

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Klinikum rechts der Isar

Bedeutung von Polymorphismen in den DNA-Reparaturgenen ERCC1 und ERCC2 für das Ansprechen und Überleben von Magenkarzinompatienten nach einer 5FU- und platinbasierten neoadjuvanten Chemotherapie

Nils Olav Henningsen

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. G. Keller

2. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster

Die Dissertation wurde am 14.08.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.01.2009 angenommen.

Meinen Eltern

Hannelore und Wulf-Peter Henningsen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Magenkarzinom	3
1.1.1 Epidemiologie	3
1.1.2 Ätiologie.....	3
1.1.3 Klinik.....	5
1.1.4 Diagnostik	5
1.1.5 Makroskopischer Aspekt und Histopathologie	6
1.1.6 Tumorlokalisierung, Ausbreitung und Staging	7
1.1.7 Prognose und Prognosefaktoren.....	9
1.1.8 Therapie.....	10
1.2 DNA-Reparatur.....	13
1.2.1 Nukleotidexzisionsreparatur.....	14
1.3 Single nucleotide polymorphisms.....	19
1.3.1 ERCC1, C. 354 T>C, Asn118Asn.....	20
1.3.2 ERCC1-8092: C>A	21
1.3.3 ERCC2, C. 2251 A>C, Lys751Gln	22
2 Aufgabenstellung.....	25
3 Materialien und Methoden.....	26
3.1 Patientenkollektiv	26
3.1.1 Erhebung patientenbezogener Daten.....	26
3.1.2 Patienten und Einschlusskriterien	26
3.1.3 Prätherapeutisches Staging.....	27
3.1.4 Neoadjuvante Chemotherapie	28
3.1.5 Responseevaluation.....	29
3.1.6 Operation.....	30
3.1.7 Tumornachsorge.....	31
3.2 Geräte.....	31
3.3 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	32
3.4 Puffer und Lösungen.....	33
3.5 DNA-Extraktion.....	34
3.5.1 Isolierung aus Blut	34
3.5.2 Isolierung aus Paraffinschnitten.....	34
3.5.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Menge und Verdünnung zur Gebrauchslösung	35
3.6 Polymerase-Kettenreaktion.....	36
3.7 Gelelektrophorese	38
3.8 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse	39
3.9 Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	40
3.10 DNA-Sequenzierung	44
3.11 Statistische Auswertung	45
3.11.1 Endpunkte der Studie	45
3.11.2 Klinische und histopathologische Parameter	46
3.11.3 Statistische Tests	47
3.11.4 Multivariate Analyse	48
3.11.5 Haplotypenanalyse	48
3.11.6 Kaplan-Meier-Überlebenskurve.....	49
4 Ergebnisse.....	50
4.1 Klinische und histopathologische Patientencharakteristika.....	50

4.1.1	Ansprechen auf die Chemotherapie und Prognose.....	51
4.1.2	Klinische und histopathologische Parameter und Ansprechen auf die Chemotherapie	53
4.1.3	Klinische und histopathologische Parameter und Prognose.....	56
4.2	DNA-Polymorphismen.....	59
4.2.1	ERCC1-118	61
4.2.2	ERCC1-8092	66
4.2.3	ERCC2-751	70
4.2.4	Haplotypenanalyse.....	74
4.2.5	Multivariate Analyse der Prognose	75
5	Diskussion.....	82
5.1	Endpunkte.....	82
5.1.1	Klinische und histopathologische Response	82
5.1.2	Tumorabhängiges und rezidivfreies Überleben.....	83
5.2	Assoziationsstudien.....	84
5.3	ERCC1-118	85
5.3.1	ERCC1-118 und Ansprechen auf die Chemotherapie.....	85
5.3.2	ERCC1-118 und Prognose.....	86
5.3.3	ERCC1-118 und klinische und histopathologische Parameter.....	90
5.4	ERCC1-8092	91
5.4.1	ERCC1-8092 und Ansprechen auf die Chemotherapie.....	91
5.4.2	ERCC1-8092 und Prognose.....	91
5.4.3	ERCC1-8092 und klinische und histopathologische Parameter.....	92
5.5	ERCC2-751	92
5.5.1	ERCC2-751 und Ansprechen auf die Chemotherapie.....	93
5.5.2	ERCC2-751 und Prognose.....	93
5.5.3	ERCC2-751 und klinische und histopathologische Parameter.....	95
5.6	ypM-Kategorie und Residualtumorstatus.....	95
6	Zusammenfassung	97
7	Literaturverzeichnis	98
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	105
9	Danksagung	108

Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3' untranslatierte Region
5-FU	5-Fluorouracil
5-JÜR	5-Jahres Überlebensrate
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AEG	Adenocarcinoma of the Esophagogastric junction
Ala	Alanin
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BseMI	siehe BsrDI
BsrDI	Geobacillus stearothermophilus D I (Restriktionsenzym)
C	Cytidin
Ca	Karzinom
CA19-9	Cancer Antigen 19-9
CA72-4	Cancer Antigen 72-4
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CSA / CSB	Cockayne Syndrome Group A / B
CT	Computertomographie
CTP	Cytidintriphosphat
D1 / D2	limitierte bzw. ausgedehnte Lymphadenektomie
ddNTP	Didesoxy-Nukleosidtriphosphat
dest.	Destilliert
DHPLC	Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA pol	DNA-Polymerase
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DRC	DNA-Reparaturkapazität
EAP	Etoposid, Adriablastin, Cisplatin
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group (Performance Status)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-PLF	Epirubicin + PLF
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementing Group 1 (NER-Gen)
ERCC2	Excision Repair Cross-Complementing Group 2 (NER-Gen)
EUS	Endoluminaler Ultraschall
EvG-Färbung	Elastica van Gieson-Färbung
G	Guanosin
G1-G4	histologisches Grading
GGR	Globale Genomreparatur
Gln	Glutamin
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München
GTP	Guanosintriphosphat
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hHR23B	Human RAD23 protein B
hMLH	Humanes MutL Homolog (DNA Mismatch Reparaturgen)
hMSH	Humanes MutS Homolog (DNA Mismatch Reparaturgen)
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
hPMS	Human Postmeiotic Segregation increased 2 isoform (DNA Mismatch Reparaturgen)
Kb	Kilo Basen

kDa	Kilo Dalton
Lnn.	Lymphknoten
Lys	Lysin
M.	Morbus = Krankheit
MboII	Moraxella bovis II (Restriktionsenzym)
MRC	Medical Research Council
mRNA	Messenger RNA
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NSCLC	nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
OLF	Oxaliplatin, Leucovorin, 5-Fluorouracil
p-	pathologisches Staging (TNM-Präfix)
p53	Tumorprotein p53
PAS	Periodic-acid-Schiff-reaction
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PKIS	Pathologisch-klinisches Informationssystem
PLF	Cisplatin, Leucovorin, 5-Fluorouracil
R0-R2	Residualtumorstatus 0-2
RdI	Klinikum rechts der Isar, TUM
RF-C	Replication Factor C
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNA pol II	RNA Polymerase II
RPA	Replication Protein A
rs	Referenznummer in der National Center for Biotechnology Information (NCBI) SNP Datenbank
S	Standardabweichung
SNP	single nucleotide polymorphism
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA(-Puffer)
TCR	Translation Coupled
TEAA	Triethylammonium-Acetat
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TFIIH	Transkriptionsfaktor II H
TNM	Tumorklassifizierung
Trp	Tryptophan
TTP	Thymintriphosphat
Tu	Tumor
TUM	Technische Universität München
UICC	Union International Contre le Cancer
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat (Polymorphismus)
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XPA-XPG	Xeroderma pigmentosum group A-G gene
y-	Staging nach Therapie (TNM-Präfix)

1 Einleitung

1.1 Magenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit ist das Magenkarzinom eine der häufigsten neoplastischen Erkrankungen des Menschen, obwohl die Häufigkeit des intestinalen Typs (siehe 1.1.5) besonders in den USA und in Europa seit Jahrzehnten abnimmt. Zudem gibt es große geographische Unterschiede. Am höchsten ist die Inzidenz in Japan, Südamerika, Osteuropa und Teilen des Mittleren Ostens (Siewert et al., 2001a, S. 447).

In Deutschland ist das Magenkarzinom trotz ebenfalls rückläufiger Tendenz die fünfthäufigste Krebserkrankung bei Männern und die sechsthäufigste bei Frauen und stellt immer noch eine der häufigsten tumorbedingten Todesursachen dar (Bertz et al., 2006).

Das Risiko, an einem Magenkarzinom zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter. In Deutschland liegt das mittlere Erkrankungsalter bei ca. 70 Jahren für Männer und bei ca. 75 Jahren für Frauen (Bertz et al., 2006). Besonders das diffuse Karzinom nach Lauren (siehe 1.1.5) betrifft jüngere Menschen jedoch auch schon vor dem 30. Lebensjahr (Hamilton, 2000).

Männer sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Siewert et al., 2001a, S. 447). Außerdem ist in der männlichen Bevölkerung der westlichen Welt ein starker Anstieg von Karzinomen im Bereich der Kardia zu verzeichnen (Siewert et al., 2001a, S. 448).

