösophagussphinkters, oft assoziiert mit einer Hiatushernie. Als weitere Ursachen kommen die Pylorus- oder Duodenalstenose, das Kardiakarzinom, Sklerodermie oder eine Muskeldystrophie in Betracht. Iatrogene Ursachen können der Zustand nach Gastrektomie oder der Zustand nach Kardiotomie bei Achalasie sein.

Gegenstand der aktuellen Forschung ist unter anderem die Zusammensetzung der Noxen, die zu einer Refluxösophagitis führen, und ihr bevorzugtes Schädigungsmuster. In der Vergangenheit stand hier der saure Reflux im Vordergrund. Die Zeitdauer, während der im Ösophagus ein $\text{pH} < 3-4$ herrscht, korreliert mit dem Schweregrad der Mucosaschäden. Im Tierexperiment konnte allerdings nachgewiesen werden, dass Säure allein nur in sehr hohen Konzentrationen einen schädigenden Einfluss hat. In Kombination mit Pepsin war das Ausmaß der Schädigung ungleich größer (Salo et al., 1983). Andere nicht-saure Noxen müssen außerdem in Betracht gezogen werden. Katz (2000) definierte zusätzlich einen duodenogastroösophagealen Reflux: `Galliger Reflux` oder `basischer Reflux` seien in diesem Zusammenhang unzureichende Begriffe. Galliger Reflux, da es sich nicht ausschließlich um Gallensäuren handelt, sondern auch Pankreasenzyme wie Trypsin eine Rolle spielen. Basischer Reflux ist unzutreffend, da selbst bei reinem duodenalem Reflux ein pH von sieben nicht überschritten wird. Denkbar ist ein $\text{pH} > 7$ unter Speichereinfluß, da dieser einen hohen Anteil von Bikarbonat enthält. Letztlich sind auch exogene Noxen wie Alkohol, Tabakrauch und Medikamente involviert.

Wenn bei einem Patienten zusätzlich protektive Faktoren, wie ein normaler Tonus des distalen Ösophagussphinkters oder ein regelrechter Kontraktionsablauf, fehlen, resultiert zwangsläufig eine Entzündung des distalen Ösophagus.

2.2 Histologie

Beim Menschen manifestiert sich die Schleimhautveränderung makroskopisch durch herdförmige Epithelverdickungen, Rötungen und Ulzerationen. Mikroskopisch sieht man Plattenepithelproliferationen, leukozytäre Infiltrationen, Verhornungserscheinungen und

Ulzerationen. Von Barrett-Syndrom, Barrett-Ösophagus oder Endobrachyösophagus spricht man, wenn es zu einem metaplastischen Umbau des distalen Ösophagusplattenepithels in ein Zylinderepithel kommt. Im englischen Sprachgebrauch ist die Abkürzung CLO (columnar-lined oesophagus) gebräuchlich.

Die Schleimhaut kann verschiedene intestinale Epithelien nachahmen, zum Beispiel einen Fundus-Typ mit Belegzellen, einen Kardial-Typ oder einen intestinalen Typ mit Zotten und Becherzellen.

2.3 Karzinome im Ösophagus

In Anbetracht dieser Tatsachen scheint ein Blick auf die Tumorentstehung im Ösophagus interessant. Histologisch unterscheidet man hier im wesentlichen zwei Karzinome, das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom. Die Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms ist in den letzten Jahrzehnten weitgehend konstant geblieben, während bei den Adenokarzinomen ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen ist. Daten aus den USA und Westeuropa belegen eindeutig eine Zunahme von Adenokarzinomen im Ösophagus. Dieser Anstieg der Inzidenz in den letzten 30 Jahren in den USA repräsentiert mit Abstand die höchste Zuwachsrate aller Tumoren (>900%), mehr noch als die Zunahme des Melanoms der Haut, des Non-Hodgkin-Lymphoms (70–120%) und des Lungenkrebses (220–400%). Studien konnten zeigen, dass das Risiko an einem Adenokarzinom zu erkranken für Patienten mit Endobrachyösophagus 30- bis 125-mal höher ist als in der Normalbevölkerung (Bollschweiler und Hölscher, 2000). Wichtige epidemiologische Daten liefert das 'UK National Barrett's Oesophagus Registry' (UKBOR), das seit 1996 existiert. Auswertungen ergaben eine Prävalenz von 10-16% für Barrett-Ösophagus. Des Weiteren zeigen diese Daten, dass 5-10% der Patienten mit Barrett-Ösophagus ein Adenokarzinom entwickeln. Der wichtigste Risikofaktor, der für die Entwicklung eines Adenokarzinoms gefunden werden konnte, war das Vorhandensein von Dysplasien. Je nach Schweregrad der Dysplasie ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit bis zu 80% für die hochgradige Dysplasie, dass aus einem Barrett Ösophagus ein Adenokarzinom entsteht (Ireland et al., 1997). Hieraus ergibt sich das Streben nach einem molekularbiologischen Marker, der in der Aussage dem Auftreten von Dysplasien entspricht, aber zu einem früheren Zeitpunkt nachweisbar ist (Caygill et al., 2004; Agnese et al., 2007; Palanca-Wessels et al., 1998).

Erste Versuche, die Dysplasie des Barrett-Ösophagus auf molekularbiologischer Ebene zu erhellen, unternahm Rabinovitch et al. 1989. Die Hypothese der „Metaplasie-Dysplasie-Karzinom“-Sequenz konnten sie beim Menschen mit dem Nachweis aneuploider Zellpopulationen in der Dysplasie und im Adenokarzinom untermauern.

2.4 Klinik

Die häufigsten klinischen Symptome der Refluxösophagitis sind Sodbrennen (75%), insbesondere im Liegen und nach Mahlzeiten, Druckgefühl hinter dem Sternum, Luftaufstoßen (60%) und Schluckbeschwerden (50%) (Lagergren et al., 1999). Weitere Symptome sind Regurgitation von Nahrungsresten, epigastrische Schmerzen und Brennen, salziger oder seifiger Geschmack im Mund nach Aufstoßen und unspezifische Symptome wie Übelkeit und Erbrechen. Die Beschwerden werden verstärkt durch Bücken, Pressen, Rückenlage, Anstrengung und Stress. Auch Medikamente und bestimmte Nahrungsmittel können eine Verschlimmerung bewirken.

Die Symptome bei Ösophagustumoren sind uncharakteristisch und treten erst spät auf. Verdächtig sind Dysphagie, retrosternale Schmerzen und Gewichtsverlust. Aufgrund der späten Diagnose sind die Überlebensraten auch nach operativer Therapie schlecht.

2.5 Epidemiologie

Unter den Symptomen der Refluxkrankheit leiden etwa 5 bis 10% Bevölkerung. Von diesen entwickeln etwa 15% eine Refluxösophagitis. 10% der Patienten mit Refluxösophagitis zeigen einen Endobrachyösophagus oder Barrett-Ösophagus. Schließlich erleiden 10% der Patienten mit Barrett-Syndrom ein Adenokarzinom. Die Zahl der Neuerkrankungen an Karzinomen der Speiseröhre betrug im Jahr 2005 im Saarland 75 (Saarländisches Krebsregister).

2.6 Chirurgische Modelle zur Induktion von Entzündung im Ösophagus

Levrat et al. (1962) untersuchten Ratten nach Ösophagojejunostomie. Der Reflux von Magen-, Gallen- und Pankreassaft führte hier zu Ösophagitiden, allerdings ohne dass die Tiere einen Barrett-Ösophagus zeigten. 1970 haben Bremner et al. bei Hunden mittels einer Gastroplastik und Stimulation der Magensäuresekretion mit Histamin einen gastroösophagealen Reflux verursachen können. Es gelang ihnen damit, einen Barrett-Ösophagus zu induzieren.

Pera et al. (1989) testeten Ratten mit Ösophagojejunostomie und Applikation eines Karzinogens gegen eine Kontrollgruppe mit Tieren, die nur das Karzinogen erhielten. Die erste Gruppe entwickelte sowohl Plattenepithelkarzinome als auch Adenokarzinome, während die zweite Gruppe ausschließlich Plattenepithelkarzinome zeigte. So gelang es,

den entscheidenden Einfluss der duodenalen Sekretionen auf die Entstehung des Barrett-Ösophagus assoziierten Adenokarzinoms zu zeigen. Die gleiche Arbeitsgruppe berichtete später über die verstärkte Expression des Tumorsuppressorgens p53 während der unterschiedlichen Phasen der Entzündung, der Dysplasie und des Adenokarzinoms (Pera et al., 2001). Goldstein et al. (1997) konnten zeigen, dass eine erhöhte Fettzufuhr und ein Überangebot an Eisen nach Ösophagojejunostomie zu höheren Krebsraten in der Speiseröhre von Ratten führt. Fein et al. (1998) unterschieden zwischen gastroduodenalem und duodenalem Reflux, indem sie die Ratten mit Ösophagojejunostomie wahlweise gastrektomierten oder nicht. Unabhängig von der Art des Refluxes erkrankten 48% der Tiere an einem Adenokarzinom, ohne dass ein Karzinogen verabreicht wurde.

Um mit genetisch veränderten Tieren arbeiten zu können, haben Xu et al. (2000) dieses Model auf die Maus übertragen. Sie untersuchten Tiere nach Ösophagojejunostomie mit und ohne Gabe eines Karzinogens. Es gelang bei 42,4% der Mäuse mit Ösophagojejunostomie einen Barrett-Ösophagus nachzuweisen. Die Rate an Barrett-Ösophagus lag bei den Tieren, die zusätzlich das Karzinogen erhalten hatten, niedriger, dafür lag die Rate von Adenokarzinomen bei 54,3%.

Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte 2001 fünfzig Mäuse nach Ösophagojejunostomie und Verabreichung eines Karzinogens. Unter diesem Regime entwickelte sich in 14% der Tiere ein Barrett-Ösophagus, in 30% der Fälle traten Karzinome auf. Davon betrug der Anteil der Adenokarzinome 10% (Ellis et al., 2001).

Fein et al. haben 1999 p53-Knock out (ko)-Mäuse mit Ösophagojejunostomie untersucht. In allen vier Mäusen, die die Versuchsdauer von dreißig Wochen überlebten, konnten sie histologisch Ösophagitis und schwere Dysplasie nachweisen. Eine Maus zeigte einen Barrett-Ösophagus und zwei Mäuse entwickelten ein Adenokarzinom.

2.7 Molekularbiologische Grundlagen der Arbeit

Das Zentrosom ist das `major microtubule organizing center` (MTOC) der Zelle sowohl in der Interphase, als auch während der Mitose (Archer und Solomon, 1994). Die Größe beträgt etwa 1µm im Durchmesser. Es besteht bei Säugetieren aus einem Paar Zentriolen, die von einer perizentriolären Matrix umgeben sind. In Epithelzellen liegt das Zentrosom während der Interphase an einer definierten Stelle oberhalb des Kerns im Zytosol. Es ist somit nicht nur an der Ausrichtung der einzelnen Zelle, sondern auch am Aufrechterhalten der Funktionalität des gesamten Zellverbandes beteiligt. Die vom Zentrosom ausgehenden Mikrotubuli dienen in der Interphase dem gerichteten vesikulären Transport. Während der Mitose sind sie für die Ausbildung der Spindeln verantwortlich (Doxsey, 1998). Das Zentrosom verdoppelt sich

genau einmal pro Zellzyklus, nämlich am Übergang von G1 nach S. Am Übergang von G2 nach M trennen sich die Zentrosomen und bilden die beiden Pole der Mitosespindel.

Am Aufbau des Zentrosoms sind mehrere Proteine beteiligt (Ou und Rattner, 2000; Pockwinse et al., 1996). So ist die Aufgabe des Centrins die Verdopplung und Trennung des Zentrosoms. Perizentrin ist ein Strukturprotein und γ -Tubulin ist maßgeblich für die Entstehung der Mikrotubuli verantwortlich (Zheng et al., 1991; Zheng et al., 1995; Joshi et al., 1992; Doxsey et al., 1994). Alle drei Proteine finden sich auch in der perizentriolären Matrix (Stearns et al., 1991).

Sowohl in Tumorzelllinien (Pihan et al., 1998) als auch in soliden Tumoren konnten schon zahlreiche Zentrosomenanomalien beschrieben werden (Salisbury et al., 1999; Lingle und Salisbury, 1999; Lingle et al., 2002). Die funktionellen Störungen, die sich daraus ergeben, betreffen die Nukleation der Mikrotubuli, die Duplikation oder die ordnungsgemäße Separation der beiden Zentrosomen (Cheng et al., 1998). Auch strukturelle Veränderungen, die die Größe und die Anzahl der Zentrosomen betreffen, wurden bereits beschrieben. So fand man überzählige Zentriolen, überschüssiges perizentrioläres Material und eine inadäquate Phosphorylierung (Lingle et al., 1998).

Für die Tumorentstehung ergeben sich hieraus zwei Konsequenzen. In Zellen, die sich in der Interphase befinden, kann die Zentrosomamplifikation zu Veränderung der zellulären Polarität führen und damit den gerichteten vesikulären Transport beeinflussen. Es resultiert ein Funktionsverlust, der auch Kennzeichen der Anaplasie ist. In Zellen, die in die Mitose eintreten, können sich multipolare Spindeln ausbilden, die zu einer Fehlverteilung der Chromosomen führen können (Winey, 1996). Aneuploidie ist die Folge. Ein denkbares Szenario ist auch das Ausbleiben der Mitose, was dann zu Polyploidie führen kann. Diesen Vorgang bezeichnet man als Endoreduplikation (Therman und Susman, 1993).

Ein weiteres Protein, das sowohl mit der DNA als auch mit dem Zentrosom assoziiert ist, ist das Tumorsuppressorprotein p53. Die Funktion von p53 besteht in der Kontrolle von zentralen Funktionen des Zellzyklus (Schwartz und Rotter, 1998). Bei Erkennung eines DNA-Schadens erfolgt die Regulation der DNA-Reparatur, der Stopp des Zellzyklus oder die Induktion von Apoptose. Bei einem Funktionsverlust von p53 kann es zu unkontrolliertem Zellwachstum kommen. Fehlt p53, werden zu viele Zentrosomen gebildet, was wiederum die oben beschriebenen Folgen haben kann (Fukasawa, 1996; Weber et al., 1998; Blount et al., 1994).

Sowohl die Zentrosomamplifikation als auch Poly-, und Aneuploidisierung gelten bislang als tumorspezifische Parameter (Hartwell und Kastan, 1994). Es wird allgemein akzeptiert, dass die chronische Entzündung als Ursache für die Tumorentstehung in Frage kommt. Könnte es gelingen, Zentrosomamplifikation und Aneuploidisierung in chronisch entzündetem Gewebe nachzuweisen, würde dies die These der Kazinomentstehung aufgrund einer Entzündung

stützen. Gerade die Entzündung, die bei einem chronischen Reflux in der Speiseröhre vorhanden ist, stellt diese spezifische Gewebesituation dar.

2.8 Problemstellung

Der Nachweis der „Entzündung-Metaplasie-Dysplasie-Karzinom“-Sequenz (Jankowski et al., 1999) soll mittels molekularzytogenetischer und immunhistochemischer Methoden am Tiermodell der Maus geführt werden. Mit Hilfe unseres Tiermodells sollte es möglich sein, in der Speiseröhre der Maus die verschiedenen Stadien von der Entzündung bis zum Karzinom nachzuweisen.

Die Charakterisierung des Gewebes hinsichtlich Polyploidisierung und Zentrosomenzahl in den einzelnen Stufen der Entzündung soll in Korrelation mit den histopathologischen Daten bislang unerkannte Mechanismen der Entstehung des Ösophaguskarzinoms aufzeigen.

2.9 Ziele der Arbeit

1. Etablierung des Tiermodells: Lassen sich histologisch alle Stadien der „Entzündung-Metaplasie-Dysplasie-Karzinom“-Sequenz nachweisen?
2. Korrelieren die histologischen Befunde mit den molekularbiologischen Parametern Polyploidie und Zentrosomamplifikation?
3. Entwicklung einer Methode, die es ermöglicht, das Epithel der Ösophagusschleimhaut der Maus molekularbiologischen Untersuchungsmethoden zugänglich zu machen
4. Etablierung einer Färbemethode zur Bestimmung der Zentrosomenzahl mittels Immunzytochemie.
Etablierung einer Färbemethode zur Bestimmung des Ploidie-Grades mittels Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH).
5. Gibt es weitere molekularbiologische Parameter, die zur Charakterisierung herangezogen werden können? Exemplarische Untersuchungen zur Beteiligung von p53 mit Hilfe von p53-ko-Tieren und mit p53-Immunzytochemie.

3. Material und Methoden

3.1 Überblick

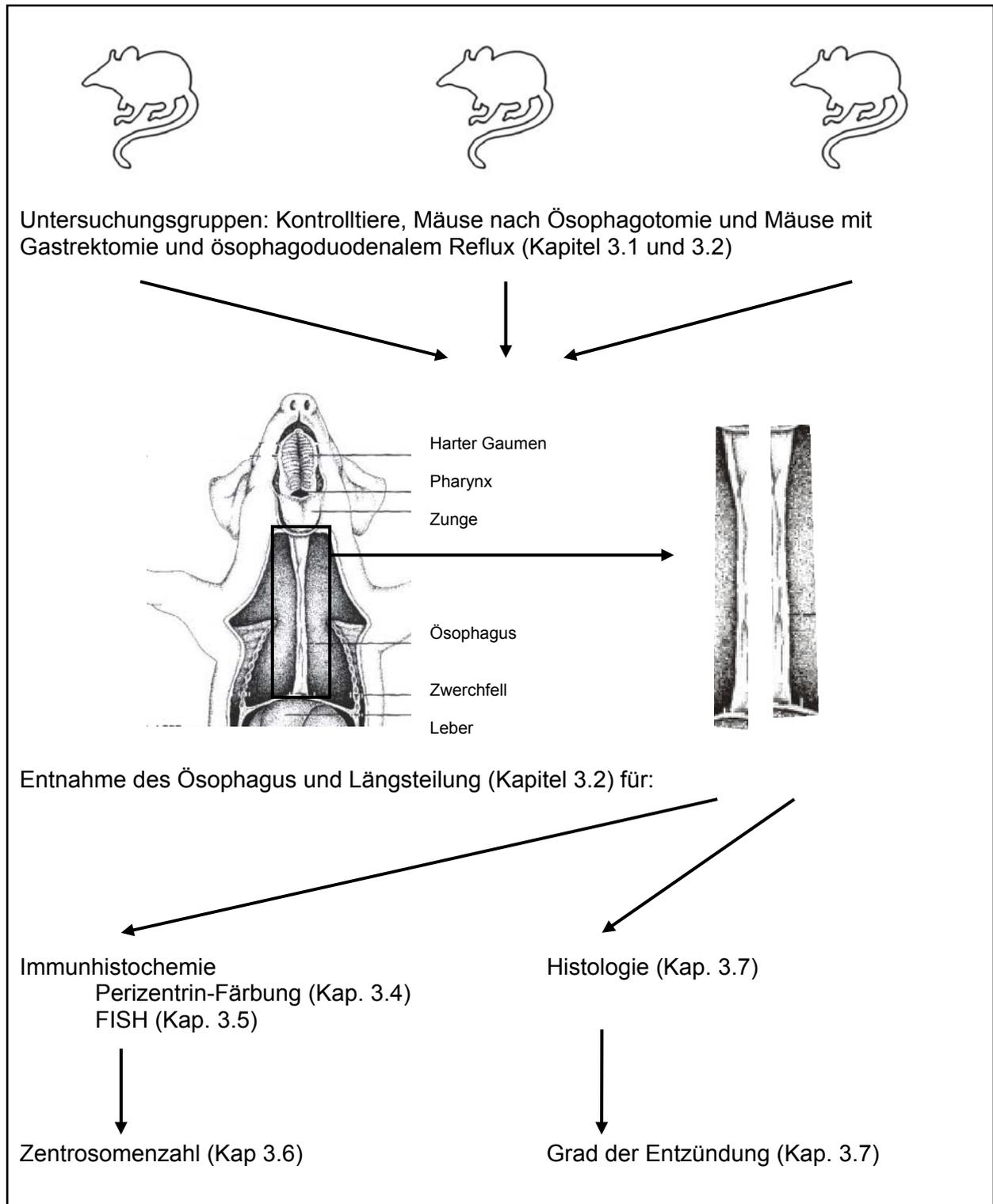


Abbildung 1: Schematische Übersicht über die Versuchsanordnung mit Angabe des zugehörigen Kapitels.

Die Tiere wurden in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt: Die Kontrollgruppe bestand aus Tieren ohne Operation, sie wird im Folgenden weiterhin als Kontrollgruppe bezeichnet.

Die zweite Gruppe erhielt eine Operation des distalen Ösophagus, ohne einen Reflux zu induzieren. Es wurde operativ ein kleiner Längsschnitt in den distalen Ösophagus gesetzt, ohne die Mucosa zu verletzen. Die Tiere in dieser Gruppe werden im Folgenden als Tiere mit Ösophagotomie bezeichnet.

Die dritte Gruppe erhielt eine totale Gastrektomie mit anschließender Ösophagojejunostomie. Diese Gruppe wird im Folgenden als Gastrektomie-Gruppe bezeichnet.

In der Kontrollgruppe sollte gezeigt werden, dass die Mäuse nicht aufgrund ihres Alters allein eine Entzündung im Ösophagus und eine Veränderung des Anteils der Zellen mit Zentrosomamplifikation entwickeln.

In der Ösophagotomie-Gruppe sollte der Verlauf der Zentrosomenveränderungen nach chirurgischem Eingriff untersucht werden. Dies geschah insbesondere, um bei den Tieren mit induziertem Reflux nach Gastrektomie und Ösophagojejunostomie zwischen Reflux-Folgen und Op-Folgen differenzieren zu können.

Nach unterschiedlichen Standzeiten von 6, 21, 42 und 168 Tagen wurde die Speiseröhre entnommen. Die maximale Standzeit von 24 Wochen erscheint in Relation zur Lebenserwartung der Maus von ca. 2 Jahren jedenfalls ausreichend lang um eine Karzinomentstehung zu beobachten.

Eine zusätzliche Untersuchung von drei Tieren ohne Operation sollte an Tag 1 erfolgen.

Tag	Kontrolltiere	Ösophagotomie	Gastrektomie
1	3		
6	3	3	7
21	3	3	7
42	3	3	7
168	3	3	7

Tabelle 1: Untersuchungsgruppen mit der geplanten Anzahl der zu untersuchenden Tiere nach unterschiedlichen Standzeiten.

Der entnommene Ösophagus wurde longitudinal in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde im Institut für Pathologie des Klinikum Bamberg (Chefarzt Prof. Dr. med. G. Seitz) gefärbt und histologisch untersucht, der andere Teil wurde der immunzytochemischen Untersuchung zugeführt. Hierzu wurde eine eigene Methode entwickelt, um die Epithelzellen des Ösophagus auf einem Objektträger aufzubringen. Mit Hilfe einer γ -Tubulin-Färbung sollte die Zentrosomenzahl und mit Hilfe einer FISH der Ploidiegrad der Zellen untersucht werden. Das gleiche Verfahren sollte in einer zweiten Phase auf p53-Ko-Mäuse angewandt werden, da man hier eine schnellere Karzinomentwicklung erwartete.