1.1.2 Ätiologie

Die Genese des Magenkarzinoms ist multifaktoriell. Genetische und exogene Faktoren sowie Vorerkrankungen des Magens spielen bei der Tumorentstehung eine Rolle.

Durch Anhäufung unterschiedlicher genetischer Veränderungen kommt es zur fortlaufenden Transformation des normalen Epithels zum klinisch manifesten Karzinom. Dabei spielen Tumorsuppressorgene, Onkogene und DNA-Reparaturgene eine entscheidende Rolle. Während der diffuse Typ nach Lauren (1.1.5) gehäuft in nicht metaplastischem Gewebe auftritt, entwickelt sich der intestinale Typ über die Metaplasie und das Adenom zum Karzinom (Siewert et al., 2001a, S. 453).

Die Mehrzahl der Magenkarzinome tritt sporadisch auf. Nur in etwa 10% der Fälle findet man eine familiäre Häufung (Keller, 2005), allerdings ist in diesem Fall das relative Risiko, an Magenkrebs zu erkranken, auf mehr als das Doppelte erhöht (La Vecchia et al.,

1992). Es wird angenommen, dass ca.1-3% der Magenkarzinome im Rahmen eines hereditären Prädispositionssyndroms auftreten (Keller, 2005). Einige Beispiele sind in Tabelle 1 aufgelistet. Neben den genannten Haupttumoren und den Magenkarzinomen kann noch eine Vielzahl anderer Tumoren gefunden werden.

Tabelle 1: Magenkarzinome bei hereditären Tumorsyndromen (Keller, 2005)

Syndrom	Defektes Gen	Haupttumor(en)
HDGC (Hereditäres diffuses Magenkarzinomsyndrom)	E-Cadherin	Magenkarzinome vom diffusen Typ n. Lauren
HNPCC (Hereditäres non-polypöses Kolonkarzinomsyndrom)	hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS2	Kolonkarzinom
Li-Fraumeni-Syndrom	p53	Mammakarzinom, Osteosarkom, Hirntumore, Weichteilsarkome
FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis coli)	APC	Adenome und Karzinome des Kolons

Fall-Kontroll-Studien zeigen jedoch auch beim sporadisch auftretenden Magenkarzinom ein zwar gering aber konsistent erhöhtes Risiko für Verwandte ersten Grades (Hamilton, 2000). DNA-Polymorphismen (Definition siehe 1.3) in Genen unterschiedlichster Funktion wurden in Zusammenhang mit einem erhöhten Magenkarzinomrisiko gebracht, was eine Verbindung zwischen genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen herstellt (Tabelle 2) (Roberts-Thomson and Butler, 2005).

Tabelle 2: DNA-Polymorphismen und erhöhtes Magenkarzinomrisiko (Roberts-Thomson and Butler, 2005)

Funktion des Gens	Bezeichnung des Gens	Art des Polymorphismus
Schutz der Mukosa	Mucin 1	15 VNTR: Allele 1-5 lang, Allele 6-15 kurz
Entzündungsgeschehen	Interleukin-1 β	C-31T (SNP im Promoter)
Gluthationstoffwechsel	Glutathion-S-Transferase	Gen Deletion
Folsäurestoffwechsel	Methylentetrahydrofolatreduktase	C677T (Ala -> Val)
Nukleinsäurestoffwechsel	Thymidilatsynthase	6 bp Deletion in der 3'UTR
DNA-Reparatur	<i>X-ray repair cross complementing group 1</i>	Exon 6 C26304T (Arg194Trp)

Ein wichtiger exogener Faktor für das Magenkrebsrisiko ist die Ernährung. Während der Verzehr von frischem Obst und Gemüse protektiv wirkt, gilt für einen erhöhten Kochsalzverbrauch und für den Verzehr von gepökeltem Fleisch und Fisch das Gegenteil

(Hamilton, 2000). Weiterhin werden Alkohol und Tabakrauch verdächtigt, zur Tumorgenese beizutragen (Hamilton, 2000).

Die chronische Gastritis aufgrund einer Infektion mit *Helicobacter pylori* ist mit einem stark erhöhten Karzinomrisiko behaftet (Hamilton, 2000). Erhöhte Entartungsrisiken findet man außerdem u. a. bei der Typ-A-Gastritis mit perniziöser Anämie, beim operierten Magen (Billroth I und II) (Magenstumpfkarcinom) und beim M. Ménétrier (Siewert et al., 2001a, S. 449).

1.1.3 Klinik

Frühsymptome des Magenkarzinoms sind oft nicht vorhanden oder diskret und unspezifisch, z. B. Druckgefühl im Oberbauch und dyspeptische Beschwerden (Hamilton, 2000; Siewert et al., 2001a, S. 459). Die Symptomatik variiert zudem je nach Tumorlokalisierung und Ausbreitung (siehe 1.1.6). Es kann u. a. zu Gewichtsverlust, abdominalen Schmerzen, Kachexie, Erbrechen, Dysphagie und gastrointestinalen Blutungen kommen (Kumar et al., 2005). Als Zeichen einer fortgeschrittenen Metastasierung können Hepatomegalie, Aszites und typischerweise eine linksseitige, supraklavikuläre Lymphknotenvergrößerung (Virchow-Lymphknoten) auftreten (Siewert et al., 2001a, S. 459).

1.1.4 Diagnostik

Der aktuelle Goldstandard zur Diagnose des Magenkarzinoms ist die Videoendoskopie mit mehreren bioptischen Probeentnahmen zur histologischen Sicherung (Siewert et al., 2001a, S. 460). Die gebräuchlichen Tumormarker (CEA, CA 19-9 und Ca 72-4) sind nicht zur Diagnose sondern nur als Verlaufsparemeter in der Tumornachsorge geeignet.

Einen besonderen Stellenwert nimmt die möglichst exakte Evaluation des klinischen TNM-Stadiums ein (siehe auch 1.1.6), auf deren Basis das genau abgestimmte multimodale Therapiekonzept beruht. Die T-Kategorie wird hierbei am besten per endoluminalem Ultraschall (EUS) bestimmt. In 79-92% wird das Ergebnis durch das postoperative pathologische Staging bestätigt (Lordick and Siewert, 2005). Mit einer Genauigkeit von 85-90% kann mit dem EUS eine R0-Resektabilität vorhergesagt werden (Lordick and Siewert, 2005). Weiterhin dient die EUS zur Bestimmung befallener regionärer Lymphknoten. Da nur vergrößerte Lymphknoten als maligne bewertet werden können, liegt die diagnostische Genauigkeit nur zwischen 65-87% (Siewert et al., 2001a, S. 461). Um eine Peritonealkarzinose auch schon im Anfangsstadium zu erfassen, ist eine

Laparoskopie mit Lavage und zytologischer Diagnostik notwendig (Lordick and Siewert, 2005). Fernmetastasen können weitgehend per CT ausgeschlossen werden.

1.1.5 Makroskopischer Aspekt und Histopathologie

Bei der Klassifikation des morphologischen Aspekts wird zwischen Frühkarzinomen und fortgeschrittenen Magenkarzinomen unterschieden (Definitionen siehe 1.1.6). Das fortgeschrittene Magenkarzinom wird nach Borrmann in vier Hauptgruppen eingeteilt. Die lokalisierten Typen I und II weisen eine günstigere Prognose auf als die infiltrativen Typen III und IV (Lawrence, 1973).

Szirröse Magenkarzinome, welche diffus alle Magenwandschichten infiltrieren, werden auch als Linitis plastica bezeichnet (Siewert et al., 2001a, S. 455). Durch bindegewebige Umwandlung kommt es zu einer Schrumpfung des Magens mit plumpen und starren Schleimhautfalten (Pschyrembel, 2004, S. 1053).

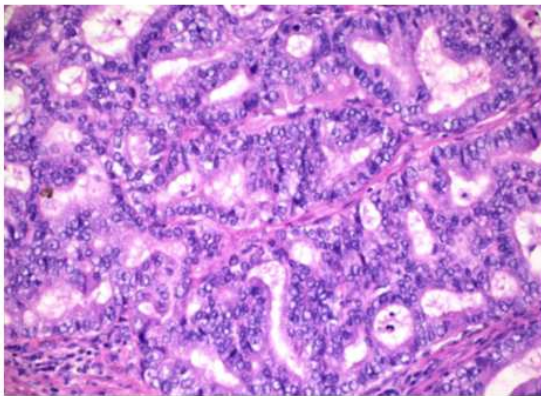
Trotz großer histologischer Variabilität dominiert in der Regel eines von vier Wachstumsmustern, welches dann entscheidend ist für die Klassifikation nach der WHO-Klassifikation (siehe Tabelle 3) (Hamilton, 2000).

Das Grading, also die Bestimmung des Differenzierungsgrades des Tumorgewebes, erfolgt auf der Basis verschiedener histologischer und zytologischer Parameter, wie z.B. Ähnlichkeit mit dem Umgebungsgewebe, mitotische Aktivität und Nekrosen (Siewert et al., 2001a, S. 454). Es werden vier Grade unterschieden. G1 und G2 werden als „*Low-Grade-Tumoren*“ und G3 und G4 als „*high grade*“ zusammengefasst (Siewert et al., 2001a, S. 454). In Tabelle 3 sind mögliche bzw. obligate Differenzierungsgrade der histologischen Typen aufgelistet.

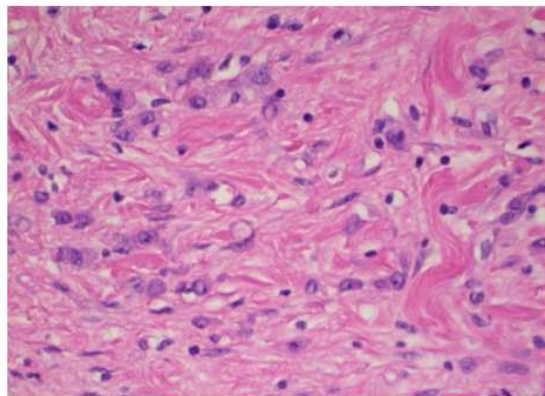
Tabelle 3: Histologische Klassifikation des Magenkarzinoms nach der WHO (Hamilton, 2000; Siewert et al., 2001a)

Häufigkeit	Bezeichnung	Grading
Häufig	Tubuläres Adenokarzinom	G1 – G3
	Papilläres Adenokarzinom	
	Muzinöses Adenokarzinom	
	Siegelringzellkarzinom	G3
Selten	Platteneithelkarzinom	G1 – G3
	Adenosquamöses Karzinom	G1 – G3
Sehr selten	Kleinzelliges Karzinom	G4
	Undifferenziertes Karzinom	G4

Nach Lauren wird das Magenkarzinom in einen intestinalen (polypös wachsenden) und einen diffusen (infiltrativ wachsenden) Typ eingeteilt (Lauren, 1965). In der Regel kann man nur beim intestinalen Laurentyp die Entwicklung über die sog. Metaplasie-Adenom-Karzinom-Sequenz beobachten. Die zwei Lauren-Typen weisen epidemiologische (1.1.1) und ätiologische (1.1.2) Unterschiede auf. Zudem sind sie bedeutend für das Ausmaß des Resektionsverfahrens (Siewert et al., 2001a, S. 463) und zeigen unterschiedliches Metastasierungsverhalten (siehe 1.1.6). Tumoren mit annähernd gleich großen intestinalen und diffusen Anteilen werden als Mischtyp bezeichnet. Zusammen mit Tumoren des diffusen Typs bezeichnet man sie auch als nicht intestinal (Siewert et al., 2001a, S. 455). Undifferenzierte Karzinome werden als nicht klassifizierbar eingestuft.



intestinaler Typ nach Lauren:
HE-Färbung, 200fache Vergrößerung



diffuser Typ nach Lauren (Siegelringzell-Ca):
HE-Färbung, 400fache Vergrößerung

Abbildung 1: Histologisches Bild des Magenkarzinoms

1.1.6 Tumorlokalisierung, Ausbreitung und Staging

Tabelle 4 zeigt die Häufigkeiten der Tumorlokalisationen bei Patienten einer groß angelegten deutschen 10-Jahres-Studie (Siewert et al., 1998). Die proximal an der Kardia bzw. subkardial gelegenen Magenkarzinome werden auch als Karzinome des gastroösophagealen Übergangs (AEG) Typ II und III nach Siewert bezeichnet (Siewert et al., 2001b, S. 440).

Tabelle 4: Tumorlokalisierung beim Magenkarzinom (Siewert et al., 1998)

Tumordrittel	Häufigkeit
proximal	30 %
mittel	39 %
distal	28 %
ganzer Magen	5 %
Sonstiges	6 %

Aufgrund meist fehlender bzw. unspezifischer Frühsymptome (siehe 1.1.3) zeigt die große Mehrheit der Patienten bei Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium (Hamilton, 2000). Nur innerhalb endoskopischer Screeningprogramme in Japan werden in ca. 80% Frühstadien diagnostiziert (Hamilton, 2000).

Beim Staging des Magenkarzinoms unterscheidet man, wie bei soliden Tumoren üblich, die präoperative TNM-Klassifikation (Tabelle 5) auf der Grundlage klinischer und bildgebender Untersuchungsergebnisse und die pTNM-Klassifikation, die sich auf den postoperativ-histopathologischen Befund stützt. Das Präfix y bedeutet, dass es sich um den Status nach einer Therapie handelt (z. B. ypTNM nach Chemotherapie). Von der TNM-Klassifikation leitet sich wiederum die Stadieneinteilung nach der UICC ab (Tabelle 6) (Siewert et al., 2001a).

Tabelle 5: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms (Wittekind et al., 2005)

T: Primärtumor

Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ, intraepithelialer Tumor <u>ohne</u> Infiltration der Lamina propria
T1	Frühkarzinom: Tu infiltriert Lamina propria mucosae oder Submukosa
T2	Tu infiltriert Muscularis propria oder Subserosa
T3	Tu penetriert Serosa (viszerales Peritoneum) <u>ohne</u> Infiltration benachbarter Strukturen
T4	Tu infiltriert benachbarte Strukturen (z. B. Milz, Darm, Leber)

N: Regionäre Lymphknoten

NX	Regionäre Lnn. können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-6 regionären Lnn.
N2	Metastasen in 7-15 regionären Lnn.
N3	Metastasen in mehr als 15 regionären Lnn.

M: Fernmetastasen

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Ohne Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 6: UICC-Stadieneinteilung des Magenkarzinoms nach der TNM-Klassifikation (Siewert et al., 2001a)

	N0	N1	N2	N3
T1	IA	IB	II	IV
T2	IB	II	IIIA	
T3	II	IIIA	IIIB	IV
T4	IIIA			
M1				IV

Die Tumorausbreitung erfolgt *per continuitatem* durch Infiltration benachbarter Strukturen (z. B. Ösophagus, Kolon, Leber, Milz, Pankreas), *per contiguitatem* als Bauchfellkarzinose (evtl. mit Aszites), bei Frauen auch über Abtropfmetastasen in die Ovarien (sog. Krukenberg-Tumor) und mittels lymphogener und hämatogener Metastasierung (Siewert et al., 2001a). Während Tumoren vom intestinalen Typ nach Lauren vor allem die Leber und die Lymphknoten infiltrieren, metastasiert der diffuse Typ sehr rasch ins Peritoneum (Siewert et al., 2001a, S.461).

1.1.7 Prognose und Prognosefaktoren

Die unspezifische bzw. spät auftretende Symptomatik (1.1.3) und die meist damit verbundene fortgeschrittene Tumorausbreitung (1.1.6) erklären, dass in Deutschland die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von Magenkarzinompatienten knapp 30% beträgt (Bertz et al., 2006). Hinzu kommt, dass häufig auch schon in frühen Stadien eine lymphogene und hämatogene Metastasierung erfolgt (1.1.6) und dass Magenkarzinome nur in begrenztem Maße auf Chemo- und Strahlentherapie (1.1.8) ansprechen (Lordick and Siewert, 2005).

Ein Prognosefaktor ist ein Parameter, der für sich allein die Prognose eines Patienten unabhängig beeinflussen kann (Siewert et al., 2001a, S. 457). Verifizierte tumorbezogene Prognosefaktoren beim Magenkarzinom sind das TNM-Stadium, die R-Kategorie, die Lymphknotenratio (Quotient aus befallenen und entfernten Lymphknoten) und freie Tumorzellen in der abdominellen Lavage (Siewert et al., 2001a, S. 457). Daneben gibt es noch eine Reihe vermuteter Prognosefaktoren wie z. B. histologische Klassifikation, Grading und tumorbiologische Faktoren. Der wichtigste patientenbezogene Prognosefaktor ist der Allgemeinzustand des Patienten (Karnofsky-Index).

Bei Patienten mit Tumoren in lokal fortgeschrittenen Stadien ist die Prognose hauptsächlich vom Residualtumorstatus (Tabelle 7) und somit von der Resektabilität des Tumors abhängig (Siewert et al., 2001a, S. 458). In den USA und Westeuropa beträgt das Langzeitüberleben auch nach angemessener chirurgischer Therapie (1.1.8) nicht mehr als

50% (Lordick and Siewert, 2005). Nach inkompletten (R1- und R2-) Resektionen, sowie bei bereits erfolgter Fernmetastasierung (M1) überlebt kaum ein Patient.

1.1.8 Therapie

Die Grundlage der kurativen Therapie des Magenkarzinoms ist chirurgisch, wobei stets die vollständige Resektion des Tumors, also eine „R0-Resektion“ (Tabelle 7) angestrebt wird (Lordick and Siewert, 2005). Art und Ausmaß des Eingriffs richten sich vor allem nach der Tumorlokalisation, dem Staging (siehe 1.1.6) und der Histopathologie (siehe 1.1.5) des Tumors. Für die chirurgische Therapie des lokal fortgeschrittenen Magenkarzinoms stellt sich immer stärker die Überlegenheit der erweiterten (D2) gegenüber der limitierten (D1) Lymphadenektomie heraus, vorausgesetzt, dass diese mit einer akzeptablen Mortalität und Morbidität durchgeführt werden kann (Lordick and Siewert, 2005). Die chirurgischen Eingriffe, die bei den Patienten dieser Studie durchgeführt wurden, werden im Kapitel 3.1.6 erläutert.