Bei den untersuchten wild type (wt)-Tieren handelte es sich um Mäuse des Typs C57BL/6, die von Charles River Laboratories (Wilmington, Massachusetts) bezogen wurden. Bei den p53-ko-Mäusen, die von der Firma Taconic (Lille Skensved, Dänemark) bezogen wurden, handelte es sich um den gleichen Typ (Model p53N5-T, homocyygot p53 ko). Zu Versuchsbeginn waren die Tiere 6-8 Wochen alt und wogen 20-25g.

Ein Antrag zur Durchführung der geplanten Tierversuche wurde am 02.06.2000 von der Kreispolizeibehörde des Saar-Pfalz-Kreises bewilligt.

Die Haltung der Mäuse erfolgte in den Räumen des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes (Prof. Dr. med. M. D. Menger).

Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn zu jeweils drei pro Käfig gehalten. Während der ersten postoperativen Tage wurden die Tiere einzeln in Käfigen gehalten, danach wieder zu drei Tieren pro Käfig. Die Haltung erfolgte auf Einstreu unter 12h Tag-Nacht-Rhythmus bei konstanter Temperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50%. Sie erhielten, außer an dem ersten postoperativen Tag, Wasser und Standardfutter ad libitum.

3.2 Operationsverfahren

Die Operationsverfahren erfolgten in mikrochirurgischer Technik. Die Tiere wurden mit Ketavet/Rompun als intraperitoneale Injektion narkotisiert. Nach Rasur der Bauchdecke erfolgt unter dem Operationsmikroskop unter sterilen Bedingungen eine mediane Laparotomie (vergleiche Abb. 2).

Gastrektomie und Ösophagojejunostomie:

Bei den Tieren, die eine Ösophagojejunostomie erhielten wurde der Magen mobilisiert und die Magengefäße wurden unter 7-0 Prolene-Ligaturen abgesetzt. Die Absetzung des Duodenums erfolgte nach Ligatur des Antrums scharf. Der Duodenalstumpf wurde erst mit einer Ligatur verschlossen, dann mit Einzelknopfnähten eingestülpt. Dann wurde der Magen am gastroösophagealen Übergang scharf abgesetzt. Es wurde eine Jejunalschlinge distal der Treitz'schen Flexur spannungsfrei zum Ösophagus geführt. Hier erfolgte die antimesenteriale Inzision des Jejunums. Die ösophagojejunale End-zu-Seit-Anastomose wurde mit 8-10 Einzelknopfnähten mit 8-0 Prolene durchgeführt (vergleiche Abb. 2). Während der Operation erfolgte wiederholt die Befeuchtung der intraperitonealen Organe mit 0,9% NaCl-Lösung, um ein Austrocknen und einen Volumenmangel zu verhindern. Am Operationsende wurde die Laparotomiewunde nach Spülung des Abdomens wieder fortlaufend verschlossen. Die Operationszeit betrug ca. 90 Minuten.



Abbildung 2: Operationssitus der Maus nach Mobilisierung des Dünndarms und nach Gastrektomie und ösophagojejunaler Anastomose.

Gastrektomie und Ösophagojejunostomie:

Ösophagotomie:

Bei den Tieren mit Wunde im distalen Ösophagus wurde analog verfahren. Sie erhielten nach Narkose und Laparotomie einen Längsschnitt über 5mm in den distalen Ösophagus. Es wurde lediglich Tunica adventitia, Tunica muscularis und Tela submucosa durchtrennt. Die Tunica mucosa wurde nicht tangiert. Somit wurde das Lumen des Ösophagus nicht eröffnet. Anschließend erfolgte eine Naht mit Prolene 8-0 mit drei Einzelknopfnähten.

Entnahme des Ösophagus:

An dem vorgesehenen Untersuchungstag wurden die Tiere erneut mit Ketavet/Rompun narkotisiert. Nach Darstellung der ösophagojejunalen Anastomose wurde der Ösophagus nach kranial freipräpariert und schließlich unter Mitnahme der Anastomose entnommen.

Nach der Entnahme wurde der Ösophagus der Länge nach in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde in Formalin fixiert und dem Pathologen zur histologischen Untersuchung zugesandt. Bei der anderen Hälfte wurde das Epithel mikroskopisch von der Muscularis mucosae abgelöst und in einen gastralen, mittleren und oralen Abschnitt unterteilt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Segmente in Reaktionsgefäßen mit einer PBS-Lösung, die Antibiotika (P/S 5%, siehe Anhang) enthielt, aufbewahrt. Die molekularbiologische Untersuchung konzentrierte sich später auf den gastralen, respektive auf den nahe der

Anastomose gelegenen Abschnitt, da hier am Ehesten mit Veränderungen gerechnet werden konnte (Fein 1999).

3.3 Zellpräparation

Die zur molekularbiologischen Charakterisierung der Zellen *ex vivo* notwendige Zellpräparation erfolgte unmittelbar nach der Entnahme des Ösophagus. Ziel der Zellpräparation war das Erhalten vereinzelter Zellen, die dann den Färbungen zugänglich waren. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass die Zellen die tatsächliche Situation im Gewebe widerspiegeln und nicht durch Artefakte, wie sie zum Beispiel bei Zellkulturen durch die Dauer der Kultivierung entstehen können, verfälscht wurden. Das Trennen der Zellen erfolgte zunächst mechanisch und dann enzymatisch.

Die drei Teile des Ösophagus wurden jeweils mit einem Skalpell soweit möglich zerkleinert. Mit Hilfe einer Pipette und 1 ml einer PBS-Lösung wurden die Gewebestücke aufgenommen und in Eppendorf Reaktionsgefäßen gesammelt. Nach Zentrifugation (5 min; 1500 U/min) erhielt man so ein weißliches Pellet, das gerade den Boden des Reaktionsgefäßes bedeckte. Der Überstand wurde abpipettiert. Das Pellet wurde in 1 ml Trypsin/EDTA aufgenommen und resuspendiert.

Zum Gewebeverdauer wurden die Reaktionsgefäße für 15 min in ein Wasserbad mit 37°C eingestellt und alle fünf Minuten leicht geschüttelt. Im Anschluss erfolgte erneut eine Zentrifugation (1500 U/min, 5 min) und der Überstand wurde nachfolgend abpipettiert. Das Pellet wurde erneut in 1 ml PBS resuspendiert, um die Zellen zu waschen. Es wurde nochmals zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 100 µl entfernt. In diesen verbleibenden 100 µl wurden die Zellen mit Hilfe der Pipette resuspendiert und auf gereinigte Glasobjektträger aufgetragen. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und anschließend zum Fixieren der Zellen 5 min in eine Küvette mit 4% Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur unter Schütteln eingestellt.

Zum Waschen wurden die Objektträger 5 min in eine Küvette mit PBS gestellt und dann zum Entwässern durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit 70, 80 und 96% Alkohol für je 5 min geführt. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und schließlich mit Glycerin/PBS 9:1 eingedeckt. Sie wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.4 Immunzytochemische Färbungen

Bei unseren Versuchen kam eine indirekte Färbemethode zum Einsatz. Hierbei bindet ein primärer unkonjugierter Antikörper an ein bestimmtes Antigen im Zytosol. In einem zweiten Schritt wird ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, der dann an das Fab-Fragment des primären Antikörpers bindet. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Dieser kann mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und dadurch sichtbar gemacht werden. Eine Signalverstärkung wird dadurch erreicht, dass mehrere sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden (vergleiche Abb. 3).

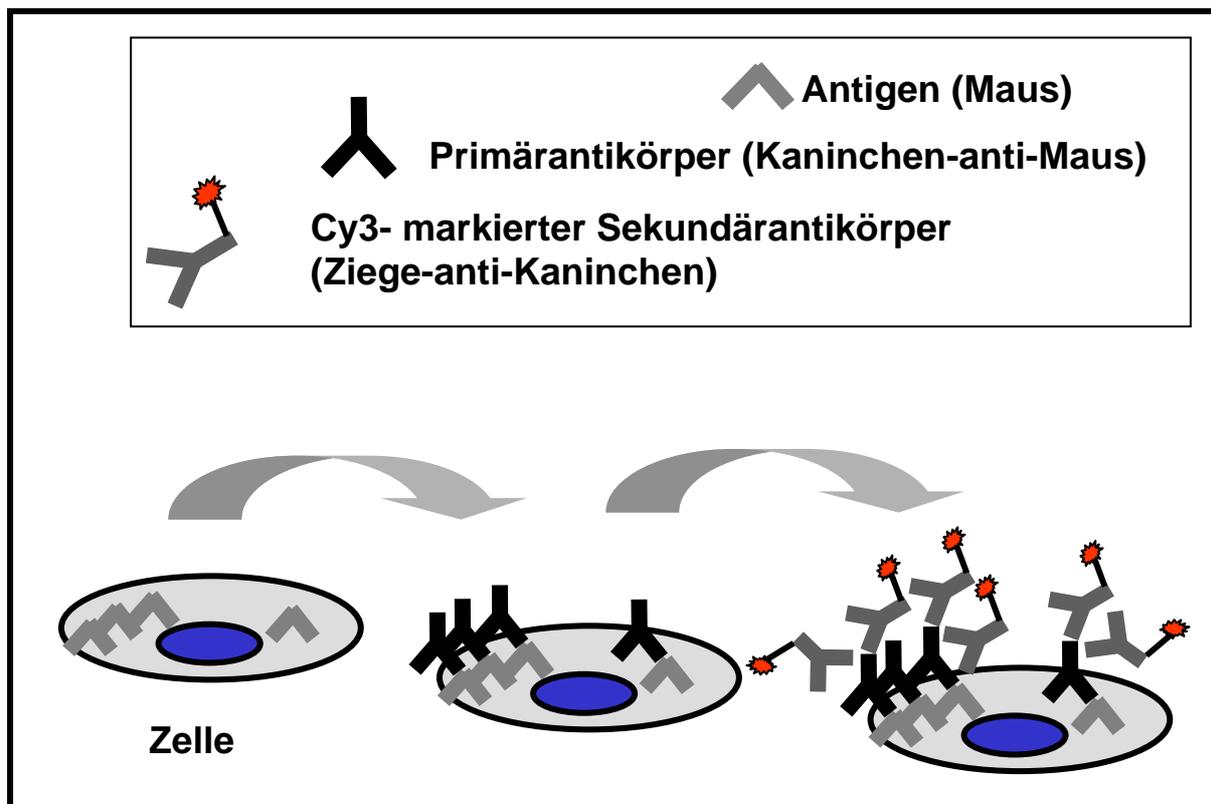


Abbildung 3: Prinzip der indirekten immunzytochemischen Färbemethode.

Es wurden Färbungen gegen drei Proteine durchgeführt: γ -Tubulin, Perizentrin und p53. Die Präparate wurden zunächst ausgedeckt und zum Entfernen des Eindeckmediums dreimal fünf Minuten in PBS/Tween 0,1% eingestellt. Dann wurden die Präparate mit 75 μ l BSA unter einem Deckglas bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Daran anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, je nach Antikörper in unterschiedlicher Verdünnung in BSA. Sämtliche primären Antikörper waren Kaninchen-Antikörper.

Daraufhin wurden die Objektträger nochmals dreimal 5 min in PBS/Tween 0,1% gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer

inkubiert. Der sekundäre Antikörper war in jedem Fall ein Cy3-markierter anti-Kaninchen-Antikörper (Cy3 conjugated Affinity Purified anti-Rabbit IgG[Goat], Rockland, Pennsylvania, USA). Dieser bindet an die Kaninchen-Epitope des Primärantikörpers. Er wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Inkubation mit 75 µl pro Objektträger in der feuchten Kammer bei RT erfolgte über 60min.

Nach Waschungen 3 mal 5 min in PBS/Tween 0,1% wurde 5 min unter Schütteln in frischem 4% Paraformaldehyd in PBS bei RT nachfixiert. Nach erneuter Waschung wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt und nach dem Trocknen mit Antifade, das 1 mg/ml DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindoldihydrochlorid) enthielt, eingedeckt. Antifade konserviert die Signalintensität, DAPI dient als blaue Kern-Gegenfärbung.

Primäre Antikörper:

Polyklonaler Antikörper gegen γ -Tubulin:

Dieser polyklonale Antikörper (Polyclonal Antibody against γ -Tubulin, BAbCO, Kalifornien, USA) ist gegen eine Peptid-Sequenz am C-terminalen Ende des menschlichen γ -Tubulins gerichtet. γ -Tubulin ist ein fester Bestandteil des Zentrosoms und dort in jeder Zellzyklusphase nachweisbar (Joshi et al., 1992; Komarova et al., 1997). Zheng et al. (1991 und 1995) konnten weiterhin nachweisen, daß γ -Tubulin wesentlicher Bestandteil des γ -Tubulin-ring-complex (γ TuRC) ist und somit Ausgangspunkt der Mikrotubuli-Entstehung ist. Trotz ausgiebiger Versuche mit unterschiedlichen Verdünnungen, unterschiedlichen Inkubationszeiten und modifizierten Waschungen gelang es uns leider nicht, eine ausreichende spezifische Färbung zu erzielen, die eine quantitative Auswertung ermöglichte.

Polyklonaler Antikörper gegen Perizentrin:

Dieser Antikörper (Polyclonal Antibody Against Pericentrin, BAbCO, Kalifornien, USA) erkennt das Protein Perizentrin von Wirbeltieren, Insekten, Ziliaten und Amöben. Zum ersten Mal wurde Perizentrin 1994 von Doxsey et al. beschrieben. Es handelt sich um ein 220 kD schweres Protein, das im Wesentlichen eine coiled-coil-Struktur aufweist. Die Autoren zeigten, dass Perizentrin ebenfalls an der Entstehung der Mikrotubuli beteiligt ist, wenn auch nicht in gleichem Ausmaß wie γ -Tubulin. Fukasawa hat 1996 bestätigt, dass sämtliche Zentrosomen mit einem Perizentrinantikörper markiert werden können, unabhängig davon, ob es sich um funktionsfähige oder überzählige Zentrosomen handelt. Wir verwendeten diesen Antikörper, um die Zentrosomenzahl pro Zelle zu bestimmen. Er wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt und während 1 h bei RT inkubiert.

Dicthenberg et al. (1998) konnten zeigen, dass es sich bei Perizentrin um ein Strukturprotein handelt, welches in Gitterform um die Zentriolen herum lokalisiert ist und Teil des

perizentriolären Materials ist. Im Verlauf der Interphase nimmt der Gehalt an Perizentrin im Zentrosom zu. Eine quantitative Bestimmung des Perizentringehaltes stand uns nicht zur Verfügung, sodass wir bei unserer Auswertung lediglich zwischen einem Signal, einem Doppelpunkt-förmigen Signal und zwei Signalen unterschieden. Ab der Zellzyklusphase G2 wird angenommen, dass sich die Zellen in Proliferation befinden, d.h. in die Mitose eintreten. Das mikroskopische Äquivalent sind in diesem Fall Zellen mit Doppelpunkt-förmigen Signal für die Phase G2 und Zellen mit zwei Signalen für die Mitose. Mehr als zwei Signale wurden als Zentrosomamplifikation gewertet. Einen Überblick über den Zusammenhang zwischen Zellzyklusphase und mikroskopischem Bild nach Färbung mit dem Perizentrin-Antikörper gibt Abbildung 4.

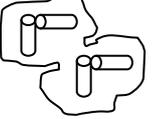
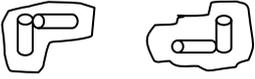
Zellzyklus	Zentriolen und perizentrioläre Matrix	Mikroskopisches Bild	
Interphase	G1		
	S		
	G2		
Mitose			

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zentrosoms und mikroskopisches Bild nach immunzytochemischer Färbung mit Perizentrin-Antikörper (Dichtenberg et al., 1998, abgewandelt).

Aufgrund der geringen Zellmengen pro Objektträger mussten die Zellen unter dem Mikroskop oftmals zunächst mit 400-facher Vergrößerung aufgesucht werden, um dann mit 1000-facher Vergrößerung beurteilt zu werden. Pro Objektträger wurden ca. 200 Zellen mit spezifischem Signal nach Perizentrin-Färbung ausgewertet. Etwa die gleiche Anzahl Zellen fand sich pro Objektträger ohne spezifisches Signal.

Antikörper gegen p53:

Der p53 Antikörper wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Montenarh (Medizinische Biochemie, Universität des Saarlandes, Homburg) überlassen. Er wurde in einer Konzentration von 1:1000 eingesetzt und 12-16h inkubiert. Das Auftreten von p53 sollte weitere Hinweise auf eine Tumorentstehung als Folge der Entzündung liefern.

3.5 DNA-DNA-Fluoreszenz in situ-Hybridisierung

Bei der in situ-Hybridisierung bindet eine DNA-Sonde an ihre Target-DNA und dient somit dem Nachweis von bestimmten DNA-Abschnitten im Genom. Die Technik wurde zunächst mit radioaktiv markierten Sonden etabliert, dann erfolgten Anwendungen mit nicht radioaktiv, sondern enzymatisch markierten Sonden.

In dieser Studie kam eine biotin-markierte Sonde zum Einsatz. Das Biotin konnte dann mit Streptavidin, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, sichtbar gemacht werden.

Die Durchführung der FISH sollte in dieser Studie der Bestimmung des Plodiegrades der Zellen dienen. Es kam eine Sonde zum Einsatz, die die Zentromere aller 40 Mausechromosomen erkennt und dort spezifisch bindet (Biotin-labelled mouse pan-centromeric probe; Cambio, Cambridge, UK).

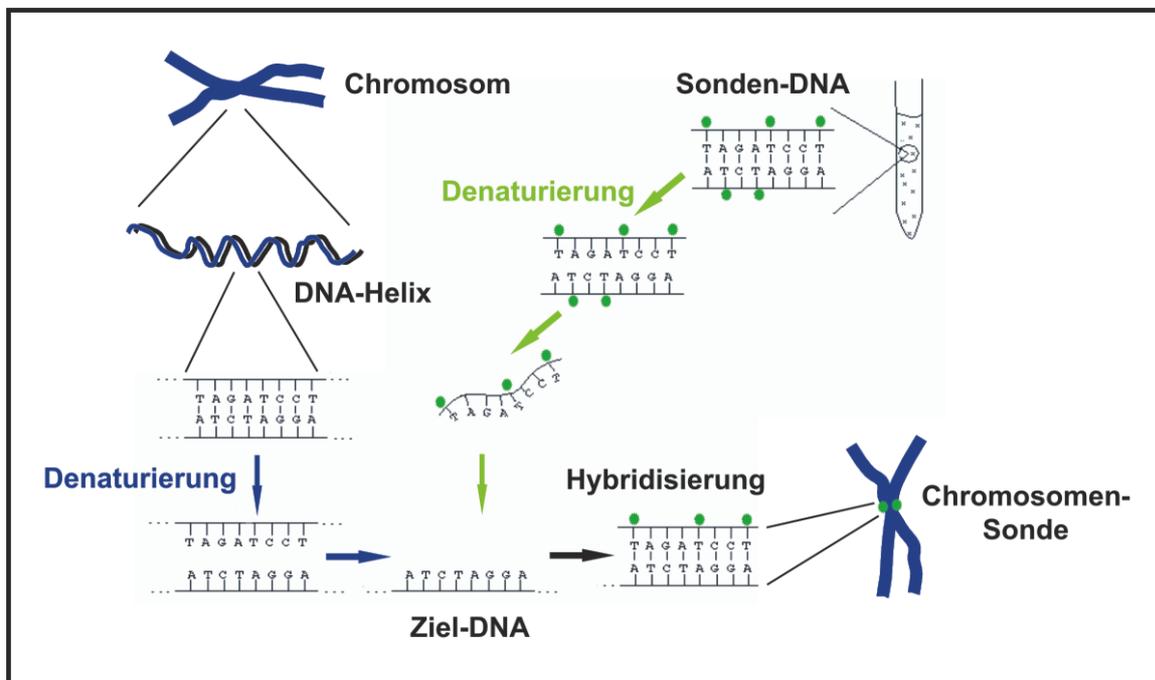


Abbildung 5: Schematische Darstellung der FISH.

1. Vorbehandlung:

Die Objektträger wurden zunächst ausgedeckt, 10 min in PBS eingestellt und anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit 70, 80 und 96% Ethanol geführt und luftgetrocknet. Um störende RNA zu eliminieren, erfolgte zunächst ein RNA-Verdau. Dazu wurden die Objektträger mit 75 µl RNase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) der Konzentration 100 µg/ml in 2xSSC unter einem Deckglas eingedeckt und für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Zum Waschen wurden die Objektträger dreimal 5 min in 2xSSC eingestellt, dann durch eine aufsteigende Alkoholreihe (EtOH; 70%, 80%, 96%) geführt und getrocknet. Nach dem Trocknen konnte die Hybridisierung erfolgen.

8µl der Sonde wurden auf ein kleines Deckglas (18 mm x 18 mm) aufpipettiert und mit dem Objektträger aufgenommen. Um ein Verdunsten der Sonde zu verhindern, wurde der Deckglasrand luftdicht mit Fixogum (Marabuwerke, Tamm, Deutschland) verschlossen.

2. Hybridisierung:

Die so vorbereiteten Objektträger wurden dann lichtgeschützt für 10 min bei 85°C auf eine Heizplatte gelegt, um die zu hybridisierende Sonden-DNA und die Target-DNA simultan zu denaturieren. Die Hybridisierung erfolgte dann mindestens 14 h bei 45°C in einer feuchten Kammer. Um eine gleichmäßige Verteilung der Sonde zu erreichen wurden die Objektträger horizontal mit der Oberfläche nach unten gelagert.

3. Stringenzwaschung

Für die Qualität und Intensität der resultierenden Fluoreszenzsignale ist neben den Hybridisierungsbedingungen auch die Stringenz der Waschungen verantwortlich. Nach Beendigung der Hybridisierung wurde wie folgt vorgegangen. Nach dem Entfernen der Deckgläser erfolgte die Stringenzwaschung mit einer Passage von dreimal 5 min in 50% Formamid/2xSSC bei 45°C und zweimal 5 min in 2xSSC bei RT. Daran schloss sich eine Inkubation der Objektträger für 30 min mit Blocking Reagenz bei 37°C in einer feuchten Kammer an. Hierdurch wurden störende Proteine und zelleigenes Biotin abgeblockt, um unspezifische Bindungen des Streptavidin zu verhindern.

4. Detektion

Es folgte die Detektion der biotinylierten Sonde. Dazu wurden die Präparate mit 75 µl Streptavidin-FITC (Vector/Camon, Wiesbaden, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:250 in Blocking Reagenz eingedeckt und 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert.

Danach folgte noch ein dreimaliges Waschen der Objektträger für je 5 min in 4xSSC/Tween 0,5% und eine aufsteigende Alkoholreihe. Nach dem Lufttrocknen wurden die Zellen mit Antifade/DAPI eingedeckt.