Tabelle 7: postoperativer Residualtumorstatus (R-Kategorie)

R0	Kein Resttumor nachweisbar
R1	Mikroskopischer Resttumor
R2	Makroskopischer Resttumor
RX	Resttumor nicht beurteilbar

Zusätzlich zur operativen Behandlung stehen grundsätzlich zwei weitere Therapieoptionen zur Verfügung: die Strahlentherapie zur lokalen Kontrolle des Tumors und die Chemotherapie zur systemischen Kontrolle der Tumorerkrankung (Lordick and Siewert, 2005).

Bei der Chemotherapie unterscheidet man je nach Zeitpunkt der Chemotherapie zwei Konzepte. Neoadjuvant bedeutet vor, adjuvant nach dem chirurgischen Eingriff. Da das Patientenkollektiv dieser Studie neoadjuvant therapiert wurde, soll darauf im nächsten Abschnitt (1.1.8.1) eingegangen werden, während zur adjuvanten Chemotherapie und zur Strahlentherapie keine weiteren Ausführungen folgen.

1.1.8.1 Neoadjuvante Chemotherapie

Unter neoadjuvanter Chemotherapie versteht man eine präoperative Chemotherapie mit dem Ziel, durch Verkleinerung des Tumors (*down-shrinking*) eine Steigerung der R0-Rate (siehe 1.1.8) zu erzielen.

Die Tatsache, dass sich ein Großteil der Patienten bei Diagnosestellung in einem lokal fortgeschrittenen Stadium befindet, unterstreicht die Bedeutung der neoadjuvanten Chemotherapie in der Therapie des Magenkarzinoms.

Theoretische und klinische Vorteile der neoadjuvanten Chemotherapie sind (Siewert et al., 2001a):

1. Ein in der Regel präoperativ besserer Allgemeinzustand des Patienten führt im Gegensatz zur adjuvanten Chemotherapie zu einer besseren Verträglichkeit. Dies ermöglicht die Anwendung aggressiverer Behandlungsschemata (insbesondere cisplatinhaltige Kombinationen).
2. Intakte Blut- und Lymphwege ermöglichen die Zufuhr der Zytostatika in zytotoxischen Konzentrationen in das Tumorgewebe.
3. Die Prognose in diesem Stadium hängt maßgeblich davon ab, ob eine R0-Resektion durchgeführt werden kann, wozu eine Chemotherapie durch Verkleinerung des Tumors (*down-shrinking*) beitragen kann.
4. Es ist der früheste Therapieansatz, um die systemische Tumorausbreitung zu bekämpfen, die oftmals schon in Form klinisch okkulten Mikrometastasen begonnen hat und in vielen Fällen die schlechte Langzeitprognose bedingt.
5. Die Verschleppung vitaler Tumorzellen in die Bauchhöhle während der Operation wird vermindert.

Der Wirksamkeitsnachweis einer perioperativen Chemotherapie des Magenkarzinoms, d. h. neoadjuvant und adjuvant, ist im Rahmen des multizentrischen, randomisierten und prospektiven MRC Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy Trial (MAGIC Trial) erbracht worden (Cunningham et al., 2006). In diese Studie wurden 503 Patienten mit potenziell resektablen Karzinomen des Magens, des gastroösophagealen Übergangs und des distalen Ösophagus eingeschlossen. Sie wurden entweder rein chirurgisch (S-Gruppe) oder zusätzlich mit einer perioperativen Chemotherapie mit Epirubicin, Cisplatin und 5-FU (CSC-Gruppe) therapiert. In der CSC-Gruppe zeigte sich ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben (Relatives Progressions-Risiko 0,66; 95%-CI: 0,53-0,81; $p < 0,001$) und ein signifikant längeres Gesamtüberleben (Relatives Sterberisiko 0,75; 95%-CI 0,60-0,93; $p = 0,009$). Ob und in welchem Maße diese Unterschiede auf die neoadjuvante oder die adjuvante Chemotherapie zurückzuführen sind, lässt sich allerdings nicht sagen.

Unstrittig ist jedoch, dass Patienten, welche auf die neoadjuvante Chemotherapie ansprechen (ca. 30%, sog. Responder), eine signifikant verbesserte Prognose im Vergleich zu Non-Respondern aufweisen (Ott et al., 2003). Patienten, die nicht ansprechen, erhalten

über Monate eine kostspielige und psychisch wie körperlich belastende Therapie, die zudem die Operation verzögert.

Zur neoadjuvanten Therapie lokal fortgeschrittener Magenkarzinome werden hauptsächlich Cisplatin und 5-FU eingesetzt. Daneben kommen u. a. Oxaliplatin, Docetaxel, Paclitaxel, Epirubicin, Etoposid und Adriablastin zum Einsatz.

1.1.8.1 Platinderivate und Platinresistenz

Platinderivate wurden seit ihrer klinischen Erprobung Anfang der 70er Jahre in zunehmendem Maße zur Therapie einer Vielzahl maligner Tumoren, u. a. auch des Magenkarzinoms, eingesetzt. Cisplatin gehört heute zu den am stärksten verbreiteten antitumorösen Substanzen. Wegen seiner Neuro- und Nephrotoxizität wurden weitere, weniger toxische platinhaltige Chemotherapeutika wie das Oxaliplatin und Carboplatin entwickelt (siehe Abbildung 2)(Frei et al., 2003).

Platinderivate bestehen aus einem Platinatom und vier oder sechs Liganden. Die Chloridgruppen des Cisplatin, bzw. die Carboxylestergruppen des Oxaliplatin und des Carboplatins können im biologischen Milieu durch nukleophile Atome ersetzt werden. So entstehen starke kovalente Bindungen mit Proteinen und Nukleinsäuren. Zytotoxisch wirken platinhaltige Substanzen, indem sie sog. *bulky adducts* zwischen zwei Basen eines DNA-Strangs (*intrastrand crosslink*) oder zwischen den Basen verschiedener DNA-Stränge (*interstrand crosslink*) bilden (siehe Abbildung 3)(Frei et al., 2003).

Abbildung 2: Platinderivate (Frei et al., 2003)

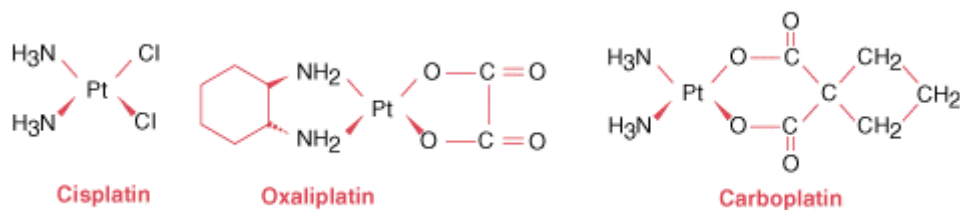
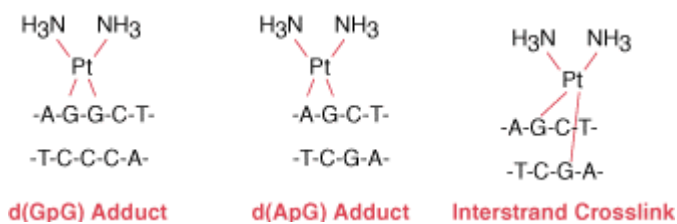


Abbildung 3: Cisplatin-DNA-Adducts (Frei et al., 2003)



Man kennt verschiedene Mechanismen, die für die antiproliferative Wirkung von DNA schädigenden Substanzen verantwortlich sind und in unterschiedlichem Maße zum

Gesamteffekt der Chemotherapie beitragen können (Roninson, 2002): Die gegensätzlichen Pole sind die Nekrose auf der einen und die Apoptose auf der anderen Seite (Broker et al., 2005). Bei der Nekrose kommt es charakteristischer Weise zum Zellödem, zum Zerreißen der Zellmembran und zur Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe. Die Apoptose kann durch Blockade der Replikation und Behinderung des Zellzyklus eingeleitet werden. Sie wird durch spezifische Proteasen (Caspasen) vermittelt und geht mit einer Schrumpfung der Zelle einher (Broker et al., 2005). Zur sog. mitotischen Katastrophe kommt es, wenn die betroffene Zelle in die Mitose eintritt, ohne vorher die DNA-Schäden zu reparieren (siehe 1.2). Ein weiterer Mechanismus ist die induzierte Seneszenz („Zellalterung“). Es kommt hierbei zwar nicht zum Zelltod, aber vermittelt durch eine Reihe von Wachstumsinhibitoren zu einem Proliferationstop (Roninson, 2002).

Zu den Mechanismen einer zellulären Resistenz gegenüber Platinderivaten zählen u. a. eine verminderte Aufnahme in die Zelle, eine beschleunigte Metabolisierung und Inaktivierung der platinhaltigen Substanzen sowie eine verstärkte Reparatur platininduzierter DNA-Schäden vor allem durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) (siehe 1.2.1) (Frei et al., 2003) und im geringeren Maße auch über andere Reparaturwege wie z. B. die Basenexzisionsreparatur. Die DNA-Reparatur scheint besonders bei geringgradiger Platinresistenz die wichtigste Rolle zu spielen (Dabholkar et al., 1994).

1.2 DNA-Reparatur

Eine Zelle hat verschiedene Möglichkeiten auf eine DNA-Schädigung zu reagieren. Der Schaden kann toleriert werden, oder es kommt zum Zelltod bzw. zur Wachstumsblockade (siehe 1.1.8.1.1). Eine weitere Möglichkeit ist, dass der Zellzyklus unterbrochen bzw. verzögert wird, um eine Reparatur der DNA-Schäden zu ermöglichen (Damia et al., 1998). Die DNA-Reparatur ist ein biologisch sehr wichtiger Prozess, der dafür sorgt, dass die ständig spontan und induziert auftretenden DNA-Schäden entfernt werden. Dadurch wird verhindert, dass DNA-Schäden akkumulieren, welche die Transkription von Genen blockieren, die DNA-Replikation stören oder sich als Mutationen manifestieren. Schätzungsweise über 200 Proteine sind direkt oder indirekt an der DNA-Reparatur beteiligt. Die Verschiedenartigkeit und Bandbreite möglicher DNA-Schäden erfordert entsprechend unterschiedliche DNA-Reparatursysteme, die in komplexer Weise zusammenwirken (Seyffert, 2003, S. 561). Zur Zeit sind sechs verschiedene DNA-Reparaturmechanismen bekannt (Madhusudan and Middleton, 2005). Dies sind die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) (siehe 1.2.1), die Basenexzisionsreparatur, die

Mismatch-Reparatur, die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, die direkte Reparatur von *alkyl adducts* und die Reparatur von *interstrand-crosslinks*. Jeder Reparaturweg scheint weitgehend unabhängig von den anderen zu funktionieren, auch wenn es Hinweise auf funktionelle Verbindungen gibt (Reed, 2005). Auf die Nukleotidexzisionsreparatur wird im Kapitel 1.2.1 näher eingegangen.

Die immense Bedeutung der DNA-Reparatur für den Erhalt der Genomstabilität wird auch durch die Tatsache deutlich, dass viele involvierte Enzyme über die Evolution hinweg stark konserviert wurden und Keimbahnmutationen in DNA-Reparaturgenen zu Tumor-Prädispositionssyndromen führen können (siehe auch 1.1.2) (Madhusudan and Middleton, 2005). Des Weiteren legt eine Vielzahl neuerer Studien nahe, dass das Krebsrisiko verschiedenster Tumoren durch interindividuelle Unterschiede in der DNA-Reparaturkapazität beeinflusst wird (siehe 1.3) (Madhusudan and Middleton, 2005).

1.2.1 Nukleotidexzisionsreparatur

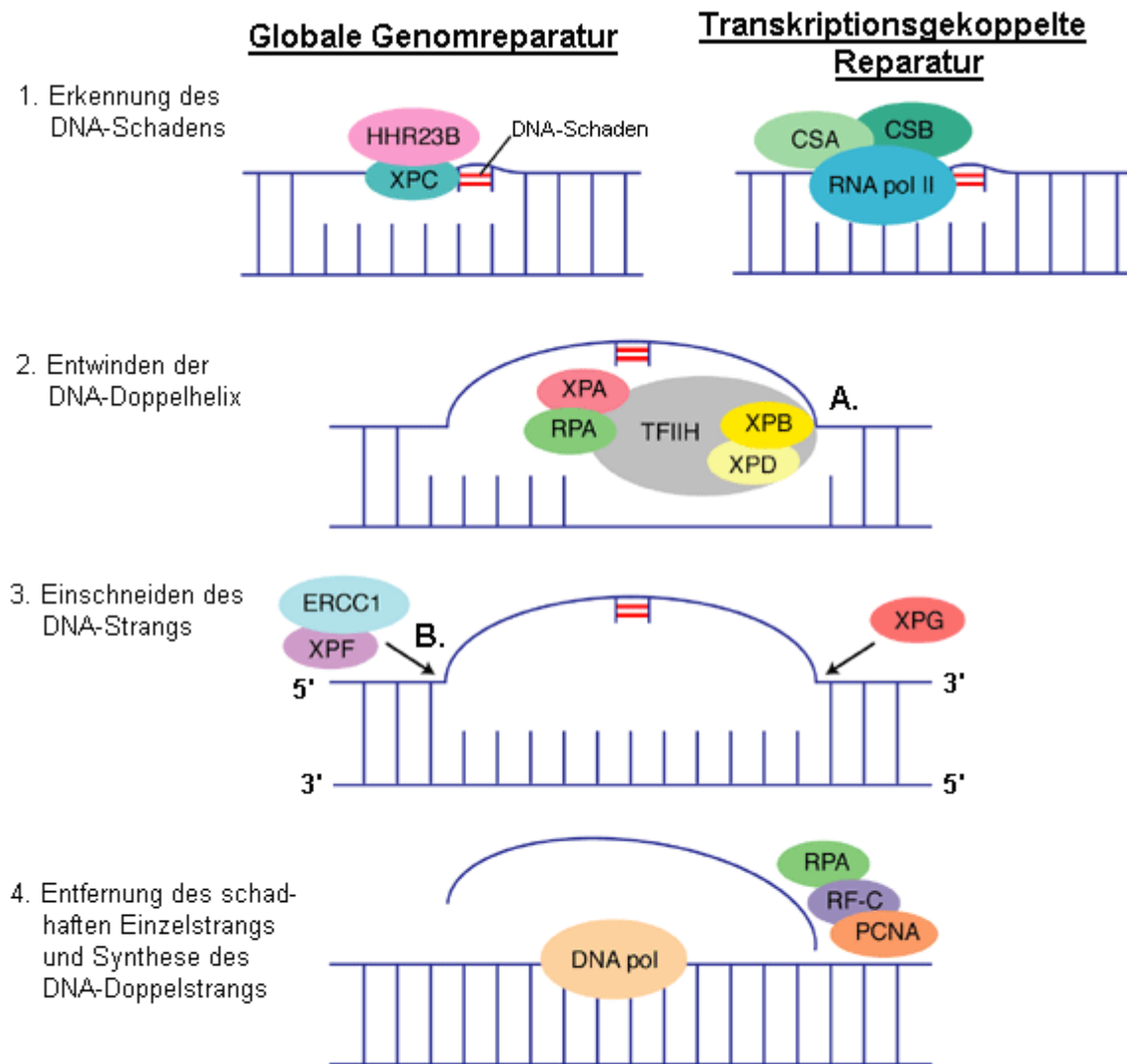
Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) erkennt und eliminiert eine Vielzahl von DNA-Schäden. Dazu gehören unter anderem durch UV-Strahlung induzierte Pyrimidindimere, sowie sog. *bulky lesions*, welche z. B. durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe und Platinderivate (siehe 1.1.8.1.1) verursacht werden (Reed, 2005). Die NER erfolgt schrittweise: 1. Erkennen des DNA-Schadens, 2. Entwinden der DNA-Doppelhelix, 3. Einschneiden auf beiden Seiten des Schadens, 4. Entfernung des schadhaften Stranges (24-32 bp), 5. Verschließen der Lücke durch Reparatursynthese (Goode et al., 2002).

Die NER läuft im gesamten Genom nicht gleichmäßig schnell ab. DNA-Schäden in nicht kodierenden Sequenzen und inaktiven Genen werden langsamer repariert als solche in aktiven Genen. Hier wiederum wird der transkribierte Strang schneller repariert als der nicht transkribierte. An der NER sind mehr als 25 Proteine beteiligt (Seyffert, 2003, S. 565).

Man unterscheidet zwei Untergruppen der NER. Die globale Genomreparatur (GGR) überwacht das gesamte Genom, während die transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR) nur die DNA-Schäden repariert, welche die RNA-Polymerasen blockieren.

Abbildung 4 stellt den Ablauf der Nukleotidexzisionsreparatur schematisch dar. Bei der globalen Genomreparatur sucht ein spezifischer XPC-hHR23B-Komplex die DNA nach Schäden ab. Die transkriptionsgekoppelte DNA-Reparatur setzt ein, wenn die RNA-Polymerase II blockiert wird (Seyffert, 2003, S. 566). Ein Komplex aus den TCR-spezifischen Faktoren CSA und CSB entfernt die Polymerase und macht so den Schaden der Reparatur zugänglich (Seyffert, 2003, S. 566).

Die folgenden Schritte sind wahrscheinlich bei der GGR und der TCR weitgehend identisch. Die Helikasen ERCC2 (XPD) und ERCC3 (XPB) als Bestandteile des Transkriptionsfaktors TFIIH entwenden den DNA-Strang (siehe 1.2.1.2). XPA markiert den Schaden, indem es mit hoher Affinität an der Schadstelle bindet. Das einzelstrangbindende Protein RPA (*replication protein A*) bindet an den ungeschädigten Strang und wirkt somit stabilisierend. Durch die Endonukleasen XPG und ERCC1/XPF (siehe auch 1.2.1.1) wird der geschädigte Strang auf der 3'- und 5'-Seite des Schadens eingeschnitten und ein Oligonukleotid von ca. 30 bp entfernt. Danach schließen DNA-Ligasen die entstandene Lücke (Seyffert, 2003, S. 567).