3.6 Auswertung der Fluoreszenzsignale

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Tatsache, dass bestimmte Fluochrome durch Licht mit spezifischer Wellenlänge angeregt werden können und dann Licht einer anderen Wellenlänge emittieren. Das verwendete Mikroskop (Zeiss, Axioskop 2, vergleiche Abb. 6) wird zur Fluoreszenzmikroskopie als Auflichtmikroskop eingesetzt. Als Lichtquelle dient eine Quecksilberdampfhochdrucklampe. Emittiertes Licht gelangt durch eine Blende zum Filterwürfel. Der Filterwürfel wird nach Bedarf gewechselt und bestimmt, mit welcher Wellenlänge das Objekt angeregt wird und welche Wellenlänge letztlich das Auge erreicht. Er besteht aus einem Anregungsfilter, einem Teilerspiegel und einem Emissionsfilter. Der

Teilerspiegel ist so gewählt, dass er die anregende Wellenlänge in Richtung Objektiv, respektive fluoreszierende Probe, spiegelt, die emittierte Wellenlänge jedoch Richtung Okular passieren lässt. Objektiv und Okular entsprechen den für Lichtmikroskopie gebräuchlichen.

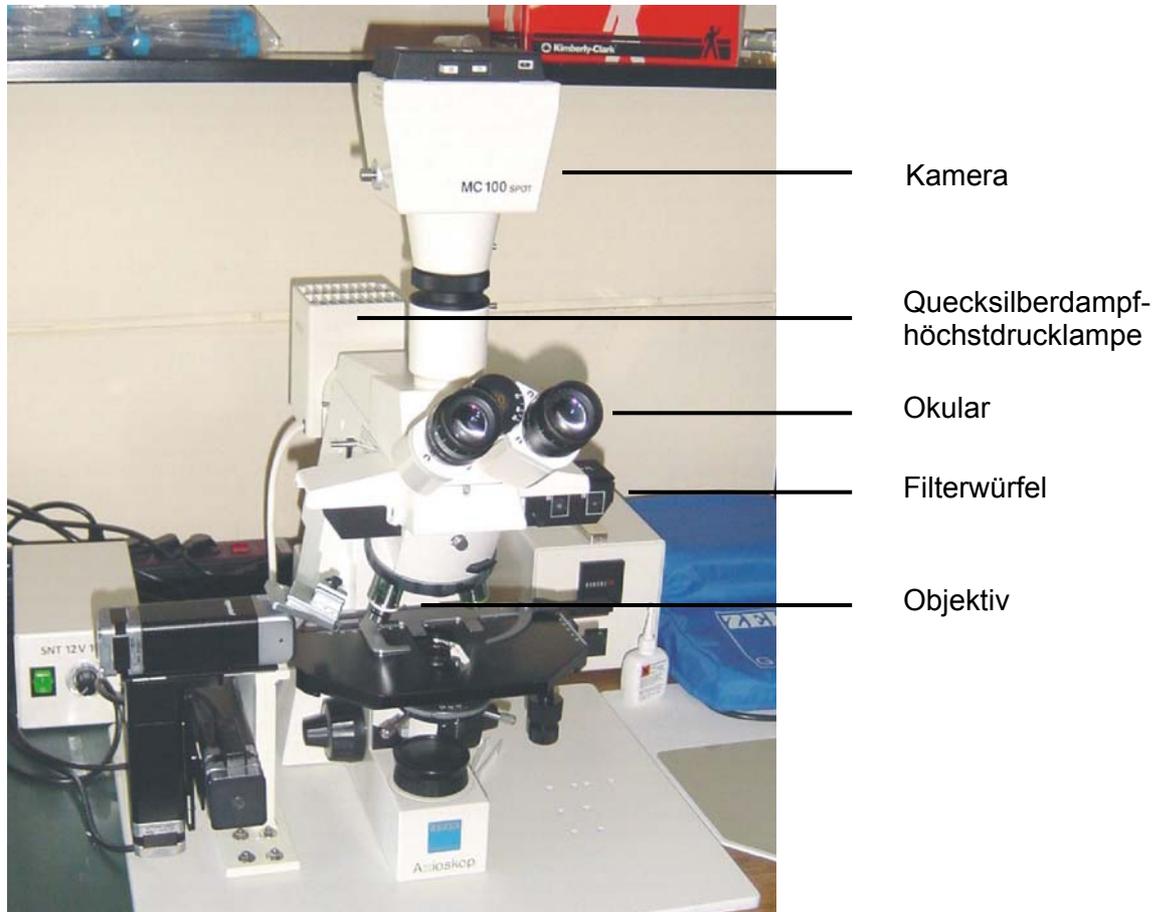


Abbildung 6: Axioskop I, Auflichtmikroskop, Zeiss.

3.7 Histologie

Die zur histologischen Untersuchung vorgesehenen Teile des entnommenen Ösophagus wurden zunächst in Formol (10%ige Formalinlösung, 4% Formaldehyd) fixiert und zur Färbung und Beurteilung in das Institut für Pathologie des Klinikums Bamberg versandt. Die histopathologische Untersuchung nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung ergab eine Einteilung in fünf Gruppen.

Bei einem Normalbefund fand sich verhornendes Plattenepithel mit 4 bis 7 Zelllagen. Das Epithel hatte eine Höhe von ca. 40 μm mit einer ca. 10 μm dicken Verhornungsschicht.

Bei Tieren mit induziertem Reflux von Galle und Pankreas-Sekreten zeigte sich zunächst verbreitertes Plattenepithel von ca. 140 bis 190 µm Höhe mit einer Verhornungsschicht von ca. 20 µm bis 25 µm, ohne dass Kriterien einer Entzündung festgestellt werden konnten.

Die Einteilung in geringe Ösophagitis, mäßige Ösophagitis und kräftige Ösophagitis wurde durch dem Pathologen vorgenommen. Entscheidungskriterien waren die Tiefe und Anzahl der gefundenen Erosionen und das Auftreten von lymphozytären Infiltraten (vergleiche Abb 7).

Ferner floss die vertikale Ausdehnung der Entzündung in den betroffenen Wandschichten und das Auftreten von intramuralen Abszessen in die Beurteilung mit ein.

Unabhängig von Reflux-induzierten Veränderungen wurde bei den operierten Tieren eine Entzündungsreaktion im Bereich der Anastomosennaht gefunden. Histologisch handelte es sich um eine granulomatöse Entzündung im Sinne einer Fremdkörperreaktion.

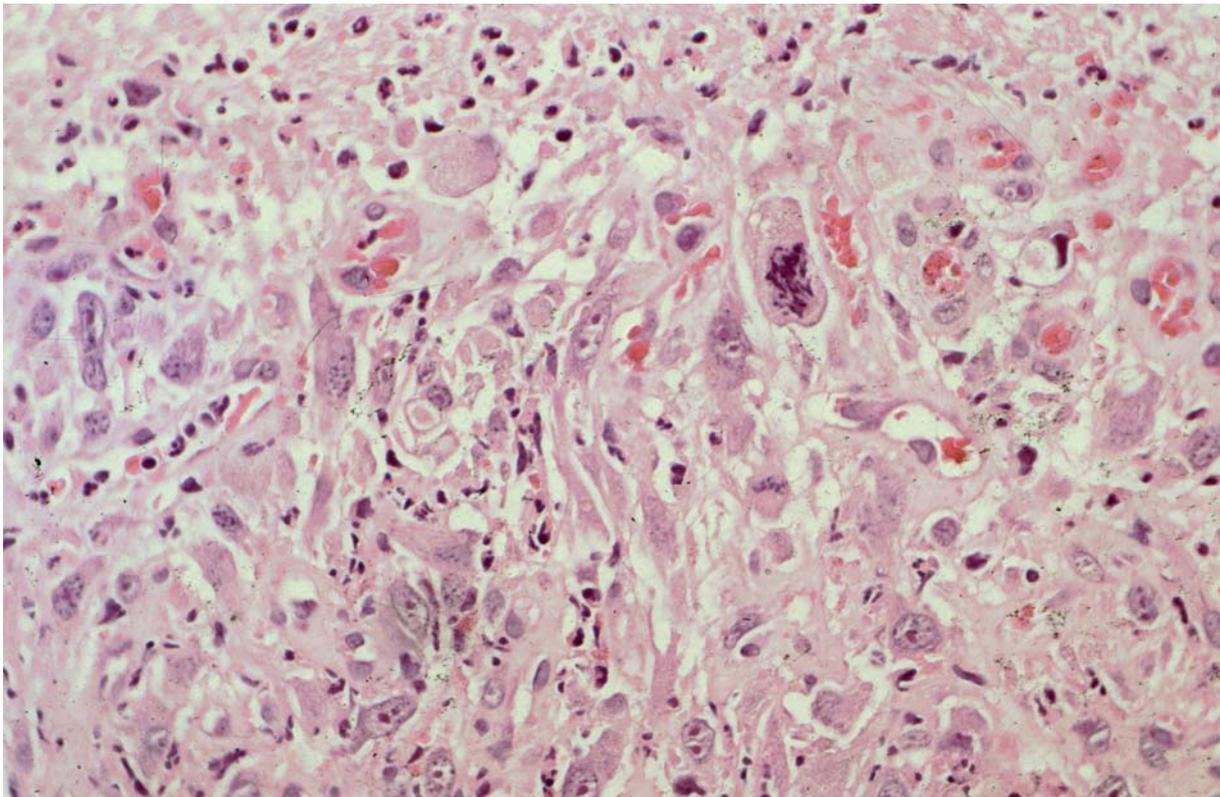


Abbildung 7: Granulationsgewebe mit lymphozytären Infiltraten (Färbung Hämatoxylin-Eosin, Bild zu Verfügung gestellt von Professor Seitz, Institut für Pathologie, Bamberg)

3.8 Statistik

Die Ergebnisse der Zentrosom-Färbung mit dem Perizentrin-Antikörper wurden statistisch ausgewertet. Hierzu wurde SigmaStat for Windows Version 3.0 von SPSS (Chicago, USA)

verwendet. Die statistischen Werte sind Ergebnis einer Varianz-Analyse mit post hoc-Test nach der Holm Sidak-Methode.

4. Ergebnisse

4.1 Histologie

Tag	Untersuchungs- Gruppen	Tier- Anzahl	Keine Ösophagitis	Ösophagitis			Fremdkörper- Reaktion
				leicht	mäßig	kräftig	
1	Kontrollen	6	6				
6	Kontrollen	3	3				
	Ösophagotomie	3	3				
	Gastrektomie	7	3	2	1	1	6
21	Kontrollen	4	4				
	Ösophagotomie	2	2				2
	Gastrektomie	7		5	2		6
42	Kontrollen	3	2	1			
	Ösophagotomie	3	3				
	Gastrektomie	8	2	3		3	6
168	Kontrollen	3	3				
	Ösophagotomie	3	2	1			1
	Gastrektomie	8	4	1		3	3

Tabelle 2: Tabellarische Übersicht über die histologischen Befunde des Magen-nahen, resp. Anastomosen-nahen Ösophagusdrittels aller Tiere.

Die Differenz zwischen geplantem Gruppenumfang und tatsächlich untersuchter Anzahl Tiere ergibt sich daraus, dass ein Teil der Tiere für die Entwicklung der molekularbiologischen Färbemethoden verwendet werden musste und keine Ergebnisse geliefert hat, während die histologische Auswertung von Beginn an alle Tiere erfasst hat. Die von Seiten der molekularbiologische Untersuchung unvollständigen Gruppen wurden ergänzt und zusätzlich histologisch untersucht.

Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe ohne Operation wurden 19 Tiere untersucht. Dabei fand sich bei einem Tier (5,3%) eine leichtgradige Refluxösophagitis ohne Erosionen, aber mit transmuraler Entzündung.

Die übrigen 94,7% der Tiere (18/19) zeigten einen Normalbefund.

Tiere nach Ösophagotomie

In der Gruppe der Tiere mit Schnitt und Naht im distalen Ösophagus wurden 11 Tiere untersucht. Eine Refluxösophagitis fand sich ebenfalls bei einem Tier (9,1%) nach einer Standzeit von 168 Tagen.

27,3% der Tiere (3/11) zeigten unter dieser Behandlung eine Fremdkörperreaktion mit granulomatöser Entzündung um das Nahtmaterial, davon eines an Tag 168 und zwei an Tag 21. 63,6% der Tiere (7/11) nach Schnitt im Ösophagus zeigte einen Normalbefund.

Tiere nach Gastrektomie und Ösophagojejunostomie

Nach Gastrektomie und Ösophagojejunostomie wurden 30 Tiere untersucht. Bei dieser Gruppe kam es häufig zu einer granulomatösen Entzündung im Bereich des Nahtmaterials im Sinne einer Fremdkörperreaktion. Insgesamt waren 70% der Tiere (21/30) hiervon betroffen.

Betrachtet man die einzelnen Untersuchungstage zeigt sich ein vergleichsweise hoher Anteil mit 85,7% betroffenen Tieren an Tag 6 (6/7) und an Tag 21 (6/7). An Tag 42 nimmt der Anteil auf 75% (6/8) ab. An Tag 168 sind nur noch 37,5% der Tiere (3/8) betroffen. Eine Gegenüberstellung der entzündlichen Veränderungen aufgrund der Fremdkörperreaktion und aufgrund des Reflux stellt Abbildung 8 dar.

In der Gruppe der gastrektomierten Tiere, bei denen eine Reflux-induzierte Entzündung mit Metaplasie und Dysplasie erwartet wurde, konnten Reflux-bedingte Veränderungen nachgewiesen werden. Histopathologisches Korrelat des Reflux war im beobachteten Zeitraum eine Verbreiterung des Plattenepithels und eine Zunahme der Dicke der Verhornung. Des weitern fand sich bei den Tieren mit Reflux eine Basalzellhyperplasie. Lymphozyteninfiltrationen und Erosionen des Epithels waren Zeichen einer Refluxösophagitis. Eine Metaplasie mit z.B. zylindrischem Dünndarmepithel konnte im distalen Ösophagus jedoch nicht beobachtet werden.

An Untersuchungstag 6 litten 57,1% der Tiere (4/7) an einer Ösophagitis. Von diesen 4 Tieren hatten 2 eine leichte Ösophagitis (28,6%) und je eine Maus (14,3%) eine mäßige und eine kräftige Ösophagitis.

Reflux-induzierte Entzündungen des Ösophagus fanden sich an Tag 21 bei allen 7 untersuchten Tieren (100%). Fünf Tiere (71,4%) erlitten eine leichte Ösophagitis, zwei Tiere (28,6%) erlitten eine mäßige Ösophagitis.

An Tag 42 wurden 8 Tiere untersucht. 75% der Tiere (6/8) erlitten eine Ösophagitis. Drei Tiere hatten eine leichte Ösophagitis, drei Tiere eine kräftige (je 37,5%).

Die Untersuchungen an Tag 168 ergaben Ösophagitiden in 50% der Fälle (4/8). Hiervon erlitt eine Maus eine leichte Ösophagitis, 37,5% der Tiere (3/8) erlitten eine kräftige Refluxösophagitis.

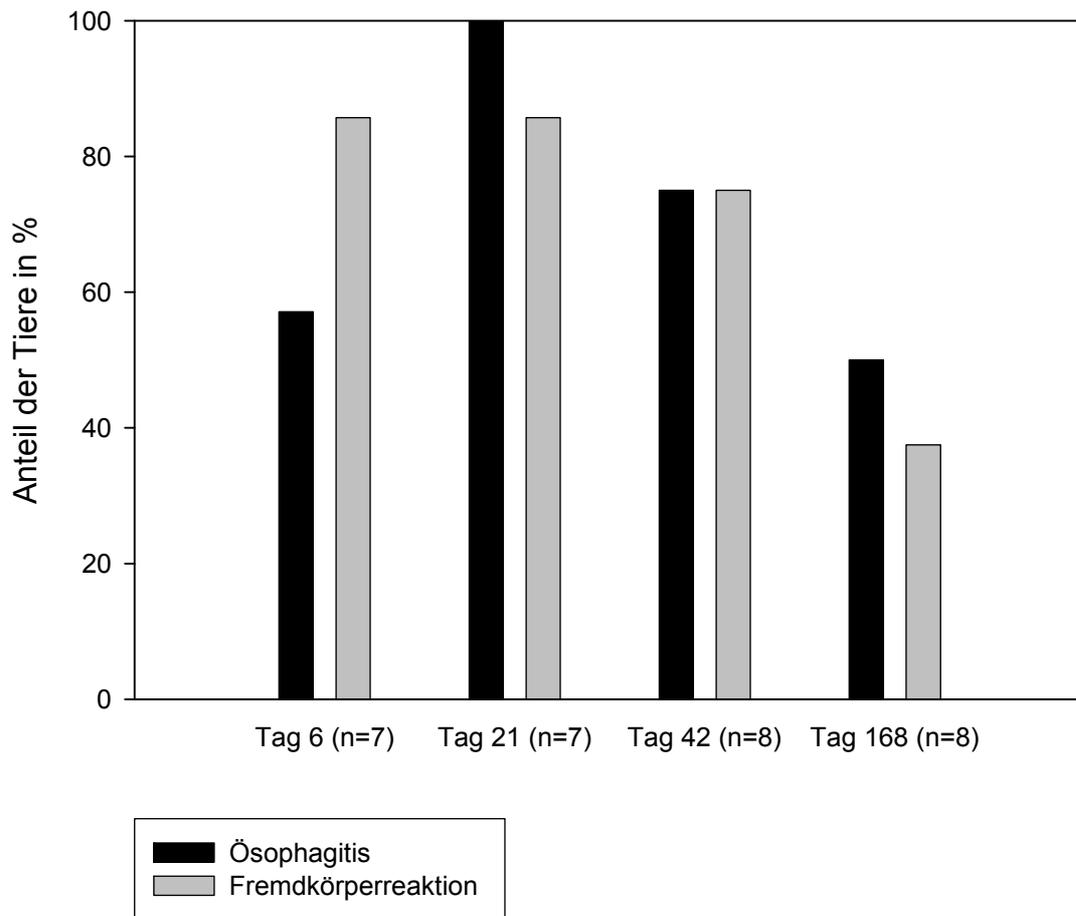


Abbildung 8: Anteile der Tiere mit Ösophagitis und Fremdkörperreaktion nach Gastrektomie und Ösophagojejunostomie.

4.2 Immunzytochemische Färbungen

Insgesamt standen Zellpräparate von 63 Tiere zur immunzytochemischen Färbung zu Verfügung. In der Kontrollgruppe ohne chirurgische Intervention befanden sich 19 Tiere. Hiervon wurden drei Tiere verwendet, um die Zellpräparation zu optimieren, die Antikörperkonzentrationen und letztlich einen Antikörper zu finden, der die quantitative Analyse ermöglicht.

Weitere zwei Tiere aus der Gruppe der gastrektomierten Tiere wurden für die Etablierung der Färbemethode verwendet. Betroffen waren das erste Tier an Tag 21 und das erste Tier an Tag 42. In dieser Gruppe stand ein Reservetier an Tag 42 und 168 zu Verfügung, sodass insgesamt 26 Tiere nach Gastrektomie und Ösophagojejunostomie untersucht werden konnten.

In der Gruppe der Tiere mit Ösophagotomie befanden sich 11 Tiere, wobei ein Tier vor dem Entnahme-Zeitpunkt verstarb (Tag 21).

Zusätzlich zu diesen Tieren wurden exemplarisch zwei p53-ko-Mäuse untersucht, um das Versuchssetup auch an ko-Tieren zu demonstrieren.

4.2.1 Zentrosomenfärbung mit Perizentrin-Antikörper

Die Anzahl der mit dem Perizentrin-Antikörper untersuchten Mäuse in den unterschiedlichen Gruppen zu den geplanten Untersuchungstagen gibt Tabelle 3 wieder.

Tag	Kontrollen	Ösophagotomie	Gastrektomie
1	4		
6	3	3	5
21	3	2	6
42	3	3	7
168	3	3	8

Tabelle 3: Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe.

Insgesamt wurden 16967 Zellen auf 53 Objektträgern nach Färbung mit dem Perizentrin-Antikörper beurteilt. Bei 9689 Zellen fand sich ein spezifisches Signal. Bei den 7278 Zellen ohne spezifisches Signal muss davon ausgegangen werden, dass der Fehler in der Zellpräparation oder der Färbung lag, da frühere Arbeiten gezeigt haben, dass Perizentrin in allen Phasen des Zellzyklus nachweisbar ist. Dargestellt sind ausschließlich die Ergebnisse für den gastralen, resp. Anastomosen-nahen Abschnitt des Ösophagus. Die beiden übrigen Abschnitte waren histologisch unauffällig und wurden daher nicht standardmäßig untersucht. Exemplarische Färbungen dieser Abschnitte zeigten keine Auffälligkeiten.

Die detaillierten Ergebnisse aller mit dem Perizentrin-Antikörper untersuchten Präparate, die auch die Grundlage der folgenden statistischen Auswertung sind, sind im Anhang, Kapitel 6.4 Tabellen, aufgeführt.

In Anlehnung an den Zellzyklus sind im Folgenden die Ergebnisse der Perizentrin-Färbung in der Reihenfolge 1 Signal, Doppelpunktförmiges Signal und zwei auseinander liegende Signale dargestellt. Zuletzt sind die Ergebnisse für drei Signale und mehr aufgeführt.

Zellen mit einem Signal für Perizentrin

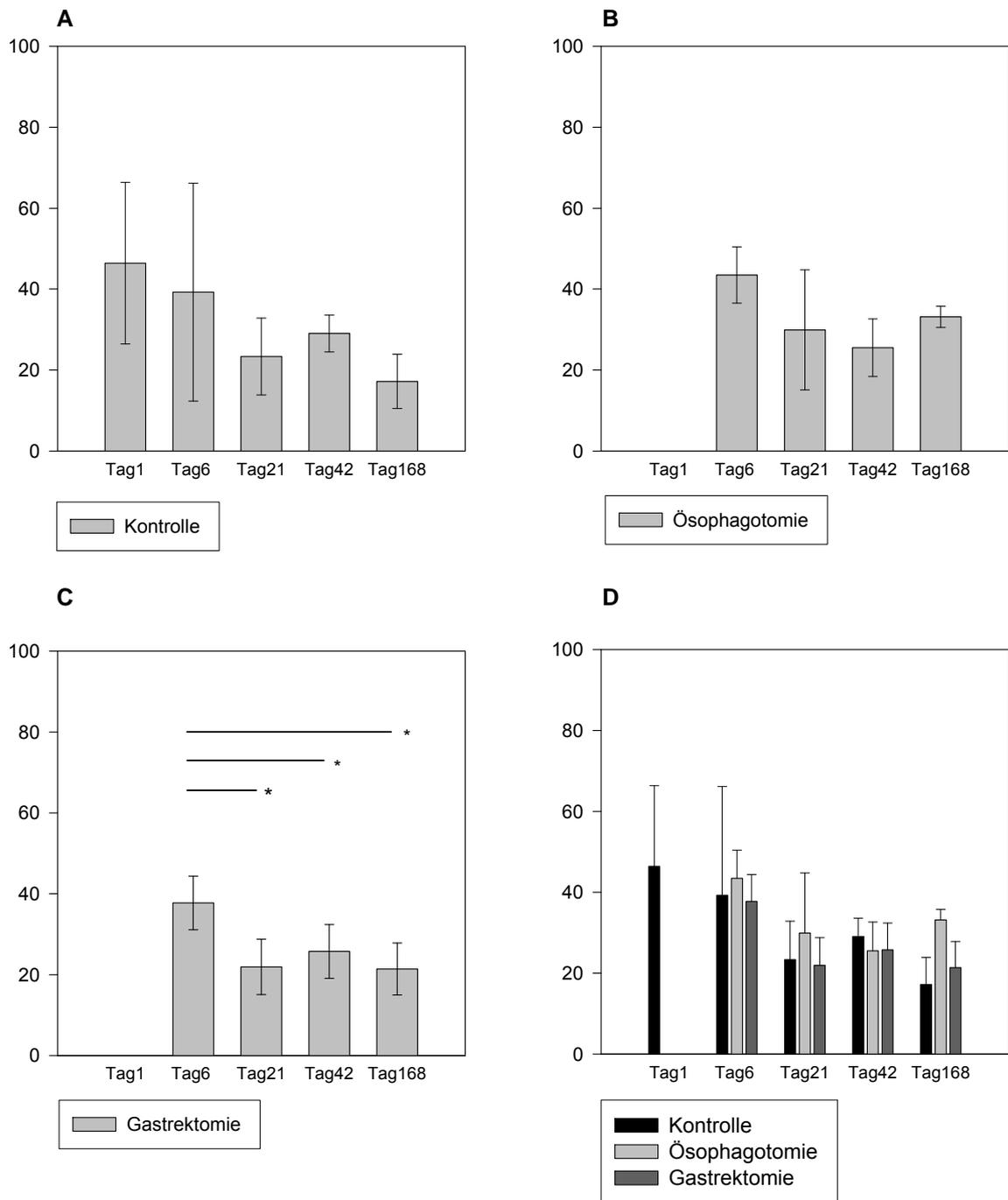


Abbildung 9: Mittelwerte der Zellen mit einem Signal in Prozent aller Zellen mit Standardabweichung

A: Kontrolltiere. **B:** Tiere mit Ösophagotomie. **C:** Tiere nach Gastrektomie (* $p < 0,001$). **D:** Alle drei Gruppen nebeneinander.

Zellen mit einem Signal (vergleiche Abb. 15) sind Zellen in denen sich nur ein Zentrosom befindet. Die Zelle befindet sich in der Interphase (G₀, G₁ oder S-Phase) des Zellzyklus. An Tag eins betrifft dies durchschnittlich 46,41% ($s=19,9$) der Tiere. Dies ist der höchste Wert für das Untersuchungsmerkmal „ein Signal“ überhaupt.

An Untersuchungstag sechs ergeben sich für alle drei Gruppen ähnlich Werte. In der Kontrollgruppe liegt der Wert bei 39,26% (s=26,9), in der Gruppe mit Ösophagotomie beträgt der Wert 43,47% (s=6,94) und in der Gruppe der gastrektomierten Tiere ist der Anteil 37,74% (s=6,63). Hierbei ergeben sich an Tag 6 keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen.

In der Kontrollgruppe ohne chirurgische Intervention nimmt die Anzahl der Zellen mit einem Signal im weiteren Verlauf ab. Das niedrigste Ergebnis ergibt sich für Untersuchungstag 168 mit 17,19% (s=6,69). In der Gruppe der Tiere mit einer Wunde im Ösophagus findet sich der niedrigste Wert an Untersuchungstag 42: 25,52% (s=7,12). An Tag 168 steigt in dieser Gruppe der Wert nicht-signifikant auf 33,13% an (s=1,51).

In der Gruppe der gastrektomierten Tiere sind die Ergebnisse aller folgenden Untersuchungstage im Vergleich zu dem Ergebnis von Tag sechs signifikant niedriger. An Tag 21 beträgt der Anteil der so gefundenen Zellen nur noch 21,93% (s=6,85, $p < 0,001$). An Untersuchungstag 42 beträgt der Anteil 24,6% (s=6,66, $p < 0,001$). Der niedrigste Anteil findet sich an Tag 168 mit 21,4% (s=6,41, $p < 0,001$).

Im Vergleich der drei Gruppen an den einzelnen Untersuchungstagen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Zellen mit Doppelpunkt-förmigem Signal für Perizentrin

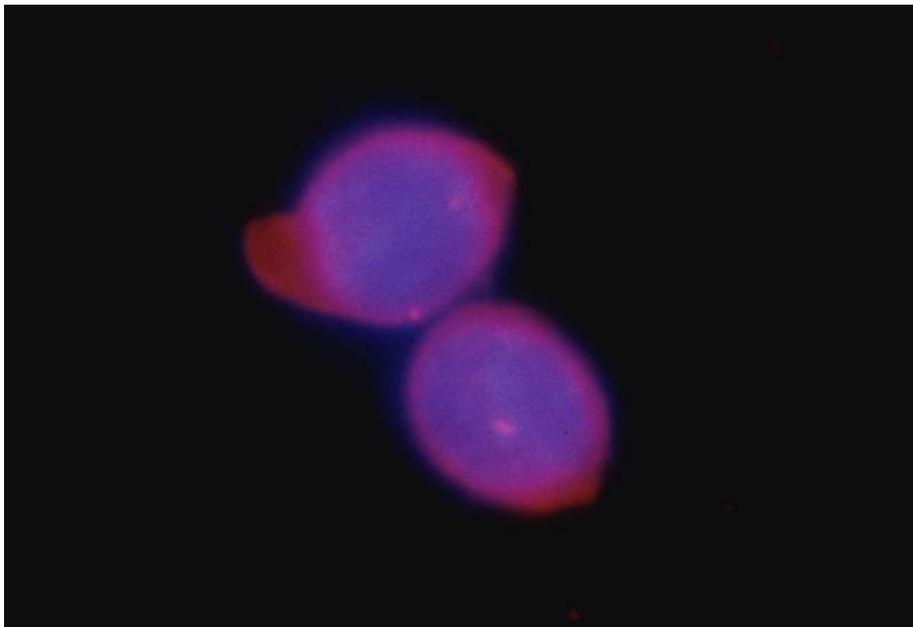


Abbildung 10: Zelle mit zwei Signalen (oben), Zelle mit Doppelpunkt-förmigem Signal (unten) (Zellkerne DAPI gegengefärbt, Perizentrin Cy3-rot, 1000-fach vergrößert).

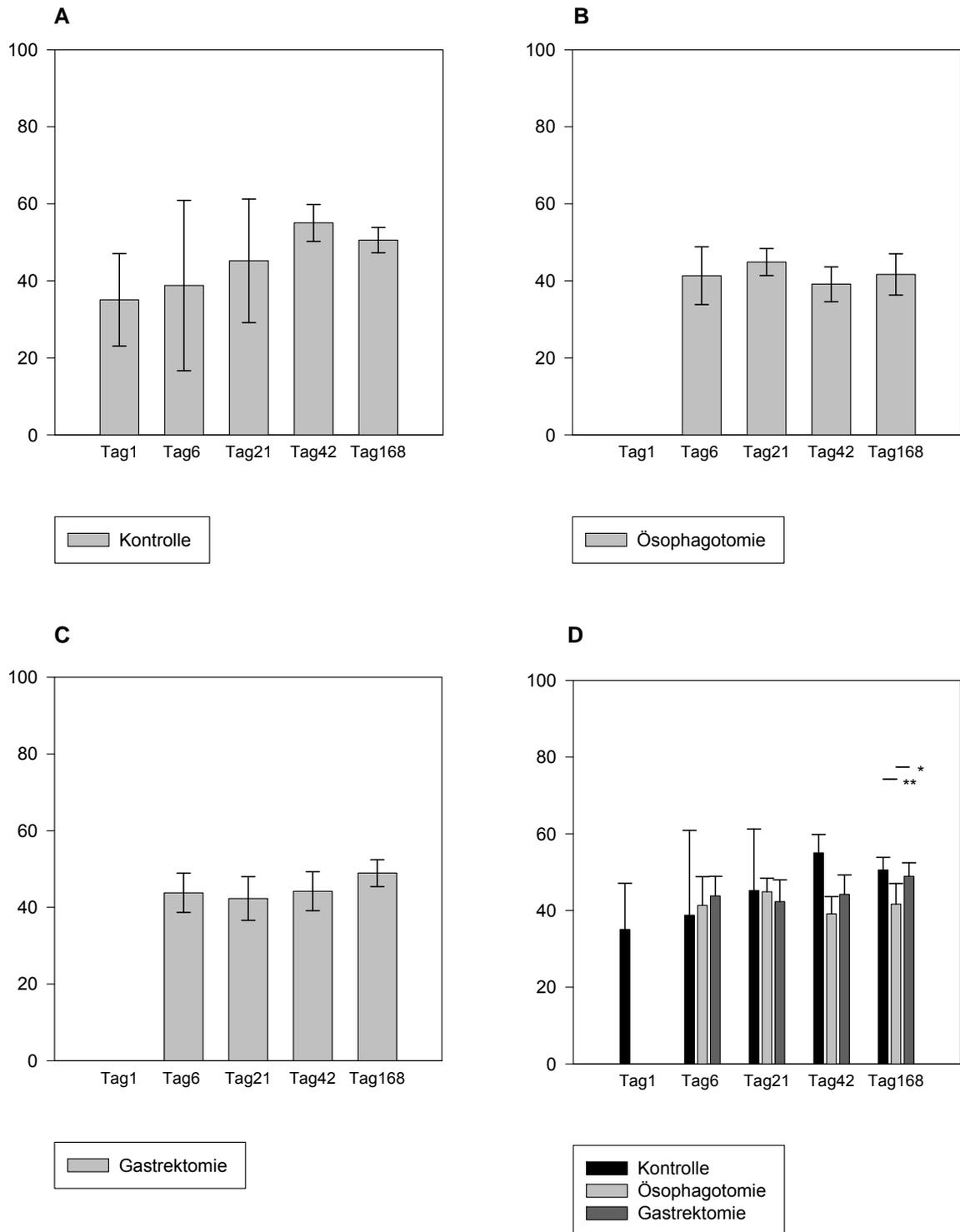


Abbildung 11: Mittelwerte der Zellen mit Doppelpunkt-förmigem Signal in Prozent aller Zellen mit Standardabweichung

A: Kontrolltiere. **B:** Tiere mit Ösophagotomie. **C:** Tiere nach Gastrektomie. **D:** Alle drei Gruppen nebeneinander. (*p= 0,008, **p= 0,014)

Mit Anteilen von 35-55% sind die Zellen mit einem Doppelpunkt-förmigem Signal (vergleiche Abb. 10) die am häufigsten vertretene Gruppe. Zellen mit Doppelpunkt-Signal befinden sich in der G2-Phase des Zellzyklus.

In der Kontrollgruppe zeigt sich ein diskreter Anstieg der betroffenen Zellen von 35,06% (s=12,0) an Tag 6 auf maximal 55,03% (s=4,8) an Tag 42. Am Ende des Beobachtungszeitraums geht die Anzahl leicht zurück auf 50,56% (s=3,28).

In der Gruppe der ösophagotomierten Tiere bleibt die Anzahl der betroffenen Zellen annähernd gleich. Der minimale Wert wird an Tag 42 (39,12%(s=4,52)) und der maximale Wert an Tag 21 (44,9%(s=3,53)) gemessen.

In der Gruppe der gastrektomierten Tiere beträgt der Wert an Tag sechs 43,8% (s=5,12). An Tag 21 beträgt der Wert 42,32% (S=5,68) und steigt dann bis auf 48,94% (s=3,5) an Tag 168. Für keine der untersuchten Gruppen lies sich im zeitlichen Verlauf eine statistisch signifikante Veränderung nachweisen.

Signifikante Unterschiede ergeben sich an Tag 168. Es finden sich signifikant mehr Zellen mit Doppelpunkt-Signal in der Kontrollgruppe und in der Gruppe der gastrektomierten Tiere als in der Gruppe der ösophagotomierten Tiere. Hierbei ergibt sich $p=0,008$ für Tiere mit Gastrektomie (48,94% (s=3,5)) gegen Tiere mit Ösophagotomie (41,66% (s=5,35)) und $p=0,014$ für die Gruppe der Kontrolltiere gegen die ösophagotomierten Tiere.

Zellen mit zwei Signalen für Perizentrin

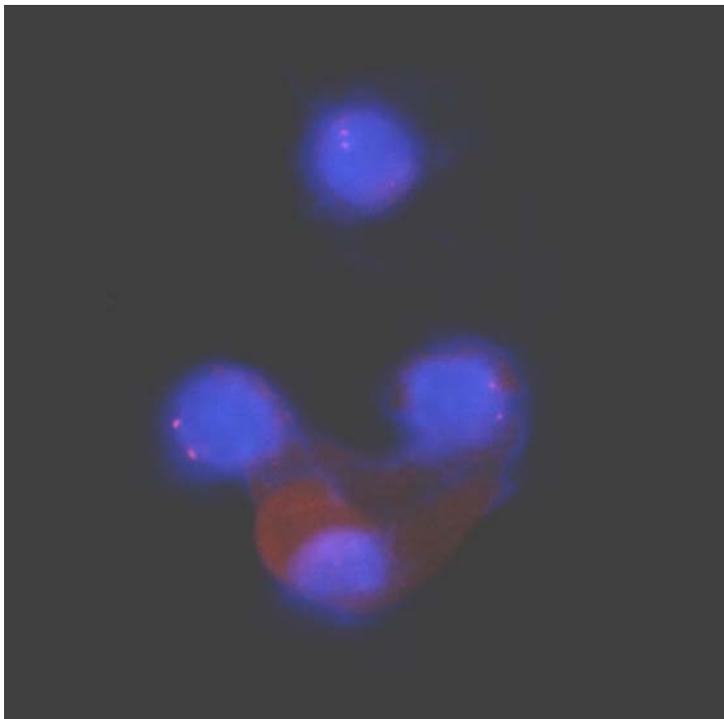


Abbildung 12: Drei Zellen mit je zwei Signalen, eine Zelle ohne spezifisches Signal (Zellkerne DAPI gefärbt, Perizentrin Cy3-rot, 1000-fach vergrößert).

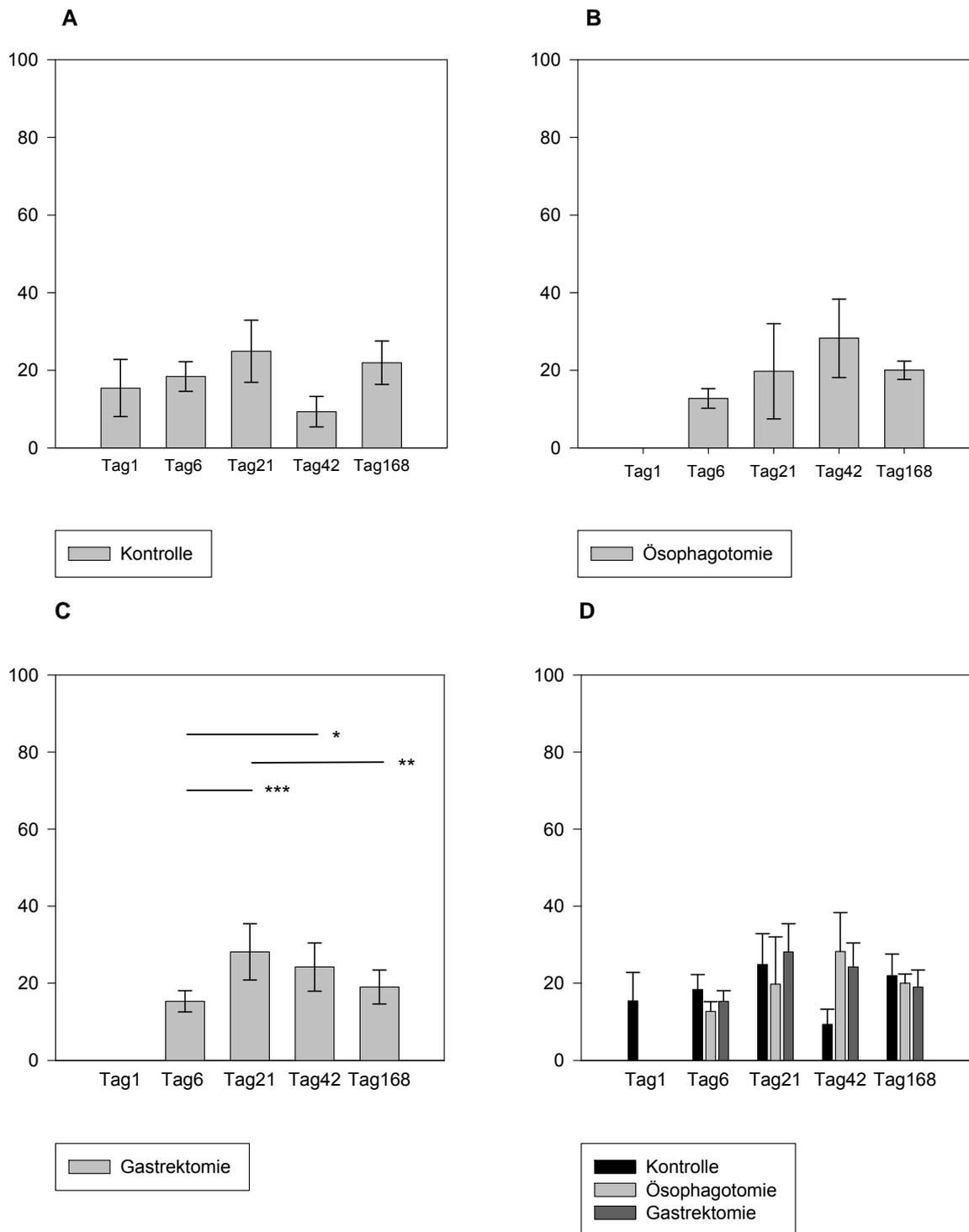


Abbildung 13: Mittelwerte der Zellen mit zwei Signalen in Prozent aller Zellen mit Standardabweichung

A: Kontrolltiere. **B:** Tiere mit Ösophagotomie. **C:** Tiere nach Gastrektomie. (*p= 0,024, **p= 0,01, ***p= 0,005) **D:** Alle drei Gruppen nebeneinander.

Zellen mit zwei auseinander liegenden Signalen sind bereits in die Mitose eingetreten (vergleiche Abb. 10 und 12).

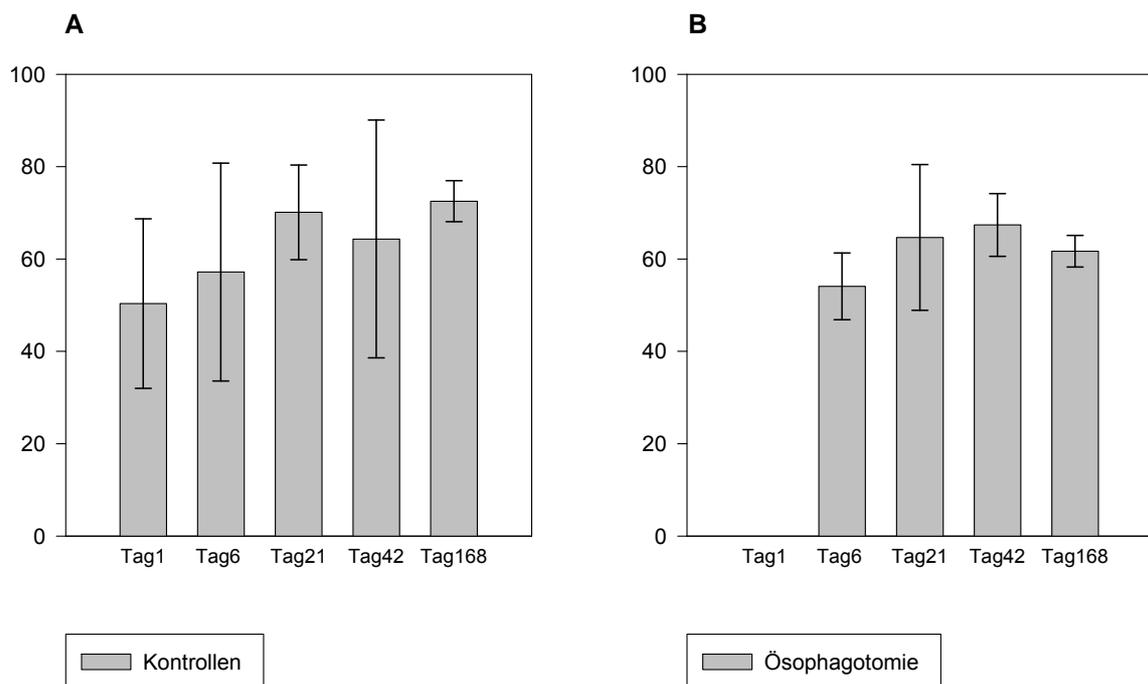
In der Kontroll-Gruppe ergeben sich keine signifikanten Veränderungen im Untersuchungszeitraum. An Tag 1 beträgt der Anteil der Zellen 15,44% (s=7,37) und an Tag

168 21,96% (s=5,59). Der höchste Wert in dieser Gruppe wird an Tag 21 erreicht (24,89% (s=8,01)), der niedrigste an Tag 42 (9,34% (s=3,94)).

In der Gruppe der ösophagotomierten Tiere ergibt sich ein Anstieg dieser Zellen von 12,73% (s=2,51) an Tag sechs bis zu 28,25% (s=10,1) an Tag 42. An Untersuchungstag 168 fällt der Wert auf 20,02% (s=2,35). Signifikante Unterschiede ergeben sich in dieser Gruppe nicht.

In der Gruppe der gastrektomierten Tiere gibt es bezüglich des Merkmals „zwei Signale“ drei signifikante Unterschiede im Verlauf. Zunächst steigt die Anzahl der betroffenen Zellen zwischen Tag sechs (15,34%(s=2,74)) und Tag 21 (28,17%(s=7,29)) signifikant ($p= 0,005$) an. Ferner ist der Anstieg zwischen Tag sechs und Tag 42 (24,22% (s=6,26)) signifikant ($p= 0,024$). Des Weiteren fällt die Anzahl der betroffenen Zellen zwischen Tag 21 und Tag 168 (19,02% (s=4,42)) wieder signifikant ($p= 0,010$) ab.