- A. Die Helikasen XPD (ERCC2) und XPB (ERCC3) entwenden die DNA-Doppelhelix und sind Bestandteil des Transkriptionsfaktors II
 B. Der Heterodimer ERCC1-XPF ist eine 5'-Exzisionsnuklease

Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) (Matsumura and Ananthaswamy, 2002)

Die NER spielt jedoch nicht nur bei der Reparatur potenziell karzinogener Mutationen sondern auch bei der Resistenz gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika eine wichtige Rolle (siehe 1.1.8.1). So konnte bei NER-defizienten Zellen eine erhöhte Cisplatinsensitivität festgestellt werden (Frei et al., 2003). Außerdem ist es möglich mit Substanzen, welche die Aktivität von NER-Enzymen hemmen, die Cisplatinsensitivität zu erhöhen bzw. die Cisplatinresistenz zu durchbrechen (Frei et al., 2003). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch Cisplatin und Oxaliplatin verursachte DNA-Schäden durch die NER beseitigt werden. *Interstrand DNA crosslinks* werden in cisplatinresistenten Zellen schneller repariert, während Zellen mit erhöhter Sensitivität eine verminderte Fähigkeit haben, diese Läsionen zu entfernen (Frei et al., 2003).

Auf die NER-Gene ERCC1 und ERCC2 soll näher eingegangen werden, da die in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen auf diesen Genen liegen.

1.2.1.1 ERCC1

ERCC1 steht für *excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*. Das Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 19 lokalisiert (19q13.2-13.3) (Goode et al., 2002). Es hat eine Länge von ca. 15 kb und besitzt 10 Exons, die für ein Protein aus 297 Aminosäuren kodieren (Reed, 2005). ERCC1 wurde während der Evolution stark konserviert und gehört zur ERCC1/RAD10/SWI10 Familie mit homologen Genen u. a. in *E. coli* und in Pflanzen (Reed, 2005). Es ist beim Menschen kein Polymorphismus (Definition siehe 1.3) bekannt, welcher mit einer veränderten Aminosäuresequenz einhergeht (Shen et al., 1998).

ERCC1 scheint in der Nukleotidexzisionsreparatur eine Schlüsselposition einzunehmen. XPA, das der Schadensmarkierung dient, bindet an das Heterodimer aus ERCC1 und XPF, welches die Funktion einer 5'-Exzisionsnuklease hat (siehe Abbildung 4) (Altaha et al., 2004). Diese schneidet mittels der XPF-Nuklease-Domäne den geschädigten Strang nach Entwindung und Markierung auf der 5'-Seite des Schadens ein, wobei ein Oligonukleotid von 24 bis 32 Basen entfernt wird (siehe 1.2.1) (Tsodikov et al., 2005). Da XPF defiziente Zellen niedrige Konzentrationen an ERCC1-Protein und umgekehrt aufweisen, nimmt man an, dass sich die Bildung des Heterodimers stabilisierend auf beide Proteine auswirkt. ERCC1 und XPF treten jeweils über eine carboxyterminale *helix-hairpin-helix*-Domäne in Wechselwirkung (bei ERCC1 die Aminosäuren (AS) 220 bis 297). Schon kleine Deletionen am carboxyterminalen Ende von ERCC1 oder XPF resultieren in einem Aktivitätsverlust (Tsodikov et al., 2005). Die sog. zentrale Domäne von ERCC1 (AS 96 bis 214) ist der XPF-Nuklease-Domäne strukturell ähnlich, hat jedoch keine Nukleaseaktivität.

Allerdings interagiert sie mit XPA, was essentiell für die Nukleotidexzisionsreparatur ist (siehe 1.2.1) (Tsodikov et al., 2005). Daneben hat das Heterodimer ERCC1-XPF noch Funktion in der Reparatur von *interstrand crosslinks* und bei der homologen Rekombination.

Man nimmt an, dass nur das vollständige Transkript von ERCC1 funktionsfähig ist. Eine bekannte Splicevariante ohne Exon VIII hat hingegen vermutlich eine Helferfunktion bei der DNA-Reparatur (Dabholkar et al., 1994). Weitere Splicevarianten des Gens wurden beschrieben bzw. deren Existenz wurde vermutet (Reed, 2005). In einer Reihe von Ovarialkarzinomzelllinien konnte die Präsenz von alternativ gesplizetem ERCC1 (mRNA und Platin) mit vermindertem Entfernen von Platin-Adducts assoziiert werden (Altaha et al., 2004).

Vermutlich kommt ERCC1 auch bei der Regulation der Nukleotidexzisionsreparatur eine Schlüsselfunktion zu (Ferry et al., 2000). In Ovarialkarzinomzellen mit erhöhter Platinresistenz und erhöhtem ERCC1-mRNA-Level wurden ebenfalls erhöhte mRNA-Konzentrationen anderer NER-Gene, wie z. B. XPA, XPB, XPC und CSB, gefunden (Dabholkar et al., 2000; Ferry et al., 2000). Reed konnte eine obligate Reihenfolge in der Regulation der mRNA von vier NER-Genen feststellen: Zunächst steigt die ERCC1-Konzentration. Erst danach kommt es zum Anstieg der Konzentration von XPB, XPA und CSB (Reed et al., 2000).

ERCC1 hat durch seine Schlüsselfunktion in der NER auch einen Einfluss auf das Ansprechen auf platinhaltige Chemotherapeutika. In mehreren In-vitro-Studien konnte der Einfluss einer Cisplatinbehandlung auf die ERCC1-Expression in Ovarialkarzinomzelllinien gezeigt werden (Altaha et al., 2004). Im Vergleich zeigten höhergradig resistente Zelllinien höhere ERCC1-mRNA- und ERCC1-Proteinkonzentrationen (Ferry et al., 2000; Selvakumaran et al., 2003). Mittels Transfektion von Antisense-ERCC1-mRNA gelang es die Cisplatinresistenz von Zelllinien zu durchbrechen und die Cisplatinsensibilität bereits sensibler Zelllinien zu erhöhen. Die Autoren stellten zudem eine erhöhte DNA-Reparaturkapazität in den Zellen fest (Selvakumaran et al., 2003). In einer anderen Studie konnte bei ERCC1 defizienten Zellen durch Transfektion von ERCC1 die Fähigkeit, Cisplatin-Adducts zu reparieren, wiederhergestellt werden (Li et al., 2000). Des Weiteren wurde in mehreren Untersuchungen ein zeit- und dosisabhängiger Anstieg der ERCC1-mRNA und Proteinkonzentration in Ovarialkarzinomzelllinien nach Cisplatinbehandlung festgestellt (Altaha et al., 2004). Auch in einer Reihe von anderen humanen Karzinomzelllinien (z. B. Zervixkarzinom,

kolorektales Karzinom) konnte eine Korrelation zwischen der ERCC1-Expression und der Behandlung mit platinhaltigen Substanzen beobachtet werden (Altaha et al., 2004).

Neben den oben erwähnten In-vitro-Studien wurden ebenfalls mehrere klinische Studien publiziert, die einen Zusammenhang zwischen der ERCC1-mRNA-Expression und dem Ansprechen und der Prognose nach einer platinhaltigen Chemotherapie zeigen konnten (Altaha et al., 2004). Bei 56 mit Cisplatin und Gemcitabin behandelten Lungenkarzinompatienten wurde die prätherapeutische ERCC1-mRNA-Konzentration im Tumor gemessen. Hohe Konzentrationen gingen mit einem signifikant schlechteren Überleben einher, während der Einfluss auf das Ansprechen nicht signifikant war (Lord et al., 2002).

Auch bei gastrointestinalen Tumoren konnten solche Assoziationen beobachtet werden. Ein prätherapeutisch niedriger intratumoraler ERCC1-mRNA-Spiegel war bei 50 Patienten mit metastasierten kolorektalen Karzinomen, die mit Oxaliplatin und 5-FU behandelt wurden, mit einem signifikant besseren Überleben korreliert (Shirota et al., 2001). Zwei Gruppen untersuchten Ösophaguskarzinompatienten nach Bestrahlung und Chemotherapie mit Cisplatin und 5-FU. Joshi et al. stellten einen günstigen prognostischen Effekt einer niedrigen ERCC1-mRNA-Konzentration fest (n = 84) (Joshi et al., 2005). Warnecke-Eberz et al. setzten die mRNA-Konzentration im Tumor in Relation zu der in Normalgewebe. Patienten mit einem niedrigen Quotienten („relative mRNA-Konzentration“) zeigten ein signifikant besseres Ansprechen auf die platinbasierte Chemotherapie (Warnecke-Eberz et al., 2004). Allerdings konnten nicht in allen Studien diese Zusammenhänge gezeigt werden. Beispielsweise fanden Langer et al. keine Korrelation bei Adenokarzinomen des Ösophagus (Langer et al., 2005).

Der Einfluss der ERCC1-mRNA-Expression auf das Ansprechen einer platinhaltigen Chemotherapie bei Magenkarzinomen wurde in zwei Studien untersucht. Während Metzger et al. bei 38 Patienten eine signifikante Korrelation zwischen hohen mRNA-Level, schlechtem Ansprechen und einer geringeren Überlebenszeit fanden (Metzger et al., 1998), konnten Napieralski et al. dies bei 61 Patienten nicht feststellen (Napieralski et al., 2005).

Steffensen et al. fanden bei 100 Ovarialkarzinompatientinnen, die platinbasiert therapiert wurden, eine positive Korrelation zwischen hoher ERCC1-Proteinexpression und einer schlechteren Ansprechrate jedoch keinen Zusammenhang mit dem Überleben (Steffensen et al., 2007).

1.2.1.2 ERCC2

ERCC2 steht für *excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2*. Das Gen hat 23 Exons und ist ebenfalls auf dem langen Arm des Chromosom 19 lokalisiert (19q13.2-13.3) (Goode et al., 2002).

ERCC2 kodiert für eine 87 kDa schwere und 760 Aminosäuren lange 5'-3'-Helikase. Im Rahmen der NER entwindet die Helikase ERCC2 zusammen mit der Helikase ERCC3 (= XPB) die geschädigte DNA-Helix auf einer Länge von ca. 30 bp im Bereich des Schadens (Clarkson and Wood, 2005; Seyffert, 2003, S. 563). Als Bestandteil des Transkriptionsfaktors TFIIH hat ERCC2 auch bei der Initiation der Transkription eine wichtige Funktion. Die Helikasefunktion von ERCC2 scheint hierfür jedoch nicht von Bedeutung zu sein (Clarkson and Wood, 2005).

XPD (Xeroderma pigmentosum Group D) wird synonym mit ERCC2 gebraucht und weist darauf hin, dass Träger eines defekten Gens an der autosomal rezessiv vererbaren Krankheit Xeroderma pigmentosum leiden. Ursächlich sind Mutationen in den sieben hoch konservierten Helikasedomänen des Gens (Clarkson and Wood, 2005). Die Betroffenen haben insbesondere ein stark erhöhtes Hautkrebsrisiko, da die UV-induzierten Pyrimidindimere nicht normal von der NER repariert werden (Clarkson and Wood, 2005). Defekte ERCC2-Varianten findet man auch im Rahmen anderer hereditärer Syndrome, wie z. B. beim Cockayne Syndrom (Clarkson and Wood, 2005).

1.3 Single nucleotide polymorphisms

Unter einem *single nucleotide polymorphism* (SNP) versteht man die Substitution eines einzelnen Nukleotids durch ein anderes (Seyffert, 2003). Die Allelfrequenz beträgt im Gegensatz zur Mutation in einer bestimmten Population definitionsgemäß mindestens 1%. SNPs treten über das menschliche Genom verteilt mit einer Frequenz von ca. 1/1000 bp auf (Madhusudan and Middleton, 2005). Diese genetischen Variationen können, wenn der Basenaustausch in der kodierenden Region (Exon) eines Gens liegt, den Austausch einer Aminosäure im kodierten Protein zur Folge haben oder „stumm“ bleiben (*silent SNP*), d.h. das neu entstandene Basentriplet kodiert für die gleiche Aminosäure.

SNPs in DNA-Reparaturgenen könnten eine veränderte DNA-Reparaturkapazität nach sich ziehen. Im Rahmen maligner Erkrankungen kann sich das dann wiederum auswirken auf das Krebsrisiko, die Tumorbiologie, die Zytotoxizität DNA schädigender Chemotherapeutika, das Ansprechen, die Toxizität und letztlich auf die Prognose der Patienten (Madhusudan and Middleton, 2005).

In den folgenden Kapiteln wird auf die untersuchten SNPs näher eingegangen.

1.3.1 ERCC1, C. 354 T>C, Asn118Asn

Der Polymorphismus ERCC1-118 (rs11615) liegt im Exon 4 von ERCC1. Das betroffene Basentriplet ist das Kodon 118, welches als Wildtyp (AAT) wie auch als Variante (AAC) für Asparagin kodiert (Shen et al., 1998). Die Allelhäufigkeit der C-Variante in der weißen Bevölkerung wird in der Literatur mit ca. 0,40 angegeben (Matullo et al., 2005; Zhou et al., 2005).

Ob ERCC1-118 selbst eine funktionelle Bedeutung, ist unklar. Der Polymorphismus liegt in der zentralen Domäne von ERCC1 (siehe 1.2.1.1), ändert jedoch nicht die Aminosäuresequenz. Er befindet sich weder auf einer regulatorischen Bindungsstelle (Stoehlmacher et al., 2004) noch in einer Splice-Region (Shen et al., 1998).

Park et al. konnten bei mit Oxaliplatin und 5-FU behandelten Kolonkarzinompatienten (n = 31) eine schwach signifikante Korrelation des T-Allels mit einer erhöhten intratumoralen ERCC1-mRNA-Konzentration feststellen (Park et al., 2002). Im Gegensatz dazu stehen die Resultate einer Studie von Yu et al. Sie konnten bei Ovariakarzinomzelllinien, die sich hinsichtlich des Polymorphismus ERCC1-118 unterschieden, eine Assoziation zwischen dem T-Allel und einem reduzierten ERCC1-mRNA-Spiegel sowie einer reduzierten DNA-Reparaturkapazität beobachten (Yu et al., 2000). Steffensen et al. wiederum fanden keine Korrelation zwischen ERCC1-Proteinexpression und dem SNP ERCC1-118 (Steffensen et al., 2007).

Tabelle 8 gibt eine Übersicht über Studien, welche Korrelationen zwischen ERCC1-118 und dem Ansprechen bzw. dem Überleben nach einer platinhaltigen Chemotherapie bei verschiedenen Karzinomen untersucht haben.

Tabelle 8: Studien ERCC1-118 und platinhaltige Chemotherapie

Autor / Jahr	Karzinom	Chemotherapie	N	Genotyp / Allel mit besserer Prognose*	Genotyp / Allel mit besserem Ansprechen*
(Ruzzo et al., 2006)	Magen	P, F		n. s.	n. s.
(Su et al., 2007)	NSCLC	platinbasiert	110	--	CC
(de Las Penas et al., 2006)	NSCLC	P, G	135	n. s.	--
(Isla et al., 2004)	NSCLC	P, Dt	62	CC	--
(Ryu et al., 2004)	NSCLC	P	109	CC	n. s.

Autor / Jahr	Karzinom	Chemotherapie	N	Genotyp / Allel mit besserer Prognose*	Genotyp / Allel mit besserem Ansprechen*
(Zhou et al., 2004)	NSCLC	P oder Cb	128	n. s.	--
(Park et al., 2003)	CRC	platinbasiert	106	CC	--
(Stoehlmacher et al., 2004)	CRC	O, F	106	CC	--
(Viguier et al., 2005)	CRC	F, O	61	--	T
(Steffensen et al., 2007)	Ovar	Cb, Cp	100	n. s.	TT
(Liu et al., 2005)	Melanom	P, V, Dn, IL-2, Ia ± T	90	CT+TT	CT+TT

* signifikante Resultate ($p < 0,05$) fett; *Tendenz kursiv*; n. s. = nicht signifikant; -- = nicht untersucht
 NSCLC = nicht kleinzelliges Lungenkarzinom; CRC = kolorektales Karzinom
 P = Cisplatin; G = Gemcitabin; Dt = Docetaxel; Cb = Carboplatin; O = Oxaliplatin; F = 5-Fluorouracil; Cp = Cyclophosphamid; V = Vinblastin; Dn = Dacarbazin; IL-2 = Interleukin-2; Ia = IFN-alpha; T = Tamoxifen

1.3.2 ERCC1-8092: C>A

Der Polymorphismus ERCC1-8092 (rs3212986) befindet sich in der 3' untranslatierten Region des Gens, wobei das C der Wildtypvariante durch ein A ersetzt wird. Die Allelfrequenz für die seltenere A-Variante wird für die weiße Bevölkerung mit ca. 0,25 angegeben (Wrensch et al., 2005; Zhou et al., 2005).

Die funktionelle Relevanz dieses Polymorphismus ist ebenfalls unklar. Er liegt nicht in einer bekannten regulatorischen Einheit von ERCC1 (Shen et al., 1998). Es wird vermutet, dass dieser Polymorphismus einen Einfluss auf die mRNA-Stabilität haben könnte (Chen et al., 2000; Park et al., 2003). Im Gegensatz zu ERCC1-118 finden sich keine Studien, welche die Assoziation zwischen ERCC1-8092 und der DNA-Reparaturkapazität untersucht haben.

Der Polymorphismus resultiert ebenfalls in einem Aminosäureaustausch von Lysin in Glutamin des Kodons 504 im Exon 3 des nukleolären Protein ASE-1 (Anti-Sense to ERCC1) (Whitehead et al., 1997; Yang et al., 2005). Dieses Gen wird in Gegenrichtung (*antisense*) abgelesen und überlappt sich teilweise mit ERCC1. ASE-1 (oder auch *RNA polymerase I-associated factor* PAF49) scheint für die Initiation der rRNA-Transkription nötig zu sein (Panov et al., 2006; Yamamoto et al., 2004). Welchen Effekt der Polymorphismus in diesem Zusammenhang haben könnte, ist jedoch nicht erforscht.