Zellen mit Doppelpunkt-förmigem Signal oder zwei Signalen für Perizentrin



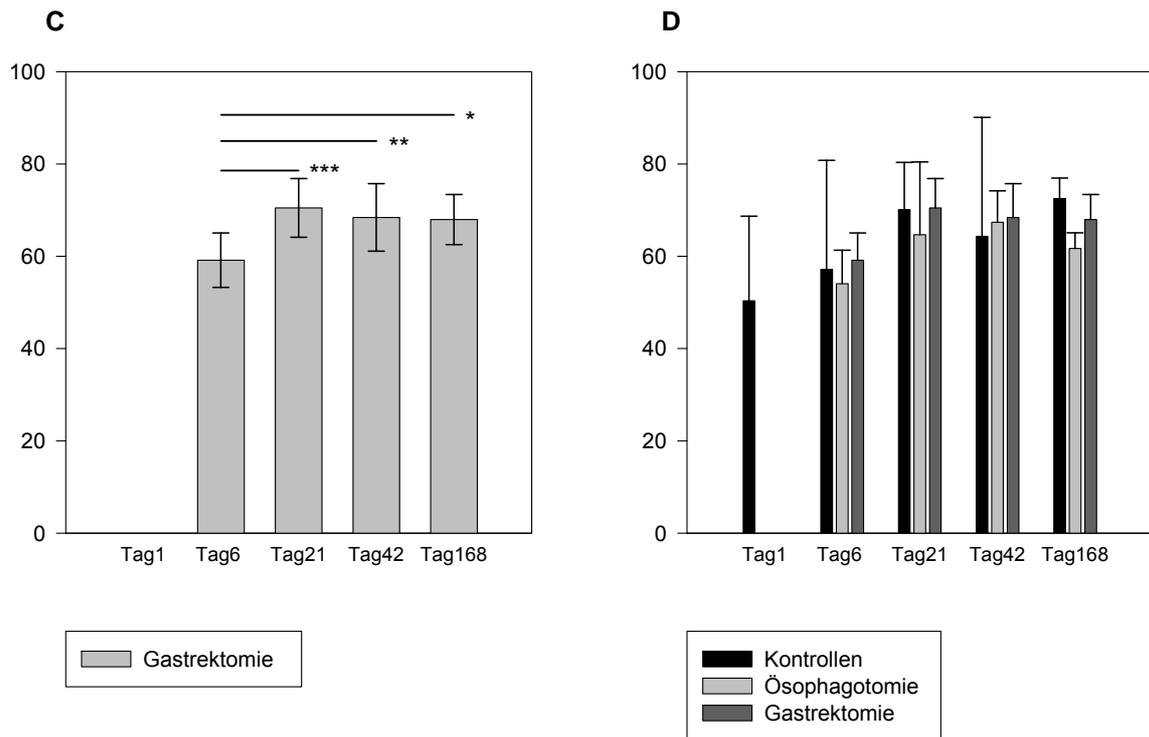


Abbildung 14: Mittelwerte der Zellen mit Doppelpunkt-förmigem Signal oder zwei Signalen in Prozent aller Zellen mit Standardabweichung

A: Kontrolltiere. **B:** Tiere mit Ösophagotomie. **C:** Tiere nach Gastrektomie (* $p=0,011$, ** $p=0,007$, *** $p=0,005$). **D:** Alle drei Gruppen nebeneinander.

Die Werte ergeben sich aus der Addition der beiden vorausgegangenen untersuchten Merkmale und stellen Zellen dar, die sich im Zellzyklus in den Phasen G2 oder Mitose befinden.

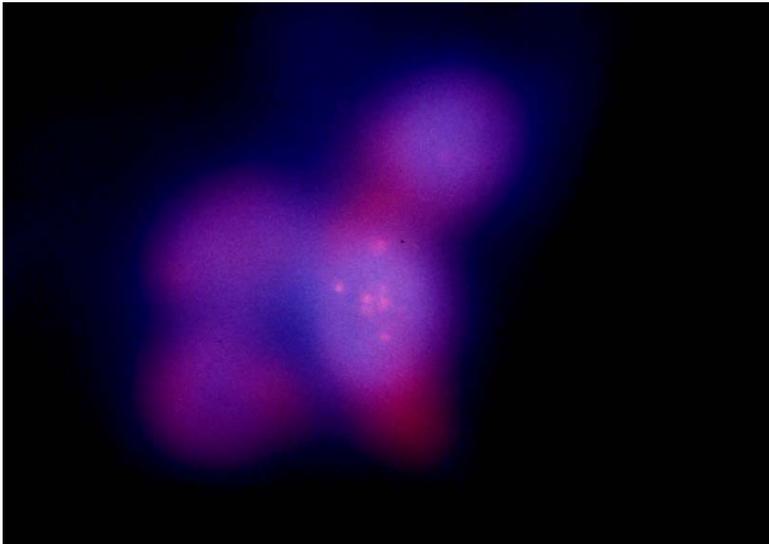
In der Kontrollgruppe findet sich der niedrigste Wert an Tag 1 (50,33% ($s=18,4$)) und der höchste Wert an Tag 168 (72,52% ($s=4,42$)). Es zeigt sich eine Zunahme der Zellen mit der Zeit, die jedoch nicht signifikant ist.

In der Gruppe der ösophagotomierten Tiere liegt das Maximum an Tag 42 (67,37% ($s=6,81$)). Signifikante Unterschiede gegenüber Tag sechs (54,07% ($s=7,23$)) oder Tag 168 (61,68% ($s=3,42$)) ergeben sich hierbei ebenfalls nicht.

Signifikante Unterschiede finden sich in der Gruppe der Tiere nach Gastrektomie. Hier liegt der niedrigste Wert an Tag sechs bei 59,14% ($s=5,9$). Im Vergleich zu diesem Wert sind alle folgenden Werte an den Untersuchungstagen 21, 42 und 168 erhöht. An Tag 21 beträgt der Anteil 70,48% ($s=6,37$) mit $p=0,005$, an Tag 42 68,43% ($s=7,32$), $p=0,007$, und an Tag 168 67,96% ($s=5,44$) mit $p=0,011$. Zwischen den Untersuchungstagen 21, 42 und 168 lässt sich kein signifikanter Unterschied mehr nachweisen.

Zellen mit drei Signalen und mehr für Perizentrin

A



B



C

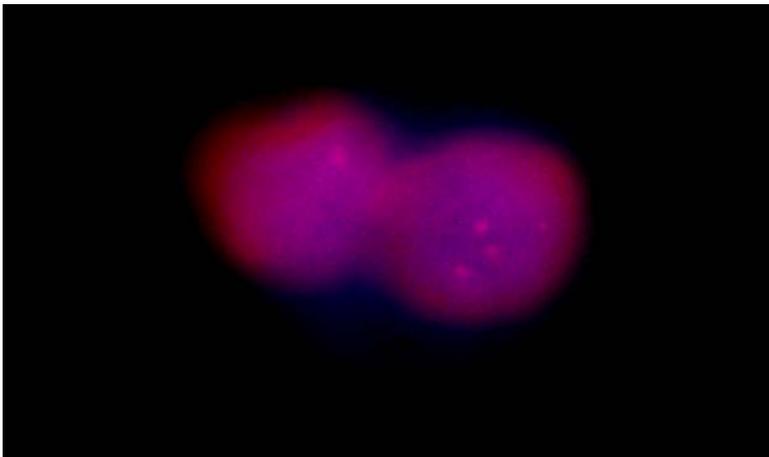


Abbildung 15:

A: Eine Zelle mit fünf Signalen. **B:** Zelle mit vier Signalen. **C:** Zelle mit einem Signal (links), Zelle mit vier Signalen. (Perizentrinfärbung mit Cy3, DAPI gegengefärbt, 1000-fach vergrößert)

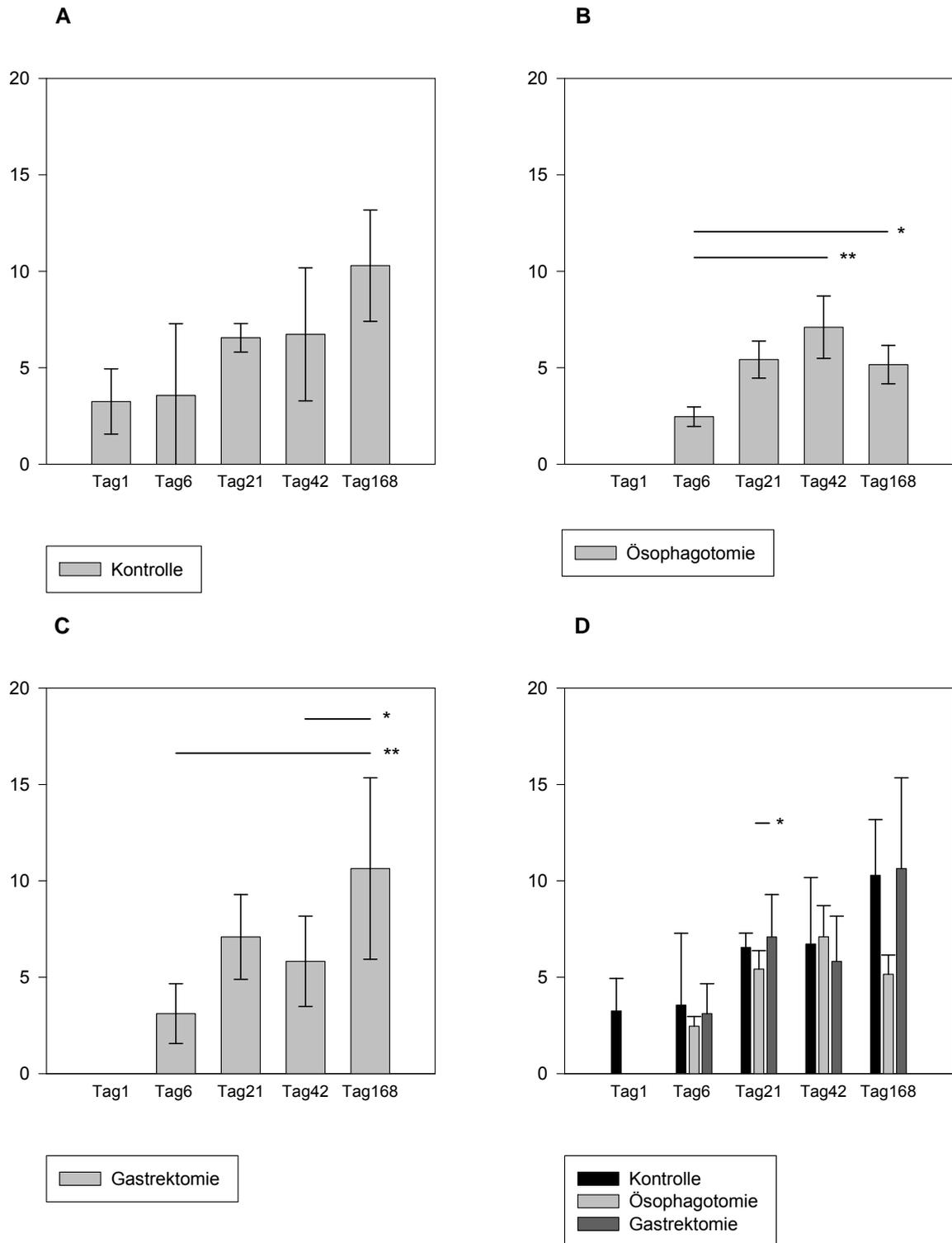


Abbildung 16: Mittelwerte der Zellen mit drei und mehr Signalen in Prozent aller Zellen mit Standardabweichung

A: Kontrolltiere. **B:** Tiere mit Ösophagotomie (* $p=0,049$, ** $p=0,007$). **C:** Tiere nach Gastrektomie (* $p=0,015$, ** $p=0,001$). **D:** Alle drei Gruppen nebeneinander (* $p=0,02$).

In dieser Gruppe sind alle Zellen zusammengefasst, die mehr als zwei Signale gezeigt haben (Abb. 15 und 16) und somit die Zellen mit Zentrosomamplifikation repräsentieren. Insgesamt zeigt sich in allen drei Gruppen eine Zunahme der auffälligen Zellen.

In der Kontrollgruppe steigt der Anteil von 3,09% (s=1,69) an Tag eins bis auf 10,29% (s=1,88) an Tag 168, ohne dass sich in dieser Gruppe ein signifikanter Unterschied ergibt. In der Gruppe der ösophagotomierten Tiere nimmt der Anteil gefundener Zellen bis Tag 42 zu und geht an Tag 168 numerisch zurück. Dabei ist allerdings sowohl der Wert an Tag 42 als auch der Wert an Tag 168 im Vergleich zu Tag sechs signifikant erhöht. Die einzelnen Werte betragen 2,46% (s=0,51) an Tag sechs, 7,1% (s=1,62) an Tag 42 und 5,16% (s=0,99) an Tag 168. Im Vergleich zwischen Tag sechs und Tag 42 beträgt $p=0,007$, im Vergleich zwischen Tag sechs und Tag 168 beträgt $p=0,049$.

In der Gruppe der gastrektomierten Tiere findet sich ebenfalls eine signifikante Zunahme der betroffenen Zellen zwischen Tag sechs und Tag 168. Zusätzlich ist der Unterschied zwischen Tag 42 und Tag 168 signifikant. Der niedrigste Anteil betroffener Zellen findet sich erwartungsgemäß an Tag sechs mit 3,11% (s=1,55). An Tag 42 liegt der Anteil bei 5,83% (s=2,34) und an Tag 168 bei 10,64% (s=4,7). Der Unterschied zwischen Tag sechs und Tag 168 ist mit $p=0,001$ signifikant. Im Vergleich zwischen Tag 42 und Tag 168 beträgt $p=0,015$.

Ein weiterer signifikanter Unterschied findet sich zwischen den ösophagotomierten und gastrektomierten Tieren an Tag 21. Hierbei sind 5,42% (s=0,96) der Zellen in der Gruppe der ösophagotomierten Tiere betroffen und 7,09% (s=2,2) in der Gruppe der gastrektomierten Tiere ($p=0,02$).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen an Tag 168 findet sich nicht.

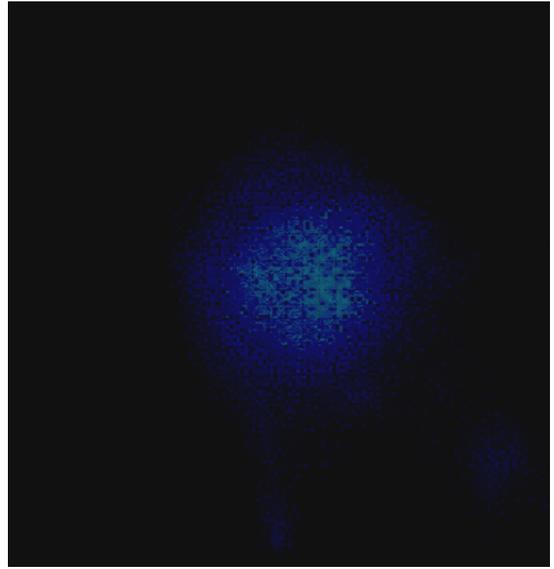
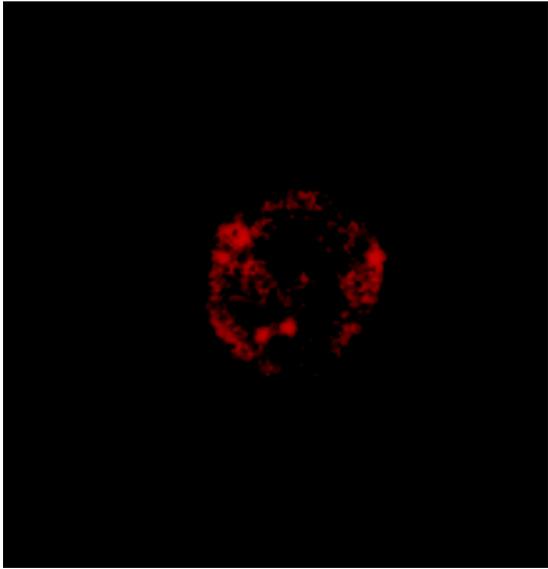
4.2.2 Immunzytochemische Färbung mit p53-Antikörper

Überzählige Objektträger des Anastomosen-nahen, respektive Magen-nahen Abschnitts wurden mit einem p53-rabbit-anti mouse- Antikörper gefärbt. Die Signale präsentierten sich als einzelne Punkte im Zellkern (Abb. 17).

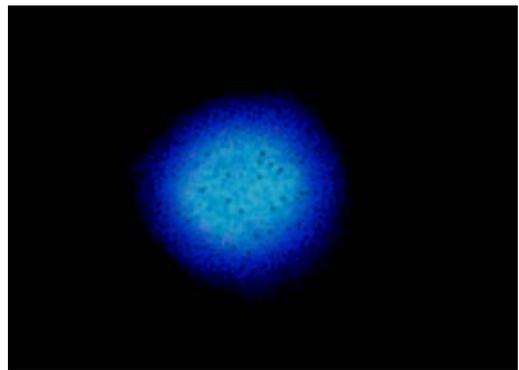
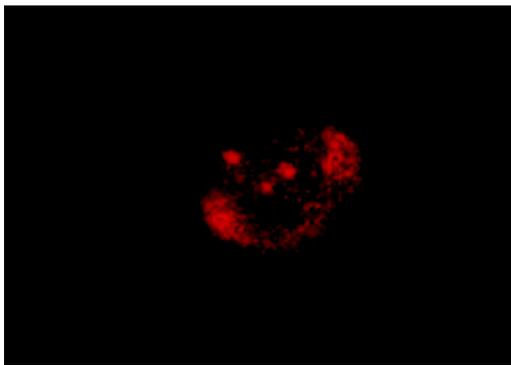
Von den zehn untersuchten Objektträgern waren sieben von Tieren mit kräftiger Refluxösophagitis und drei von Tieren ohne Entzündung der Speiseröhre. Wenn p53 in einer Zelle nachgewiesen werden konnte fanden sich am Häufigsten zwei oder drei Signale. Seltener waren fünf und mehr Signale.

Bei den Tieren mit Entzündung gelang der Nachweis eines p53-Signals im Schnitt bei 23,06% der untersuchten Zellen. Bei den Tieren ohne Entzündung lies sich p53 im Schnitt bei 26,47% nachweisen. Unter Berücksichtigung der kleinen Fallzahl findet sich auch kein Unterschied zwischen gastrektomierten Tieren und Kontrolltieren. Nach Gastrektomie betrug der Anteil p53-positiver Zellen in 24,2%, während der Anteil bei den Kontrolltieren 23,6% betrug (vergleiche Tabelle 4) .

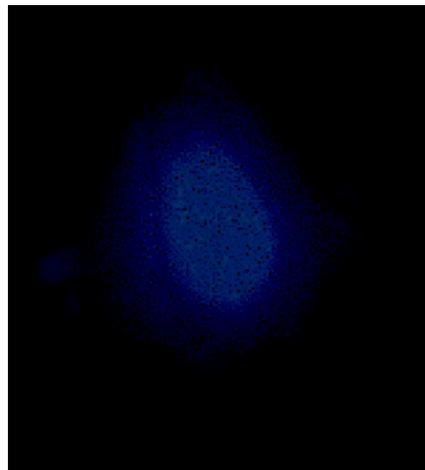
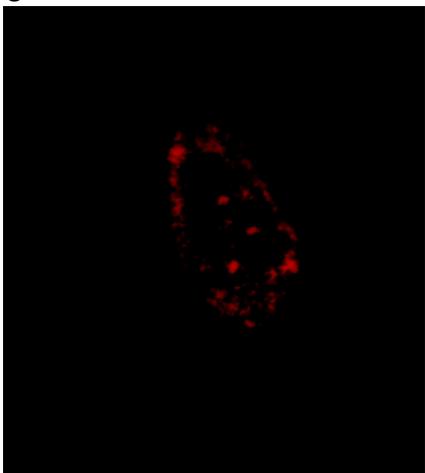
A



B



C



D

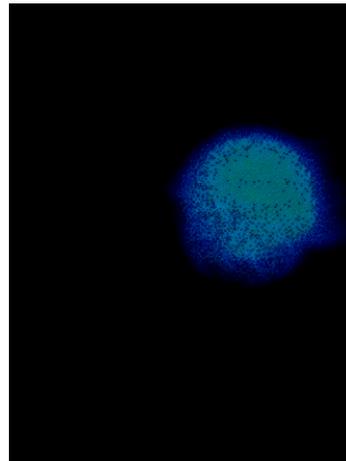
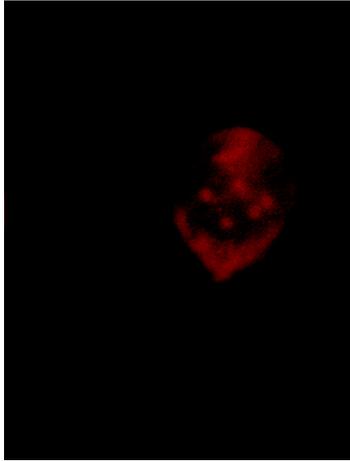


Abbildung 17: Signale nach Färbung mit p53-Antikörper (cy3, rot, linke Spalte, DAPI gegengefärbt, rechte Spalte). **A:** 2 Signale. **B:** 3 Signale. **C:** 5 Signale. **D:** 5 Signale.

Tier	Histologie Entzündung	Zellen Summe	Signale für p53						positiv	
			1	2	3	4	5	6/mehr	absolut	relativ
wt op 21	+	214	16	27	19	5	2		69	32,2%
wt op 42	+	207	12	20	7	2	1		42	20,3%
wt op 42	+	218	7	12	4	3			26	11,9%
wt op 42	+	206	5	20	20	17	8	2	72	35,0%
wt k 168	-	213	10	15	18	4			47	22,1%
wt k 168	-	227	5	19	23	12	2	1	57	25,1%
wt op 168	-	209	7	13	15	15	1		51	24,4%
wt op 168	++	206	5	16	10	4			35	17,0%
wt op 168	++	214	7	6	9	1			23	10,7%
wt op 168	+	216	5	18	24	14	17	13	91	42,1%

Tabelle 4: Histologischer Befund der mittels Immunzytochemie auf p53 untersuchten Tiere mit Angabe der Signalhäufigkeit in p53-positiven Zellen, sowie Anteil der p53-positiven Zellen absolut und relativ (wt: Wildtyp; op: Gastrektomie; K: Kontrollgruppe; 21, 42, 168: Untersuchungstage).

4.3 DNA-DNA-Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung

Nach FISH mit der verwendeten Pan-Zentromer-Sonde ließen sich nur in einzelnen Fällen zufrieden stellende Ergebnisse erzielen.

Die Sonde bindet spezifisch an die Zentromer-Region jedes einzelnen Chromosom der Maus. Da die Maus über 20 Chromosomen verfügt waren bei einfachem Chromosomensatz 20 spezifische Signale zu erwarten. In der Mehrzahl der Fälle war der Zellkern jedoch so klein, dass die Differenzierung von Kernen mit 40 Chromosomen und solchen, die mehrere Chromosomensätze enthielten (80 Signale und mehr) nicht möglich war.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Chirurgisches Modell im Vergleich zu bestehenden Modellen

Aufgrund der Zunahme der Inzidenz von ösophagealen Karzinomen, insbesondere von Adenokarzinomen, stellt sich verstärkt die Frage nach den Ursachen der Karzinomentstehung. Primäres Untersuchungsziel war deshalb, Mechanismen der Entstehung von Adenokarzinomen im Ösophagus darzustellen. Ziel der Arbeit war, ein Modell zu entwickeln, das die Entstehungssequenz über ösophagealen Reflux, Entzündung, Metaplasie, Barrett-Ösophagus bis zum Karzinom abbildet. Eine weitere Anforderung bestand darin, die gefundenen Veränderungen molekularbiologischen Untersuchungen zugänglich zu machen.

Als Tiermodell haben sich Reflux-induzierende Operationen bei Ratten bewährt. Hierbei gelingt es mittels Ösophagojejunostomie, je nach Fragestellung mit oder ohne Gastrektomie, und der Gabe von Kanzerogenen wie z.B. N-Methyl-N-benzylnitrosamin Karzinome im Ösophagus zu induzieren.

Pera et al. konnten bereits 1989 unter diesem Regime bei 38% der so behandelten Tiere ein Adenokarzinom nachweisen.

Ebenfalls am Tiermodell der Ratte konnten Ireland et al. (1996) zeigen, dass das Auftreten von Adenokarzinomen unter gastroduodeno-ösophagealem Reflux geringer war, als unter duodeno-ösophagealem Reflux alleine. Hieraus leiteten sie einen protektiven Effekt der Magensäure ab.

Miwa et al. (1996) untersuchten Ratten und berichteten sogar von einem Auftreten von Karzinomen bei 83% der Tiere nach gastroduodenalem-ösophagealem Reflux und 77% der Tiere nach duodeno-ösophagealem Reflux, ohne dass ein Kanzerogen verabreicht wurde.

In der Arbeit von Fein 1998 entwickelten Ratten nach Ösophagojejunostomie, unabhängig davon, ob sie gastrektomiert wurden, in 48% der Fälle Adenokarzinome. Tiere, die nach Gastrektomie und Ösophagojejunostomie saure Flüssigkeit zu trinken bekamen entwickelten seltener Adenokarzinome. Daraus wurde gefolgert, dass das wesentliche Agens, das zur Karzinomentstehung beiträgt, in den duodenalen Sekreten enthalten ist und dass Säure einen protektiven Effekt besitzt.

Einen ersten Versuch, das Tiermodell auf die Maus zu übertragen unternahmen Fein et al. 1999. Sie untersuchten wt-Tiere nach Gastrektomie und Ösophagojejunostomie. Ohne weitere Gabe eines Karzinogens zeigte sich nach 24 Wochen Ösophagitis, Plattenepithelhyperplasie und fokale Uzerationen. Ein Barrett-Ösophagus zeigte sich ebenso wenig wie

Karzinome des Ösophagus. Die Ursachen für das Ausbleiben maligner Entwicklung bei gleicher Behandlung wie zuvor bei Ratten sahen Fein et al. zunächst in der generell höheren Empfindlichkeit von Ratten, Tumore zu entwickeln. Ferner waren bei den Mäusen nur die distalen 15% des Ösophagus von Ösophagitis betroffen, während bei den Ratten zwei Drittel des Ösophagus betroffen waren. Ursächlich dafür sahen sie die fünfmal kleinere Anastomose bei Mäusen und den daraus resultierenden geringeren Reflux.

Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Ergebnissen weitgehend überein, wobei in unserem Versuch die Häufigkeit von Ösophagitiden und Entzündung im distalen Ösophagus nach Ablauf von 24 Wochen rückläufig ist. Den höchsten Anteil an Ösophagitiden konnte in unserem Versuch bereits drei Wochen nach Operation nachgewiesen werden. Bei Fein et al. war eine Untersuchung zu diesem Zeitpunkt nicht vorgesehen. Die Aussagen über den begrenzten Bereich der histologischen Veränderungen im distalen Ösophagus wird in unserer Arbeit bestätigt.

Nur zum Teil nachvollziehbar sind aus unserer Sicht die Ergebnisse von Xu X et al. (2000). Sie fanden bei 37 Mäusen nach Ösophagojejunostomie ohne Gastrektomie nach 19 Wochen Standzeit in 60,6% der Fälle eine Ösophagitis. Bei 12,2% fanden sie einen Tumor, davon wiederum bei 50% ein Adenokarzinom.

Die Häufigkeit von Ösophagitis entspricht unseren Daten. Der Tumornachweis in dieser Gruppe mag Folge der höheren Anzahl Tiere mit relativ langer Standzeit sein.

Bemerkenswert erscheint der histologische Nachweis von Barret-Epithel bei 42,4% der operierten Tiere. Hier stellt sich zunächst die Frage, welche histologischen Kriterien bei der Maus ein Barret-Epithel definieren. Die beim Menschen typische Metaplasie des Plattenepithels in ein Zylinderepithel lies sich in unseren Versuchen auch bei starker Entzündung nach 168 Tagen nicht nachweisen. Abgesehen von der Entzündungsreaktion, einer Basalzellhyperplasie und einer zunehmenden Epitheldicke mit Verhornung können wir keine histologischen Veränderungen nachweisen.

Die eigentliche Motivation, das gut funktionierende Modell der Ratte auf die Maus zu übertragen, beruht auf der Möglichkeit, mit genetisch veränderten Tieren zu arbeiten (Wang et al., 1998). Durch operativ induzierten Reflux sollte in unserer Arbeit bei p53-ko-Mäusen die Karzinomentstehung im Ösophagus begünstigt werden. Auf diese Weise sollte es möglich sein die gesamte Sequenz der Tumorentstehung von der initialen Entzündung über Metaplasie und Dysplasie bis zum Karzinom innerhalb von 168 Tagen darzustellen. Ferner erhofften wir uns weitere Hinweise über die Rolle des Tumorsuppressorgens p53 zu erlangen.

Fein et al. gelang es 1999, vier p53-ko-Tiere nach Gastrektomie und Ösophagojejunostomie zu untersuchen. Nach einer Standzeit von 24 Wochen konnte bei allen vier Mäusen eine

schwere Dysplasie nachgewiesen werden. Zwei der Mäusen hatten histologisch ein Adenokarzinom.

In unseren Versuchen waren die Überlebenszeiten der p53-Ko-Tiere unvorhersehbar. Dreizehn von zwanzig Tieren verstarben, ohne dass eine Operation möglich war. Ein Einhalten der vorgesehenen Untersuchungszeitpunkte war nicht möglich. Einen Überblick über die gefundenen Histologien der untersuchten Tiere zeigen die Tabellen 5 und 6.

Tag	Histologischer Befund
21	Verhornendes Plattenepithel im Ösophagus, Lymphknoten und Pankreasanteile mit Infiltraten eines hoch malignen Tumors, offensichtlich Lymphom
100	Keine Entzündung, kein Tumor
168	Keine Entzündung, kein Tumor

Tabelle 5: Histologischer Befund der p53-ko-Mäuse ohne vorhergegangene Operation.

Tag	Histologischer Befund
42a	Anastomosenregion mit vermehrt verhornendem Plattenepithel
42b	Kräftig verhornendes Plattenepithel des Ösophagus
101	Regelhafte Ösophaguswandquerschnitte, keine Tumordinfiltrate, Milz und Lymphknoten mit Infiltraten eines hoch malignen undifferenzierten Tumors, offenbar Lymphom
168	Kräftige Entzündung im Anastomosenbereich, keine Karzinominfiltrate

Tabelle 6: Histologischer Befund der p53-ko-Mäuse nach vorausgegangener Ösophagojejunostomie und Gastrektomie.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Arbeit mit den p53-ko-Tieren weder praktikabel, da mit einem hohen Ausfall behaftet, noch zielführend war, da keine Karzinomentstehung erreicht wurde.

Ellis et al. nutzten 2001 die Gelegenheit, mit p27-knock out-Mäusen zu arbeiten. Sie untersuchten drei Gruppen. Eine Gruppe bestand aus wt-Tieren, eine Gruppe aus heterozygoten p27-ko-Tieren und eine Gruppe aus homozygoten p27-ko-Tieren. Alle Gruppen erhielten eine Ösophagojejunostomie ohne Gastrektomie. Zusätzlich wurde den Tieren N-Methyl-N-Benzylnitrosamin (MBN) verabreicht. Nach einer Standzeit von 18 bis 20 Wochen wurden die Tiere histologisch untersucht. Bei 14% der Mäuse in Gruppe 1 zeigte sich ein Barrett-Ösophagus. 60% der Mäuse in Gruppe 1 entwickelten ein Karzinom, davon waren wiederum 10% Adenokarzinome. Der Anteil von Barrett-Ösophagus und Karzinomen war in den beiden Gruppen mit den ko-Tieren höher. Dabei fanden sich bei den

homozygoten p27-ko-Tieren signifikant häufiger ein Barrett-Ösophagus oder Karzinome als in den beiden übrigen Gruppen.

Letztlich bleibt auch bei diesem Setup unklar, inwieweit das Kanzerogen, der Reflux oder die Gendeletion zur Entstehung der Karzinome führt. Allerdings führt die Untersuchungsreihe mit den homozygoten p27-ko-Mäusen zu dem gewünschten Erfolg mit Entstehung von Barrett-Ösophagus und Adenokarzinomen. Die Überlebenszeiten von den p27-ko-Mäusen scheinen ebenfalls gut zu sein. In der Gruppe der homozygoten ko-Tiere wurden 50 Mäuse nach Ösophagojejunostomie untersucht. Sollte man erneut den Versuch unternehmen, die Entstehungssequenz des Adenokarzinoms auf molekularbiologischer Ebene nachzuvollziehen, könnte diese Model ein viel versprechender Ansatz sein.

5.1.2 Zellpräparation

In Ergänzung zu den beschriebenen Arbeiten war das Ziel dieser Untersuchung die Darstellung von Veränderungen auf molekularer Ebene in der einzelnen Zelle.

Voraussetzung hierfür ist die Zugänglichkeit der einzelnen Epithelzelle zu Färbung und Mikroskopie.

Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurde ein ex-vivo-Ausstrich-Verfahren entwickelt. Dieses Verfahren hat gegenüber der Zellkultur den Vorteil, dass es die Gewebesituation exakt widerspiegelt. Artefakte, wie sie bei der Zellkultur durch das Expandieren der Zellen entstehen, sind ausgeschlossen. Die Zellen sind gut zugänglich und die einzelne Zelle besser zu beurteilen.

Schwierigkeiten ergaben sich in unseren Versuchen aus der Menge des Untersuchungsmaterials. Von dem longitudinal halbierten Ösophagus der Maus war letztlich nur das Magen-nahe Drittel von Interesse. Das somit zur Verfügung stehende Material einer Maus war lediglich für zwei Objektträger ausreichend. Außer der geringen Anzahl an Zellen zeigte sich auch, dass die Zellen erstens sehr klein waren und zweitens ihre rundliche Form beibehielten.

In Vorversuchen wurden deshalb mit Hypotonie-Behandlung versucht, die Zellen durch Quellung zu vergrößern. Dies führte dazu, dass die Zellkerne platzten und einer Untersuchung nicht mehr zugänglich waren. Auf die Hypotoniebehandlung wurde deshalb im weiteren verzichtet. Die Kombination aus geringer Tiefenschärfe bei großer Vergrößerung und die rundliche Struktur der Zelle erforderte ein mehrfaches Durchfokussieren jeder einzelnen Zelle, was den Aufwand bei der Mikroskopie steigerte.

Eine weitere Schwierigkeit ergab sich aus dem Gewebeverdau. Um einzelne isolierte Zellen zu erhalten, war ein Gewebeverdau mit Trypsin unerlässlich (Abb. 18 und 19). Die Dauer des enzymatischen Verdau wurde nach mehreren Vorversuchen festgelegt. Hierbei bewirkte

eine zu lange Einwirkzeit eine Zerstörung der Zellen. Bei zu kurzer Einwirkzeit waren die Zellen nicht ausreichend voneinander getrennt. In beiden Fällen war das Ergebnis der Färbung und die Möglichkeiten zum Auswerten der Zellen nicht gegeben.

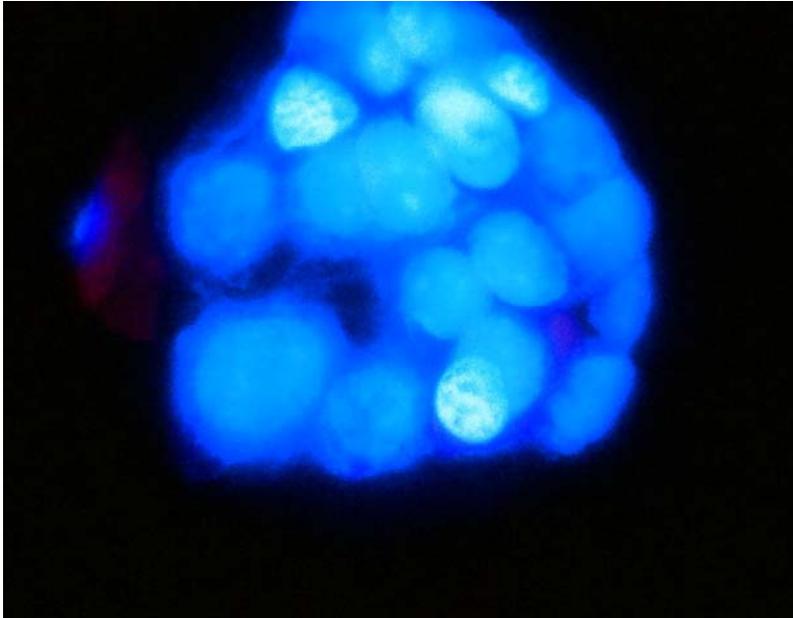


Abbildung 18: Fehlende Zellseparation mit unbefriedigendem Färbeergebnis bei unzureichendem Gewebeveredau (Vergrößerung 1000-fach, Zellkerne mit DAPI gefärbt)

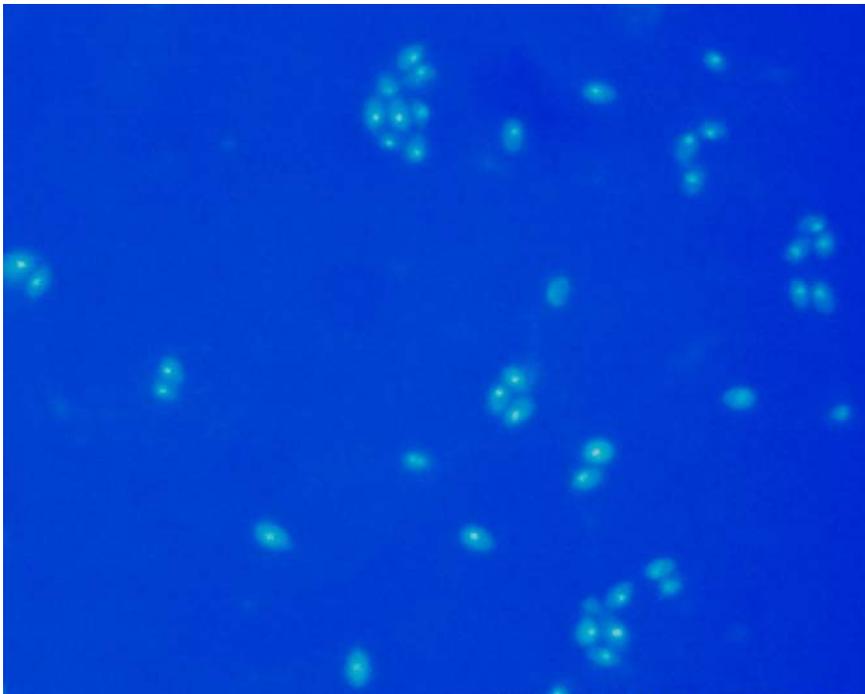


Abbildung 19: Günstige Verteilung der Zellen mit bereits bei 400-facher Vergrößerung erkennbaren Zentrosomensignalen (Zellkerne DAPI-gefärbt)

Eine weitere Maßnahme, die das Färbeergebnis verbesserte, war die Fixierung des Ausstrichpräparates mit 4%-Paraformaldehyd. Die ursprünglich geplante Fixierung mit

-20°C kaltem Methanol zerstörte einen zu großen Anteil der fragilen Zellen.

Eine alternative gängige Untersuchungsmethode ist das Anfärben von feingeweblichen Schnitten. Eine immunhistochemische Färbung an entparaffinierten Schnitten ist grundsätzlich möglich (Kuo et al., 2000). Dies hätte den Vorteil gehabt, dass ungleich mehr Untersuchungsmaterial zu Verfügung gestanden hätte. Probeweise durchgeführte Färbungen von entparaffinierten Schnitten mit dem Anti-Perizentrin-Antikörper zeigten eine spezifische Färbung. Eine statistische Auswertung war aber nicht möglich. Die einzelnen spezifischen Signale ließen sich nicht eindeutig den Zellen zuordnen und die exakte Anzahl der Zellen insgesamt war auch nicht zu bestimmen.

5.1.3 DNA-DNA-Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung

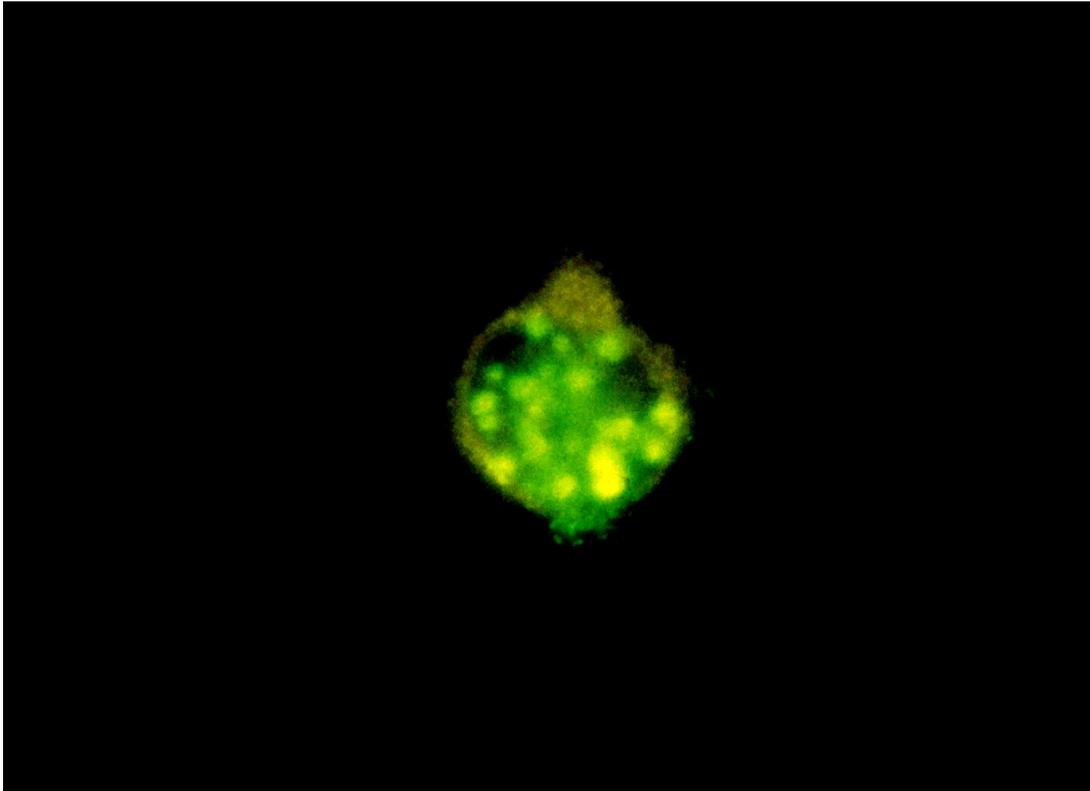
Das ehrgeizige Ziel, mittels Simultanfärbung den Chromosomensatz und die Anzahl der Zentrosomen an einem Objektträger gleichzeitig darzustellen, musste leider aufgegeben werden.

Wesentlicher Grund hierfür war das Fehlen einer geeigneten Sonde, die die Zentromer-Region eines Chromosomen-Paares bei der Maus markierte. Die zu Verfügung stehende Sonde bindet an die Zentromer-Regionen aller Chromosomen. Dies hat zur Folge, dass sich im Zellkern im diploiden Zustand 40 Signale befinden. Die Kombination aus einer hohen Signalintensität und die durch kleine Zellkerne gegebene Signaldichte verhinderte eine ausreichende mikroskopische Auflösung der Signale. Die optische Begutachtung ließ daher ein genaues Zählen der Signale nicht zu.

Die Abbildung 20 verdeutlicht die Schwierigkeiten, die sich bei der Mikroskopie dieser Färbung zeigten.

Weitere Methoden zur Bestimmung des Ploidiegrades, z.B. mittels FACS wurden in Erwägung gezogen, waren jedoch aufgrund der geringen Menge des zur Verfügung stehenden Materials nicht realisierbar.

A



B

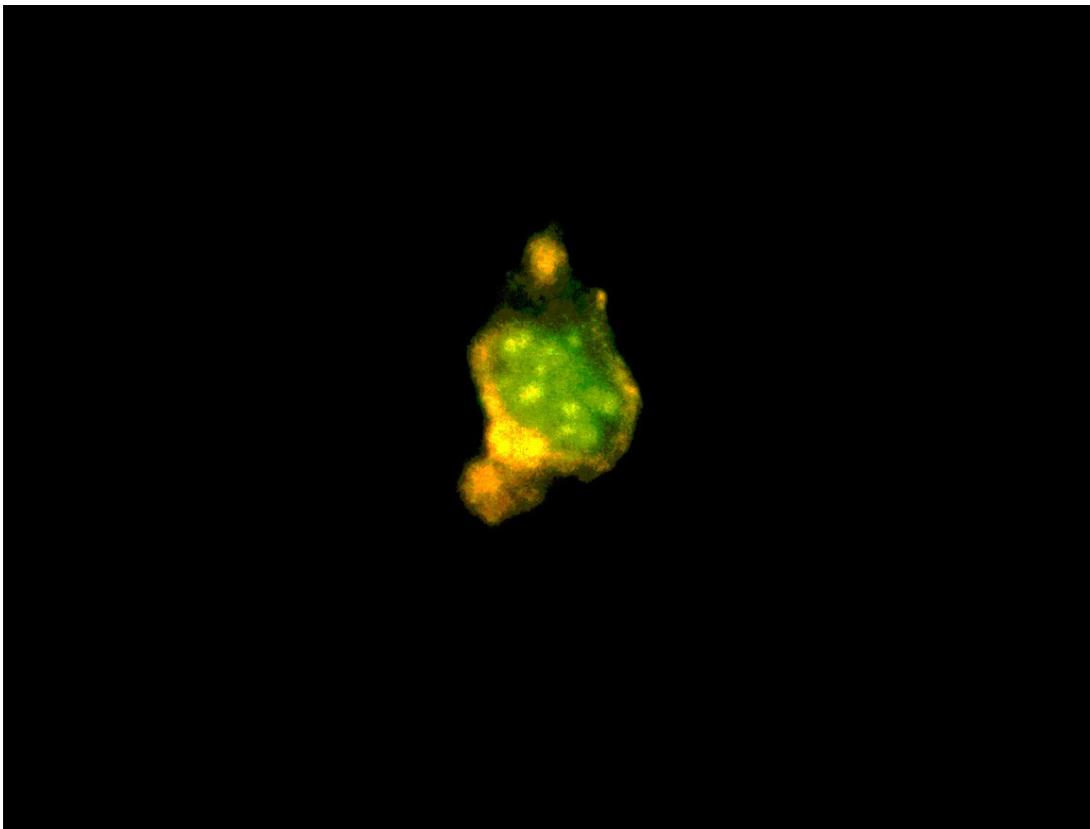


Abbildung 20: A und B: Ösophagusepithelzellen der Maus nach Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (Zentromere FITC-grün).

5.1.4 Immunzytochemische Färbung

Erfolgreich verlief die Bestimmung der Anzahl der Zentrosomen pro Zelle nach Immunzytochemie. Es wurde zunächst ein polyklonaler Antikörper gegen γ -Tubulin getestet. Trotz mehrfachen Versuchen mit unterschiedlichen Verdünnungen zwischen 1:100 und 1:2500 für den primären Antikörper und 1:50 bis 1:200 für den sekundären Antikörper konnte keine zufrieden stellende spezifische Färbung erzielt werden.

Der Wechsel der Fixierung des Ausstrichpräparates von Methanol auf Paraformaldehyd und die Verwendung eines Antikörpers gegen Perizentrin brachte schließlich den gewünschten Erfolg. Mit dem anti-Perizentrin-Antikörper zeigte sich schon im zweiten Versuch mit einer Verdünnung von 1:100 ein gutes Ergebnis. Bezüglich der Nachweisbarkeit des Zentrosoms und der Bewertung der Resultate in Verbindung zum Zellzyklus sind die beiden Proteine Perizentrin und γ -Tubulin als identisch zu betrachten.

Die zunächst unternommene und misslungene Verwendung des γ -Tubulin Antikörpers war auch ursächlich für die Differenz in der Anzahl histologisch und mittels Immunzytochemie untersuchten Tiere.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Histologie

Im Unterschied zum Menschen verfügt die Maus über einen Vormagen. Dieser ist, ebenso wie der Ösophagus der Maus, mit mehrschichtigem verhornendem Plattenepithel ausgekleidet. Diese anatomische Besonderheit stellt einen deutlichen Unterschied zum menschlichen Organismus dar, bei dem ein Verhornung des Plattenepithels im Ösophagus bereits als pathologischer Befund gewertet wird. Erwartungsgemäß konnte den Kontrolltieren ohne Operation mit einer Ausnahme ein solcher Normalbefund attestiert werden.

Die Gruppe der Tiere mit Ösophagotomie wurde eingeführt, um die Entzündungsreaktion, die durch die Operation und das Nahtmaterial entsteht von der Entzündung, die Folge des Reflux ist, abzugrenzen. Das Lumen des Ösophagus wurde dabei nicht eröffnet. Somit konnte die Entzündungsreaktion nicht von bakterieller Besiedlung der Speiseröhre oder von gastrointestinalen Sekreten beeinflusst werden. In dieser Gruppe fällt auf, dass die Fremdkörperreaktion drei Wochen nach Operation am stärksten ist. Zu diesem Zeitpunkt sind alle Tiere betroffen. 66% der Tiere zeigen zu diesem Zeitpunkt Entzündungen. Zwei Wochen früher und drei Wochen später zeigt sich keine Entzündungsreaktion, lediglich nach 24 Wochen ist noch eine Maus betroffen.

Vergleicht man die Gruppe der Ösophagotomierten Tiere mit der Gruppe der Tiere mit Gastrektomie bezüglich der Fremdkörperreaktion, fällt auf, dass die Tiere mit Reflux häufiger, früher und länger anhaltende Entzündungsreaktionen zeigen. Hieraus lässt sich folgern, dass der Reflux von duodenalen Sekreten die stattfindende Fremdkörperreaktion aggraviert. Dennoch ist auch bei den Tieren mit Reflux die Fremdkörperreaktion nach 24 Wochen rückläufig. Dies spricht deutlich für eine hohe Widerstands- und Anpassungsfähigkeit der Maus im Allgemeinen.

An Tag 6 nach Gastrektomie leiden bereits 4 von 7 Tieren an einer Ösophagitis. Dabei finden sich alle Schweregrade: 2 Tiere mit leichter Ösophagitis, eines mit mäßiger Ösophagitis und eines mit kräftiger Ösophagitis. Am nächst folgenden Untersuchungstag (Tag 21) sind alle Tiere von Ösophagitis betroffen. Dabei überwiegen die Tiere mit leichter Ösophagitis. Nach weiteren drei Wochen zeigen sich bereits numerisch wenige Ösophagitiden, dabei sind die Schweregrade aber gleichmäßig auf leicht und kräftig verteilt. Am letzten Untersuchungstag ist die Rate der Ösophagitiden am niedrigsten. Allerdings zeigt sich jetzt ein Überwiegen der kräftigen Ösophagitiden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass zunächst alle Tiere als Folge der Operation und des daraus resultierenden Reflux eine Entzündung entwickeln. Aufgrund unbekannter, individuell variierender Ursachen kommt es bei einem Teil der Mäuse zu einem Ausheilen der Entzündung, während bei einem anderen Teil die Entzündungsreaktion persistiert und in ihrer Schwere zunimmt. Ursächlich könnte hier wiederum die Größe der Anastomose und die Menge des davon abhängigen Reflux sein. (Vergleiche auch Kap. 5.1.1)

5.2.2 Perizentrin- und p53-Färbungen

Das Ausmaß des physiologischen Zellersatzes ist je nach Gewebe unterschiedlich groß. Mit der höchste Anteil an täglich neu gebildeten Zellen findet sich in den Epithelien des Gastrointestinaltraktes. Z.B. fanden sich bei Ratten (aus Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, Otto Bucher/Hubert Wartenberg, Verlag Hans Huber) im Magen 35,4% und im Jejunum 79% täglich neu gebildete Zellen in der Schleimhaut.

Neben anderen immunzytochemischen Methoden kann zur Bestimmung der Zellzyklusphase einer Zelle auch die Zahl und Lage der Zentrosomen herangezogen werden.

Betrachtet man die Gruppe der Mäuse ohne Operation finden sich zwischen 50,3% und 72,5% der Zellen in Proliferation, wobei hier Proliferation als Stadium G2 oder M verstanden wird. Die Anteile für Zellen, die sich in Ruhe (G0), in der G1- oder S-Phase des Zellzyklus befinden, fallen entsprechend niedriger aus. Sie liegen zwischen 46,4% und 17,2%. Die

Werte der Tiere aus den beiden operierten Gruppen liegen ebenfalls zwischen diesen beiden Zahlenpaaren. Insofern ist bemerkenswert, dass sich im zeitlichen Verlauf der Kontrolltiere und der Tiere mit Ösophagotomie keine signifikanten Unterschiede ergeben, während in der Gruppe der Tiere mit Gastrektomie sehr wohl signifikante Veränderungen im Verlauf auftreten.

Hierbei zeigt sich eine signifikante Zunahme der Zellen in Proliferation zwischen Tag 6 und Tag 21 nach Op. Auch die beiden weiteren Ergebnisse im zeitlichen Verlauf bleiben signifikant erhöht im Vergleich zu Tag 6. Numerisch findet sich an Tag 21 der höchste Wert für Zellen in Proliferation, was auch histologisch dem Zeitpunkt, an dem die meisten Entzündungen nachgewiesen wurden, entspricht.

Ferner errechnet sich ein signifikanter Abfall des Anteils der Zellen in der Phase G0, G1 oder S. An Tag 6 befinden sich hier noch 37,7% der Zellen, an allen folgenden Untersuchungstagen sind es signifikant weniger. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für einen erhöhten Zellumsatz mit zunehmender Entzündung und sind gut vereinbar mit der histologisch gesehenen Basalzellhyperplasie und der Verbreiterung des Epithels.

Die hohe Rate von proliferierenden Zellen erscheint bemerkenswert insofern, als dass die Entwicklung von Adenokarzinomen aus einer Barrett-Schleimhaut bereits mit einer Hyperproliferation der Epithelzellen in Verbindung gebracht worden ist (Gray et al., 1992; Kondo et al., 1995). Ursächlich für die gesteigerte Proliferation konnten aberrante Genexpressionen (Reid et al., 1993) bestimmt werden, die in die Kontrolle des G1/S-Übergangs eingebunden sind. So findet sich eine Überexpression von Cyclin D1, eine vermehrte Expression von Cyclin E und eine Anreicherung von mutiertem p53, die möglicherweise den G1/S-Kontrollpunkt ausschalten (Caygill et al., 2004) und somit eine vermehrte Proliferation ermöglichen.

Betrachtet man separat die Zellzyklusphasen G2 und M in der Gruppe der Tiere mit Ösophagojejunostomie, stellt sich heraus, dass, obwohl sich signifikant mehr Zellen an Tag 168 in Proliferation befinden als an Tag 6, der Anteil der mitotischen Zellen zwischen Tag 21 und Tag 168 signifikant abnimmt. Dies bedeutet möglicherweise, dass ein Teil der Zellen am G2-Kontrollpunkt am Übertritt in die Mitose gehindert werden. In diesem Modell scheint dies ein Charakteristikum der chronischen Entzündung zu sein. Im Gegensatz dazu steigen am Anfang der Entzündungsreaktion sowohl der Anteil der Zellen in Proliferation als auch der Anteil der Zellen in Mitose an.

Eine Zentrosomenzahl größer als zwei ist im normalen Zellzyklus nicht vorgesehen und wird als Zentrosomamplifikation beschrieben. Zentrosomamplifikation wurde schon in vielen soliden Tumoren (Pihan et al., 2001; Lingle et al., 1998; Kuo et al., 2000), aber auch bei der Wundheilung im menschlichen Gewebe nachgewiesen (Oberringer et al., 1999). Ferner

konnten Pihan et al. 2003 Zentrosomenanomalien in in situ-Karzinomen der Zervix, der Prostata und der Mamma nachweisen. Gleichzeitig konnten sie bei diesen frühen Karzinomen kein vermehrtes Auftreten von mutiertem p53 beobachten. Die exemplarisch durchgeführten immunzytochemischen Färbungen von p53 in dieser Arbeit legen ebenfalls den Verdacht nahe, dass in der chronischen Entzündung eine Zentrosomamplifikation entsteht, ohne dass es zu vermehrtem Auftreten von mutiertem p53 kommt. Diese Beobachtung decken sich mit Untersuchungen von Klump et al. (1999) und Neshat et al. (1994). Beide Studien konnten in menschlicher Ösophagasmucosa erst im dysplastischen Gewebe, resp. beim Adenokarzinom ein vermehrtes Auftreten von p53 nachweisen. Eine Zentrosomamplifikation entsteht, wenn die zeitliche Koordination von Zellzyklus und Zentrosomenzyklus gestört ist. Beim Zervixkarzinom konnte nachgewiesen werden, dass überzählige Zentrosomen sowohl mechanistisch, im Sinne einer Fehlverteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen, wirken, als auch in Zellen auftreten, die bereits ein instabiles Genom vorweisen (Duensing und Münger, 2003).

Der Nachweis solcher Zellen während der Entzündungsphase im Ösophagus könnte die These, dass das Adenokarzinom des Ösophagus aufgrund einer Entzündung entsteht, erhärten und einen möglichen Mechanismus auf zellulärer Ebene aufzeigen.

Der Anteil der Zellen mit Zentrosomamplifikation beträgt bei allen untersuchten Mäusen zwischen 2,5% und 10,6% (Mittelwerte der Untersuchungsgruppen). Dabei findet sich in allen Gruppen ein numerischer Anstieg des Anteils der betroffenen Zellen mit zunehmendem Alter der Tiere, wobei die Zunahme nur in der Gruppe der ösophagotomierten Tiere und der Gruppe der Tiere mit Gastrektomie signifikant ist.

Bei isolierter Betrachtung der Tiere mit schwerer Ösophagitis an Untersuchungstag 168 zeigen sich 13,8% der Zellen mit einer Zentrosomamplifikation. Dieser hohe Anteil ist umso bemerkenswerter, als dass es sich um ex vivo gewonnene, und nicht tumoröse Zellen handelt.

Auch ohne aneuploide Zellen direkt nachgewiesen zu haben, kann daher angenommen werden, dass diese Zellen eine genetische Instabilität vorweisen (Lingle et al., 2002). Zum einen dadurch, dass durch die überzähligen Zentrosomen die zelluläre Architektur und damit auch der gerichtete vesikuläre Transport gestört ist. Dies ist ein Merkmal der Anaplasie. Zum anderen ist bekannt, dass überzählige Zentrosomen zur Ausbildung von fehlerhaften Spindeln und darüber hinaus zu einer Fehl- oder Nicht-Verteilung der Chromatiden beitragen (Carroll et al., 1999). Die Folge hieraus wäre eine Aneuploidie (Murphy et al., 2000). Beides, Anaplasie und Aneuploidie, sind Charakteristika maligner Tumore (Salisbury et al., 1999). Zur weiteren Einordnung der Ergebnisse sei eine Untersuchung an Clara-Zellen der Maus aufgeführt. Hier ergab sich in Kultur ein Anteil zentrosomamplifizierter Zellen von 5% (Armit et al., 2002). Parallel wurden Clara-Zellkulturen aus homozygoten p53-ko-Mäusen

untersucht. Diese zeigten in 37,5% der Zellen eine Zentrosomamplifikation, einhergehend mit multinukleierten Zellen und abnormen Spindeln. Auch hier wurden diese Charakteristika als Ausdruck großer genetischer Instabilität gewertet.

Diese sehr hohe Zahl zentrosomamplifizierter Zellen konnte in unserem ex vivo-Modell mit p53-ko-Mäusen nicht reproduziert werden. Exemplarisch wurden zwei Zellpräparationen mittels Perizentrin-Färbung untersucht. Beides waren Zellen von Tieren ohne vorausgegangene Operationen. Eine Maus wurde an Tag 21 und eine an Tag 100 untersucht. An Tag 21 ließ sich eine Zentrosomamplifikation bei 9,52% der Zellen nachweisen, das an Tag 100 untersuchte Tier zeigte dieselbe bei 3,45% der Zellen. Diese Zahlen unterscheiden sich deutlich von den 37,5% der Zellen mit Zentrosomamplifikation in der zuvor beschriebenen Arbeit und gleichen den Werten, die wir für wt-Mäuse bestimmen konnten. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass es sich erstens um andere Zellen handelt, und zweitens um eine Zellkultur, die die Zentrosomamplifikation eventuell triggert.

5.3 Ziele der Arbeit

Auf Basis der gezeigten Ergebnisse können die eigenen Fragen (siehe Kapitel 2.9) beantwortet werden:

1. Es gelingt bei den Tieren eine Ösophagitis zu induzieren, die Folge des Reflux ist und nicht auf dem Op-Trauma alleine beruht. Die weitere Darstellung der Entwicklung von Metaplasie, Dysplasie und Karzinom gelingt in dieser Anordnung nicht.
2. Die histologisch gesehene Basalzellhyperplasie und Epithelverbreiterung korreliert mit der vermehrten Proliferation, die mittels immunzytochemischer Färbung der Zentrosomen gezeigt wurde.
3. Eine Isolierung der einzelnen Zellen aus dem Zellverband und die immunzytochemische Untersuchung ist prinzipiell möglich. Die Hauptschwierigkeiten liegen bei der Untersuchung der Maus in dem begrenzt zu Verfügung stehenden Material und der hohen Plastizität der Zellen, welche Färbung und Mikroskopie erschweren.
4. Zur Darstellung der Zentrosomenzahl war der aus dem Kaninchen gewonnene polyklonale Antikörper gegen Perizentrin der Firma BAbCO, Kalifornien, am besten geeignet. Bezüglich der Ploidie gelingt eine auswertbare Darstellung mittels FISH nicht.
5. Die exemplarisch durchgeführten Untersuchungen zu p53 (Nachweis von p53 bei wt-Mäusen und Zentrosomfärbung von p53-ko-Tieren) lieferten keine Ergebnisse, die auf eine Korrelation von p53 zur Entzündung und Zentrosomamplifikation hinweisen.

5.4 Ausblick

In der Einleitung wurde ausgeführt, dass beim Menschen die Dysplasie im Rahmen eines Barrett-Ösophagus der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung eines Adenokarzinoms der Speiseröhre ist (siehe Kapitel 2.3). Da insbesondere die leichte Dysplasie schwierig nachzuweisen ist, besteht ein Interesse daran molekulare Marker zu identifizieren, die der Dysplasie in der prognostischen Aussage ebenbürtig sind.

In unserem Modell zeigt sich eine signifikante Zentrosomamplifikation bei Tieren mit Ösophagitis, ohne dass histologisch eine Metaplasie oder Dysplasie nachgewiesen werden konnte.

Nimmt man an, dass die Maus nach ausreichend langer, schwerer Ösophagitis eine Metaplasie, eine Dysplasie und schließlich ein Adenokarzinom entwickelt, hätten wir mit der Bestimmung der Zentrosomenzahl zwar noch keinen Marker für die Entwicklung des Adenokarzinoms beim Menschen gefunden, aber zumindest eine starke Motivation im menschlichen Schleimhautepithel nach diesen Veränderungen zu suchen.

6. Anhang

6.1 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
abs.	absolute Zahlen
DP	“Doppelpunkt-förmiges” Signal
DNA	deoxyribonucleic acid (deutsch: Desoxyribonukleinsäure)
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorter (deutsch: Durchflusszytometrie)
g	Gramm
G0, G1, S, G2, M	Phasen des Zellzyklus: G0= Ruhephase, G1= Gap1, S= Synthesephase, G2= Gap2, M= Mitose
h	Stunde
K	Kontrolltier ohne Operation
kD	Kilodalton
KG	Körpergewicht
ko	knock out
KS	Tier nach Ösophagotomie
MBN	N-Methy-N-Benzylnitrosamin
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MTOC	major microtubule organizing center (deutsch: Mikrotubel organisierendes Zentrum)
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Op	Operation
rel.	relativ
resp.	respektiv
RNA	ribonucleic acid (deutsch: Ribonukleinsäure)
S	Standardabweichung
Sig.	Signal
UK	United Kingdom
U/min	Umdrehungen pro Minute

wt wild type

6.2 Chemikalien

Alkohol 70%/80%/96%	Ethanol anteilig in destilliertem Wasser (Berkel, Ludwigshafen)
Blocking Reagens	0,5g „Blocking-Reagens für in situ-Hybridisierung“ (Boehringer Mannheim, Mannheim) zu 100ml 4xSSC
PBS/BSA	zu 100ml PBS wurden 100mg BSA (bovine serum albumin, deutsch: Rinderserumalbumin) zugegeben (Boehringer Mannheim, Mannheim)
DAPI	Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid) (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
Formamid	50% Formamid (Carl Roth, Karlsruhe) in 2fach-SSC
Glycerin	Propan-1,2,3-triol, 1:9 in PBS (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Ketavet/Rompun	100 mg/ml Ketaminhydrochlorid/ 8% Rompun (2% Xylazinhydrochlorid)
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
4% Paraformaldehyd	4g Paraformaldehyd (Carl Roth, Karlsruhe) in 100ml PBS
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline), Tabletten (Oxoid Limited, Hampshire, GB)
P/S 5%	Penicillin 10.000 U/ml, Streptomycin 10 mg/ml in 0,9% NaCl
RNase	10mg/ml in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 50% Glycerin (Boehringer Mannheim, Mannheim)
20X SSC	standard saline-citrate: 17.53g NaCl (Carl Roth GmbH) und 8.82g Natriumcitrat (Carl Roth GmbH) in 100ml doppelt destilliertem Wasser
4x SSC/2x SSC	Verdünnungen von 20x SSC in destilliertem Wasser, pH auf 7,0 mit Zitronensäure eingestellt
Streptavidin- FITC	an Streptavidin conjugiertes FITC (Fluorescein isothiocyanate) (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
Trypsin/EDTA	Trypsin 0,5mg/ml, EDTA 0,22mg/ml in PBS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Carl Roth GmbH)

6.3 Geräte

Eppendorfgefäße, 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
Objektträger 76x26mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Deckgläser 24x50mm	VWR international, Darmstadt, D
Zentrifuge	5415R Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Wasserbad	TWB12, Julabo Labortechnik GmbH, D
Laborwaage	Shinko Danshi/Vibra, Tokio, J
Schüttler	Celloshaker Variospeed Variotime, Renner GmbH, Darmstadt,
Heizplatte	Heidolph MR 3001, Schwabach, D
Mikroskop	Axioskop I, Zeiss, Jena, D

6.4 Tabellen

Ausführliche Darstellung der Ergebnisse der Perizentrinfärbung. Römische Ziffern bezeichnen die Nummer des Tiers in der Gruppe, a bezeichnet den gastralen, b bezeichnet den medialen und c den oralen Abschnitt des Ösophagus. Arabische Ziffern (1 oder 2) bezeichnen den Objektträger. **A:** Tag 1, **B:** Tag 6, **C:** Tag 21, **D:** Tag 42, **E:** Tag 168.

A

	1 Sig.		DP		2 Sig.		2 DP		DP+1 Sig.		3 Sig.		4 Sig.		ausgewertet		von insgesamt		
	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	
Wt K 1																			
Illa	39	0,1772	111	0,5045	58	0,2636	2	0,009	4	0,018	6	0,0273	0	0	0	0	220	317	
IV a	88	0,543	52	0,321	17	0,105	0	0	0	0	4	0,025	1	0,0062	0	0	162	228	
Va	110	0,636	37	0,214	23	0,133	0	0	0	0	3	0,017	0	0	0	0	173	289	
Vla	73	0,5	53	0,363	17	0,116	0	0	1	0,007	2	0,014	0	0	0	0	146	263	
Mittelwert		0,46405		0,350625		0,1544		0,00225		0,00625		0,020825		0,00155					

B

	1 Sig.		DP		2 Sig.		2 DP		DP+1 Sig.		3 Sig.		4 Sig. u. mehr		ausgewertet		von insgesamt	
	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
Wt K 6																		
Ia 1	21	0,7	4	0,1333	5	0,1667	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	107
Ila 1	60	0,2778	115	0,524	34	0,1574	1	0,0046	0	0	4	0,0185	2	0,0092	0	0	216	325
IIla 1	43	0,2	107	0,4977	49	0,228	0	0	7	0,0326	5	0,0233	4	0,0188	0	0	212	304
Mittelwert		0,3926		0,3878		0,184033		0,001533		0,010867		0,013933		0,00933				
Wt KS 6																		
Ia	90	0,45	73	0,365	31	0,155	0	0	0	0	6	0,03	0	0	0	0	200	406
Ila	103	0,4952	78	0,375	22	0,108	0	0	0	0	4	0,0192	1	0,0048	0	0	208	319
IIla	74	0,359	103	0,5	25	0,121	0	0	2	0,0097	2	0,0097	0	0	0	0	206	395
Mittelwert		0,434733		0,413333		0,127333		0,003233		0,019633		0,019633						
Wt Op 6																		
Ia	69	0,4539	61	0,4013	20	0,1316	0	0	0	0	1	0,0066	1	0,0066	0	0	152	250
Ila	65	0,314	107	0,5169	30	0,1449	0	0	1	0,0048	2	0,0097	2	0,0097	0	0	207	357
IIla	22	0,3143	31	0,4429	14	0,2	0	0	2	0,0286	0	0	1	0,0143	0	0	70	121
IVa	91	0,4375	80	0,3846	32	0,1538	0	0	1	0,0048	3	0,0144	1	0,0048	0	0	208	391
Vla	43	0,3675	52	0,4444	16	0,1368	0	0	3	0,0256	2	0,0171	1	0,0085	0	0	117	305
Mittelwert		0,37744		0,43802		0,15342				0,01276		0,00956		0,00878				

	1 Sig.		2 Sig.		2 DP		DP+1 Sig.		3 Sig.		4 Sig.		>4Sig		ausgewertet		von insgesamt	
	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	
Wt K 21																		
Ia	23	0,3333	18	0,2609	0	0	2	0,029	3	0,0435	0	0	0	0	43		69	
IIla 1	27	0,2231	39	0,3223	0	0	5	0,0413	2	0,0165	1	0,0083	0	0	121		229	
IVa 2	30	0,1442	34	0,1635	0	0	5	0,024	4	0,0192	2	0,0096	1	0,0048	208		412	
Mittelwert		0,2335		0,2489				0,03143		0,0264		0,006		0,0016				
Wt KS 21																		
Ia 1	41	0,1943	100	0,4739	60	0,2844	0	0	3	0,0142	7	0,0332	0	0	211		279	
IIa	40	0,404	42	0,424	11	0,111	0	0	6	0,061	0	0	0	0	99		406	
Mittelwert		0,2992		0,44895		0,1977		0,0071		0,0471								
Wt Op 21																		
Ia 1																	20	
IIa 1	65	0,3066	80	0,3774	50	0,2358	0	0	2	0,009	2	0,009	1	0,0047	12	0,0566	212	
IIIa 1	36	0,1678	88	0,4835	43	0,2363	3	0,0165	4	0,022	1	0,0055	2	0,0111	6	0,033	182	
IVa 1	39	0,1711	100	0,4386	71	0,3114	1	0,0044	6	0,0263	6	0,0263	5	0,022	0	0	228	
Va 1	45	0,2055	108	0,4932	45	0,2055	1	0,0046	6	0,0274	5	0,0228	2	0,0092	7	0,032	219	
VIIa	36	0,1607	86	0,3839	91	0,4063	0	0	3	0,0134	5	0,0223	3	0,0134	0	0	224	
VIIa	63	0,3043	75	0,3623	61	0,2947	0	0	2	0,0097	5	0,0242	1	0,0048	0	0	207	
Mittelwert		0,2193		0,42315		0,2817		0,0043		0,01797		0,0184		0,0109		0,020267		

	1 Sig.		DP		2 Sig.		2 DP		DP+1 Sig.		3 Sig.		4 Sig.		>4Sig		ausgewertet		von insgesamt		
	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	
Wt K 42																					
Ila 2	33	0,3333	58	0,58	6	0,06	0	0	0	1	0,01	0	0	0	0	2	0,02	100		222	
Illa 1	28	0,295	47	0,495	13	0,1368	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	6	0,063	95		293	
IVa 1	35	0,243	83	0,576	12	0,0833	0	0	3	0,021	0	0	0	0	0	11	0,076	144		299	
Mittelwert		0,2904		0,5503		0,0934				0,01033		0,00333					0,053				
Wt KS 42																					
Ia 1	15	0,3061	19	0,3878	11	0,2245	0	0	0	0	0	1	0,0204	2	0,0408	1	0,02	49		63	
Illa 1	60	0,2857	92	0,4381	47	0,2238	0	0	5	0,0238	4	0,019	2	0,0095	0	0	0	210		321	
Illa 1	44	0,1739	88	0,3478	101	0,3992	0	0	3	0,0119	7	0,0277	5	0,0198	5	0,0198	253		294		
Mittelwert		0,2552		0,3912		0,2825				0,0119		0,02237		0,02337							
Wt Op 42																					
Ila 1	55	0,2511	86	0,3927	58	0,2648	1	0,0046	3	0,0137	8	0,0365	3	0,0137	5	0,0229	219		420		
Illa 1	37	0,215	81	0,471	41	0,238	0	0	1	0,006	4	0,023	3	0,017	5	0,029	172		258		
IVa 1	45	0,269	76	0,455	36	0,216	0	0	3	0,018	2	0,012	0	0	0	0,03	167		285		
IVa 2	30	0,166	89	0,492	50	0,277	0	0	0	0	0	4	0,022	0	0	8	0,044	181		244	
Va 1	34	0,1574	98	0,4537	80	0,3704	0	0	2	0,0093	0	0	2	0,0093	0	0	216		315		
Vla 2	51	0,2329	115	0,5251	39	0,1781	3	0,014	5	0,023	3	0,014	1	0,0046	2	0,0092	219		485		
Vlla 1	39	0,317	52	0,423	25	0,204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0,057	123		290	
Vlla	77	0,3598	80	0,3738	48	0,2243	0	0	4	0,0187	3	0,014	1	0,0047	1	0,0047	214		419		
Mittelwert		0,246		0,4483		0,2466		0,00233		0,01109		0,01519		0,00616		0,024600					
Ilc 1	39	0,3362	52	0,4483	18	0,1552	0	0	0	0	0	3	0,0259	2	0,0172	2	0,0172	116		229	
IVc 2	36	0,173	110	0,529	41	0,197	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0,091	208		283	
Vc 2	52	0,2261	118	0,513	51	0,2217	1	0,0043	2	0,0087	2	0,0087	0	0	0	2	0,0087	230		330	
Vlc 2	40	0,1878	100	0,4695	57	0,2676	1	0,0047	5	0,0235	5	0,0235	3	0,0141	2	0,0094	213		449		
Vllc 2	23	0,158	86	0,589	30	0,205	1	0,007	2	0,014	2	0,014	0	0	0	2	0,014	146		244	
Wt K 42																					
Ilc 2	32	0,188	93	0,547	29	0,171	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0,094	170		354	
IVb 1	45	0,2419	90	0,4839	32	0,172	2	0,0108	4	0,0215	5	0,0269	1	0,0054	7	0,0376	186		295		

	1 Sig.		DP		2 Sig.		2 DP		DP+1 Sig.		3 Sig.		4 Sig.		>4 Sig.		ausgewertet		von insgesamt		
	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	
Wt K 168																					
Ia 2	22	0,1053	107	0,512	55	0,2632	1	0,0048	7	0,0335	10	0,0478	5	0,0239	2	0,0096	209		299		
Ila 2	43	0,1713	118	0,4701	60	0,239	2	0,008	9	0,0359	12	0,0478	4	0,016	3	0,012	251		411		
Illa 2	55	0,2391	123	0,5348	36	0,1565	0	0	7	0,0304	6	0,0261	3	0,013	0	0	230		369		
Mittelwert		0,1719		0,50563		0,21957		0,0043		0,0333		0,04057		0,0176		0,0072					
Wt KS 168																					
Ia 1	74	0,3541	83	0,3971	41	0,1962	0	0	3	0,0144	5	0,0239	3	0,0144	0	0	209		439		
Ila 1	72	0,338	80	0,3756	48	0,2254	0	0	4	0,0188	7	0,0329	2	0,0094	0	0	213		318		
Illa 1	66	0,3028	104	0,4771	39	0,1789	0	0	4	0,0183	4	0,0183	0	0	1	0,0046	218		353		
Mittelwert		0,33163		0,4166		0,20017				0,0172		0,02503		0,0079							
Wt Op 168																					
Ia 2	75	0,3571	97	0,4619	28	0,1333	0	0	3	0,0143	4	0,019	1	0,005	2	0,0095	133		411		
Ila 2	40	0,168	113	0,4748	53	0,2227	2	0,0084	10	0,042	15	0,063	3	0,0126	6	0,0252	238		428		
Illa 2	28	0,2188	71	0,5547	23	0,1797	0	0	3	0,0234	2	0,0156	1	0,0078	0	0	128		248		
Iva 2	40	0,1843	101	0,4654	39	0,1797	0	0	15	0,0691	10	0,0461	10	0,046	1	0,0046	217		373		
Va 2	43	0,1777	114	0,471	47	0,1942	1	0,0041	14	0,0579	4	0,0165	6	0,0248	4	0,0164	242		409		
Vla 2	41	0,1855	118	0,5339	43	0,1946	4	0,0181	9	0,0407	4	0,0181	1	0,0045	1	0,0045	221		485		
Vlla 2	33	0,25	64	0,4848	19	0,1439	1	0,0076	4	0,03	5	0,0379	3	0,0227	3	0,0228	132		297		
Vlla 1	35	0,1707	96	0,4683	56	0,2737	2	0,0098	4	0,0195	8	0,039	2	0,0098	2	0,0098	205		278		
Mittelwert		0,21401		0,48935		0,19023		0,006		0,0371		0,0319		0,0167		0,01600					
Wt K 168																					
Ib 2	46	0,2062	91	0,408	52	0,2331	1	0,0045	8	0,0359	14	0,0628	11	0,0494	0	0	223		337		
IIIb 2	26	0,1182	120	0,5455	56	0,2545	1	0,0045	6	0,0273	8	0,0364	1	0,0045	2	0,009	220		341		

7. Literaturverzeichnis

1. Agnese V, Cabibi D, Calcara D, Terrasi M, Pantuso G, Fiorentino E, Intrivici C, Colucci G, Aragona F, Gebbia N, Bazan V, Russo A: Aurora-A overexpression as an early marker of reflux-related columnar mucosa and Barrett's oesophagus. *Ann Oncol*, 2007, 6:110-5
2. Archer J, Solomon F: Deconstructing the Microtubule-Organizing Center. *Cell*, 1994, 76:589-591
3. Armit CJ, Shirley O, Clark AR, Harrison DJ: Absence of p53 in Clara cells favours multinucleation and loss of cell cycle arrest. *J Cell Biol*, 2002, 3:27-36
4. Attwood SE, Smyrk TC, DeMeester TR, Mirvish SS, Stein HJ, Hinder RA: Duodeno-oesophageal reflux and the development of esophageal adenocarcinoma in rats. *Surgery*, 1992, 111(5):503-10
5. Bollschweiler E, Hölscher AH: Deutliche Zunahme des Adenokarzinoms im Ösophagus. *Deutsches Ärzteblatt* 2000, 27:1896-1903
6. Blount PL, Galipeau PC, Sanchez CA, Neshat K, Levine DS, Yin J, Suzuki H, Abraham JM, Meltzer SJ, Reid BJ: 17p Allelic Losses in Diploid Cells of Patients with Barrett's Esophagus Who develop Aneuploidy. *Cancer Res*, 1994, 54:2292-2295
7. Bremner CG, Lynch V P, Ellis FH: Jr Barrett's esophagus: Congenital or acquired? An experimental study of esophageal mucosal regeneration in the dog. *Surgery*, 1970, 68:209
8. Carroll PE, Okuda M, Horn HF, Biddinger P, Stambrook PJ, Gleich LL, Li YQ, Tarapore P, Fukasawa K: Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene*, 1999, 18:1935-44
9. Caygill CPJ, Watson A, Lao-Sirieix P, Fitzgerald RC: Barrett's oesophagus and Adenocarcinoma. *W J Surg Onc*, 2004, 2:12-33

10. Cheng A, Balczon R, Zuo Z, Koons JS, Walsh AH, Honkanen RE: Fostriecin-mediated G2-M-phase Growth Arrest Correlates with Abnormal Centrosome Replication, the Formation of Aberrant Mitotic Spindles, and the Inhibition of Serine/Threonine Protein Phosphatase Activity. *Cancer Res*, 58:3611-3619
11. Dichtenberg JB, Zimmerman W, Sparks CA, Young A, Vidair C, Zheng Y, Carrington W, Fay FS, Doxsey SJ: Pericentrin and γ - Tubulin Form a Protein Complex and Are Organized into a Novel Lattice at the Centrosome. *J Cell Biol*, 1998, 141:163-174
12. Doxsey SJ, Stein P, Evans L, Calarco PD, Kirschner M: Pericentrin, a Highly Conserved Centrosome Protein Involved in Microtubule Organization. *Cell*, 1994, 76:639-650
13. Doxsey S: The centrosome – a tiny organelle with big potential. *Nat Genet*, 1998, 20:104-106
14. Duensing S, Münger K: Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. *Progr Cell Cycle Res*, 2003, 5:383-391
15. Ellis FH Jr, Xu X, Kulke MH, LoCicero J 3rd, Loda M: Malignant transformation of the esophageal mucosa is enhanced in p27 knockout mice. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, 122(4):809-14
16. Fein M, Peters JH, Chandrasoma P, Ireland AP, Oberg S, Ritter MP, Bremner CG, Hagen JA, DeMeester TR: Duodenoesophageal reflux induces esophageal adenocarcinoma without exogenous carcinogen. *J Gastrointest Surg*, 1998, 2:260-8
17. Fein M, Peters JH, Baril N, McGarvey M, Chandrasoma P, Shibata D, Laird PW, Skinner KA: Loss of Function of Trp53, but Not Apc, Leads to the Development of Esophageal Adenocarcinoma in Mice with Jejunoesophageal Reflux. *J Surg Res* 1999, 83:48-55
18. Fein M, Peters JH, Demeester TR: Carcinogenesis in reflux disease – In search for bile-specific effects. *Microsurgery* 2007, 27(8):647-650
19. Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Woude GF: Abnormal Centrosome Amplification in the Absence of p53. *Science*, 1996, 271:1744-1747

20. Goldstein SR, Yang GY, Curtis SK, Reuhl KR, Liu BC, Mirvish SS, Newmark HL, Yang CS: Development of esophageal metaplasia and adenocarcinoma in a rat surgical model without the use of a carcinogen. *Carcinogenesis*, 1997, 18(11):2265-70
21. Gray MR, Hall PA, Nash J, Ansari B, Lane DP, Kingsnorth AN: Epithelial proliferation in Barrett's esophagus by proliferating cell nuclear antigen immunolocalization. *Gastroenterology*, 1992, 103:1769-76
22. Hartwell LH, Kastan MB: Cell Cycle Control and Cancer. *Science*, 1994, 266:1821-1828
23. Ireland AP, Clark GW, DeMeesters TR: Barrett's esophagus. The significance of p53 in clinical practice. *Ann Surg*, 1997, 225:17-30
24. Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG, Kerr D, Young LS: Molecular Evolution of the Metaplasia-Dysplasia-Adenocarcinoma Sequence in the Esophagus. *Am J Pathol*, 1999, 154:965-973
25. Joshi HC, Palacios MJ, McNamara L, Cleveland DW: γ -Tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature*, 1992, 356:80- 82
26. Katz PO: Review article: the role of non-acid reflux in gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000, 14:1539-1551
27. Klump B, Hsieh CJ, Holzmann K, Borchard F, Gaco V, Greschniok A, Eckardt VF, Bettendorf U, Gregor M, Porschen R: Diagnostic significance of nuclear p53 expression in the surveillance of Barrett's esophagus – a longitudinal study. *Z Gastroenterol*, 1999, 37:1005-11
28. Komarova YA, Ryabov EV, Alieva IB, Uzbekov RE, Uzbekova SV, Vorobjev LA: Polyclonal Antibodies against Human γ -Tubulin Stain Centrioles in Mammalian Cells from Different Tissues. *Membr Cell Biol*, 1997, 10:503-513

29. Kondo K, Kojima H, Akiyama S, Ito K, Takagi H: Pathogenesis of adenocarcinoma induced by gastrojejunostomy in Wistar rats: role of duodenogastric reflux. *Carcinogenesis*, 1995, 16:1747-51
30. Kuo KK, Sato N, Mizumoto K, Maehara N, Yonemasu H, Ker CG, Sheen PC, Tanaka M: Centrosome abnormalities in human carcinomas of the gallbladder and intrahepatic and extrahepatic bile ducts. *Hepatology*, 2000, 31:59-64
31. Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O: Symptomatic Gastroesophageal Reflux as a Risk Factor for Oesophageal Adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 1999, 340:825-831
32. Levrat M, Lambert R, Kirshbaum G: Esophagitis produced by reflux of duodenal contents in rats. *Am J Dig Dis*, 1962, 7:564-73
33. Lingle WL, Lutz WH, Ingle JN, Maihle NJ, Salisbury JL: Centrosome hypertrophy in human breast tumors: Implications for genomic stability and cell polarity. *J Cell Biol*, 1998, 95:2950-2955
34. Lingle WL, Salisbury JL: Altered Centrosome Structure Is Associated with Abnormal Mitoses in Human Breast Tumors. *Am J Pathol*, 1999, 155:1941-1951
35. Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, D'Assoro AB, Boeneman K, Liu W, Whitehead CM, Reynolds C, Salisbury JL: Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:1978-83
36. Murphy KL, Dennis AP, Rosen JM: A gain of function p53 mutant promotes both genomic instability and cell survival in a novel p53-null mammary epithelial cell model. *FASEB J*, 2000, 14:2291-2302
37. Neshat K, Sanchez SA, Galipeau PC, Blount PL, Levine DS, Joslyn G, Reid BJ: p53 Mutations in Barrett's Adenocarcinoma and High-Grade Dysplasia. *Gastroenterology*, 1994, 106:1589-1595
38. Oberringer M, Lothschütz D, Jennewein M, Koschnick M, Mutschler W, Hanselmann RG: Centrosome Multiplication Accompanies a Transient Clustering of Polyploid Cells during Tissue Repair. *Mol Cell Biol Res Comm*, 1999, 2:190-196

39. Ou Y, Rattner JB: A Subset of Centrosomal Proteins Are Arranged in a Tubular Conformation That Is Reproduced During Centrosome Duplication. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2000, 47:13-24
40. Palanca-Wessels MC, Barrett MT, Galipeau PC, Rohrer KL, Reid BJ, Rabinovitch PS: Genetic Analysis of Long-term Barrett's Esophagus Epithelial Cultures Exhibiting Cytogenetic and Ploidy Abnormalities. *Gastroenterology*, 1998, 114:295-304
41. Pera M, Cardesa A, Bombi JA, Ernst H, Pera C, Mohr U: Influence of esophagojejunostomy on the induction of adenocarcinoma of the distal esophagus in Sprague-Dawley rats by subcutaneous injection of 2,6-dimethylnitroso-morpholine. *Cancer Res*, 1989, 49(23):6803-8
42. Pera M, Fernandez PL, Pera M, Palacin A, Cardesa A, Dasenbrock C, Tillman T, Mohr U: Expression of cyclin D1 and p53 and its correlation with proliferative activity in the spectrum of esophageal carcinomas induced after duodenal content reflux and 2,6-dimethylnitrosomorpholine administration in rats. *Carcinogenesis*, 2001, 22(2):271-277
43. Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ: Centrosome Defects and Genetic Instability in Malignant Tumors. *Cancer Res*, 1998, 58:3974-3985
44. Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Malhotra R, Liotta L, Doxsey SJ: Centrosome defects Can Account for Cellular and Genetic Changes That Characterize Cancer Progression. *Cancer Res*, 2001, 61:2212-2219
45. Pihan GA, Wallace J, Zhou Y, Doxsey SJ: Centrosome Abnormalities and Chromosome Instability Occur Together in Pre-invasive Carcinomas. *Cancer Res*, 2003, 63:1398-1404
46. Pockwinse SM, Krockmalnic G, Doxsey SJ, Nickerson J, Lian JB, Van Wijnen AJ, Stein GS, Penman S: Cell cycle independent interaction of CDC2 with the centrosome, which is associated with the nuclear matrix-intermediate filament scaffold. *Cell Biol*, 1997, 94:3022-3027

47. Rabinovitch PS, Reid BJ, Haggitt RC, Norwood TH, Rubin CE: Progression to Cancer in Barrett's Esophagus is Associated with Genomic Instability. *Lab Invest*, 1989, 60:65-71
48. Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS: Barrett's Esophagus: Cell Cycle Abnormalities in Advancing Stages of Neoplastic Progression. *Gastroenterology*, 1993, 105:119-129
49. Rempel NE: Centrosomes as Scaffolds: The Role of Pericentrin and Protein Kinase A-anchoring Proteins. *J Biol and Med*, 2001, 18:54-58
50. Salisbury JL, Whitehead CM, Lingle WL, Barrett SL: Centrosomes and Cancer. *Biol Cell*, 1999, 91:451-460
51. Salo JA, Lehto VP, Kivilaakso E: Morphological alterations in experimental esophagitis. Light microscopic and scanning and transmission electron microscopic study. *Dig Dis Sci.*, 1983, 28:440-8
52. Schwartz D, Rotter V: p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Cancer Biol*, 1998, 8:325-336
53. Stearns T, Evans L, Kirschner M: gamma-Tubulin Is a Highly Conserved Component of the Centrosome. *Cell*, 1991, 65:825-836
54. Therman E, Susman M: *Human chromosomes; Structure, Behaviour, Effects*. Third Edition, 1993, 149ff
55. Wang XJ, Greenhalgh DA, Jiang A, He D, Zhong L, Medina D, Brinkley BR, Roop DR: Expression of a p53 mutant in the epidermis of transgenic mice accelerates chemical carcinogenesis. *Oncogene*, 1998, 17:35-45
56. Weber RG, Bridger JM, Benner A, Weisenberger D, Ehemann V, Reifemberger G, Lichter P: Centrosome amplification as a possible mechanism for numerical chromosome aberrations in cerebral primitive neuroectodermal tumors with TP53 mutations. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, 83:266-9

57. Winey M: Genome stability: Keeping the centrosome cycle on track. *Curr Biol*, 1996, 6:962-964
58. Xu X, LoCicero J 3rd, Macri E, Loda M, Ellis FH: Jr Barrett's Esophagus and Associated Adenocarcinoma in a Mouse Surgical Model. *J Surg Res*, 2000, 88(2):120-124
59. Young A, Dichtenberg JB, Purohit A, Tuft R, Doxsey SJ: Cytoplasmatic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma tubulin onto centrosomes. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(6):2047-56
60. Zheng Y, Jung MK, Oakley BR: gamma-Tubulin Is Present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and Is Associated with the Centrosome. *Cell*, 1991, 65:817-823
61. Zheng Y, Wong ML, Alberts B, Mitchison T: Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature*, 1995, 378:578-583

8. Dank

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. M. K. Schilling, Direktor der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchführen zu können.

Ich danke Frau Dr. med. D. Kreissler-Haag, Oberärztin der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes für die Betreuung der Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. med. R. Öhrlein für die mikrochirurgischen Operationen der Mäuse, die er mit hoher Expertise durchgeführt hat, und die Betreuung der Tiere. Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. M. D. Menger, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, für die Tierhaltung.

Prof. Dr. med. G. Seitz, Chefarzt des Instituts für Pathologie des Klinikum Bamberg, hat die aufwendige Arbeit der histologischen Untersuchungen unternommen, vielen Dank dafür.

Ich danke Prof. Dr. U. Hartmann, Institut für Experimentalphysik der Universität des Saarlandes, in dessen molekularbiologischem Labor ein Großteil der Färbungen und der Mikroskopie durchgeführt wurde. In diesem Zusammenhang danke ich auch Prof. Dr. med. T. Pohlemann, Direktor der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, der kurzfristig Laborkapazitäten während des Umzugs des molekularbiologischen Labors zur Verfügung gestellt hat.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. M. Oberringer, Diplom-Biologe und aktuell Laborleiter des molekularbiologischen Labors der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes. Ihm verdanke ich das Erlernen wissenschaftlichen Arbeitens im Allgemeinen und der molekularbiologischen Arbeitstechniken im Speziellen.

9. Vortrag

Kreissler-Haag D, Büch P, Öhrlein R, Menger MD, Schilling M, Oberringer M:

Zentrosomenvermehrung in der entzündlichen Ösophagusschleimhaut der Maus.

Vortrag anlässlich der 5. Chirurgischen Forschungstage, Halle/Saale, 2001.

10. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Philipp Martin Büch
Adresse: Höchlingstr. 24
66292 Riegelsberg
Geburtstag: 06.12.1975
Geburtsort: Saarbrücken
Staatsbürgerschaft: deutsch
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1982 – 1986 Grundschule Saarbrücken Bübingen
1986 – 1995 Ludwigsgymnasium Saarbrücken
1995 Abitur

ZIVILDIENTST

1995 – 1996 Ausbildung zum Rettungssanitäter, DRK-Rettungswache
Sulzbach

HOCHSCHULSTUDIUM

1996 – 2003 Medizinstudium an der Universität des Saarlandes,
Medizinische Fakultät Homburg
1998 – 1999 Medizinstudium an der Universität Rennes, Frankreich
2003 Ärztliche Prüfung

BERUF

2003 – 2004 Arzt im Praktikum, Klinikum Saarbrücken, Medizinische Klinik II
seit 2004 Assistenzarzt, Klinikum Saarbrücken, Medizinische Klinik II