Zwei Studien befassen sich mit dem Einfluss von ERCC1-8092 auf das Überleben nach einer platinhaltigen Chemotherapie (Tabelle 9). In einer Studie von Suk (n = 214) hatten

NSCLC-Patienten mit der CC-Variante ein signifikant geringeres Risiko, an gastrointestinaler Toxizität Grad 3/4 zu leiden (Suk et al., 2005).

Derzeit gibt es keine Studie, welche den Polymorphismus ERCC1-8092 im Zusammenhang mit dem Magenkarzinom untersucht hat.

Tabelle 9: Studien ERCC1-8092 und platinhaltige Chemotherapie

Autor / Jahr	Karzinom	Chemotherapie	n	Genotyp / Allel mit besserer Prognose*	Genotyp / Allel mit besserem Ansprechen*
(Zhou et al., 2004)	NSCLC	P oder Cb	128	CC	--
(Park et al., 2003)	CRC	platinbasiert	106	n. s.	--

* signifikante Resultate (**p < 0,05**) **fett**; *Tendenz kursiv*; n. s. = nicht signifikant; -- = nicht untersucht
 NSCLC = nicht kleinzelliges Lungenkarzinom; CRC = kolorektales Karzinom
 P = Cisplatin; Cb = Carboplatin

1.3.3 ERCC2, C. 2251 A>C, Lys751Gln

Der SNP ERCC2-751 (rs13181) führt zu einem Austausch von A durch C des Nukleotids im Kodon 751 des Exon 23 nahe des C-Terminus des Gens. Dadurch wird Lysin durch Glutamin ersetzt (Shen et al., 1998). In neun Studien wird die Frequenz des selteneren C-Allels bei insgesamt 1558 weißen Probanden mit ca. 0,36 (0,29 – 0,42) angegeben (Dybdahl et al., 1999; Hou et al., 2002; King et al., 2005; Matullo et al., 2005; Shen et al., 1998; Spitz et al., 2001).

Der Polymorphismus ERCC2-751 befindet sich in der carboxyterminalen Domäne des Enzyms. Seker et al. konnten zeigen, dass der Polymorphismus in der Bindungsregion für p53 das Tumorsuppressorgen liegt (Seker et al., 2001). Das könnte deshalb von Bedeutung sein, weil p53 einerseits die NER-Aktivität modulieren kann (Seker et al., 2001) und andererseits eine Rolle bei der Regulation der Apoptose, der Seneszenz und der mitotischen Katastrophe spielt (siehe 1.1.8.1.1) (Roninson, 2002). Allerdings konnten Seker et al. keinen Einfluss dieses Polymorphismus auf die Bindungskapazität zwischen ERCC2 und p53 beobachten (Seker et al., 2001).

Zahlreiche Autoren haben die Assoziation von ERCC2-751 mit der DNA-Reparaturkapazität (DRC) untersucht. Eine Übersicht über die Ergebnisse dieser Studien gibt Tabelle 10. In der Mehrzahl wurden DNA-Schäden in Leukozyten gemessen. Es wurden jedoch auch Mamma- und Lungenkarzinome sowie lymphoblastoide Zelllinien untersucht. Die Messungen dieser für die NER meist spezifischen Surrogate, wie z. B. Pyrimidindimere oder *Adducts* von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe

Tabelle 10: Assoziationen zwischen ERCC2-751 und DNA-Reparaturkapazität

Autor / Jahr	Teilnehmer (Untergruppe)	n	Material	DNA-Schädigung -> Surrogat	GT / Allel mit DRC ↑
(Duell et al., 2000)	Gesunde	61	Leukozyten	-> SCE, PAH-Ad	n. s.
(Lunn et al., 2000)	gesunde Frauen	31	Leukozyten	RX -> CA	CC + AC
(Moller et al., 2000)	Psoriatiker ± BCC	34	Leukozyten	UV -> SB	CC
(Hemminki et al., 2001)	Gesunde (>50 Jahre)	44 (25)	Haut	UV -> PD	n. s. (A)
(Matullo et al., 2001)	Gesunde (Nichtraucher)	308 (131)	Leukozyten	-> PAH-Ad	n. s. (AA)
(Palli et al., 2001)	Straßenarbeiter Kontrollen	100 114	Leukozyten	-> PAH-Ad	AA n. s.
(Seker et al., 2001)	Lymphoblastoide Zelllinien	34	Lymphoblastoide Zelllinien	UV, RX -> AR	n. s.
(Spitz et al., 2001)	Lungen-Ca Kontrollen	341 360	Leukozyten	PAH -> HCR	A n. s.
(Hou et al., 2002)	Lungen-Ca Kontrollen	185 162	Leukozyten	-> PAH-Ad	n. s. A
(Qiao et al., 2002)	Gesunde	102	Leukozyten	UV -> HCR	AA + AC
(Tang et al., 2002)	Kontrollen BBD Mamma-Ca	103 94 121	Brustdrüsen- gewebe, Tumoren	-> PAH-Ad	n. s. n. s. A
(Pastorelli et al., 2002)	Lungen-Ca + Raucher	60	Leukozyten	-> PAH-Ad	n. s.
(Au et al., 2003)	Gesunde	49	Leukozyten	UV -> CA	AA
(Hou et al., 2003)	Lungen-Ca	97	Tumormaterial	-> p53-Trans	AA
(Affatato et al., 2004)	Gesunde (Raucher)	65 39	Leukozyten	-> CA + NA -> CA	n. s. (n. s.)
(Harms et al., 2004)	Lungen-Ca Kontrollen	79 69	Leukozyten	-> CA	AA AA
(Shi et al., 2004)	Mamma-Ca Kontrollen	69 79	Leukozyten	PAH -> HCR	n. s. AA
(Ryk et al., 2005)	Blasen-Ca	327	Leukozyten	-> p53-Trans	n. s.
(Pavanello et al., 2005)	Kohleofen- Arbeiter	67	Leukozyten	-> PAH-Ad	n. s.

n. s. = keine signifikante Korrelation; AR = Apoptoserate; BBD = *benign breast disease*; CA = *chromatid aberrations*; DRC = DNA-Reparaturkapazität; GT = Genotyp; HCR = host cell reactivation; NA = Nitrosamin; p53-Trans = Transversionen (Mutationen) in p53; PAH = polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe; PAH-Ad = PAH-Adducts; PD = Pyrimidindimere; RX = radioaktive Strahlung; SCE = *sister chromatid exchange*

(PAH), wurden entweder direkt oder nach einer DNA-schädigenden Behandlung, z. B. mit UV-Strahlung, vorgenommen. Hou et al. und Ryk et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen ERCC2-751 und p53-Transversionen. Das sind Mutationen, die mit einer verringerten DRC in Verbindung gebracht werden. Eine weitere Möglichkeit, die

Reparaturkapazität zu messen, ist die sog. *host cell reactivation*: Die zu untersuchenden Zellen (hier Leukozyten) werden mit Plasmiden transfiziert, die mit geschädigten Genen von Indikator-Enzymen beladen sind. Nach einer definierten Zeit wird die Enzymaktivität gemessen, die davon abhängig ist, wie viel Enzym durch die DNA-Reparatur reaktiviert werden konnte. Studienergebnisse, welche den Einfluss des Polymorphismus ERCC2-751 auf das Outcome bzw. das Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie untersuchten, sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11: Studien ERCC2-751 und platinhaltige Chemotherapie

Autor / Jahr	Karzinom	Chemotherapie	n	GT / Allel = Prognose↑ *	GT / Allel = Ansprechen↑ *
(Camps et al., 2003)	NSCLC	P, G	39	n. s.	n. s.
(de Las Penas et al., 2006)	NSCLC	P, G	135	<i>AA+AC</i>	--
(Isla et al., 2004)	NSCLC	P, Dt	62	n. s.	--
(Ryu et al., 2004)	NSCLC	P	109	n. s.	n. s.
(Liu et al., 2007)	Magen-Ca	O, F	62	n. s.	--
(Park et al., 2001)	CRC	Platinbasiert	106	AA	AA
(Stoehlmacher et al., 2004)	CRC	O, F	106	AA	--
(Sakano et al., 2006)	Blasen-Ca	P, Bestrahlung	72	n. s.	n. s.

* signifikante Resultate (**p < 0,05**) **fett**; *Tendenz kursiv (p < 0,1)*; n. s. = nicht signifikant; -- = nicht untersucht
 NSCLC = nicht kleinzelliges Lungenkarzinom; CRC = kolorektales Karzinom
 P = Cisplatin; G = Gemcitabin; Dt = Docetaxel; O = Oxaliplatin; F = 5-Fluorouracil

2 Aufgabenstellung

Der therapeutische Nutzen für Patienten, die auf eine platinbasierte neoadjuvante Chemotherapie ansprechen, ist unstrittig. Um den nicht ansprechenden Patienten die Chemotherapie ersparen und insgesamt das Outcome optimieren zu können, ist eine möglichst frühzeitige wie präzise Vorhersage des Therapieansprechens mit Hilfe von prädiktiven Markern wichtig.

Daneben hat die individuelle Prognose einen Einfluss auf die Therapie des Patienten, insbesondere auf die Frage, wie aggressiv diese sein sollte. Daher ist die Etablierung von geeigneten Prognosemarkern ebenfalls erstrebenswert.

Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) ist entscheidend für die Reparatur platininduzierter DNA-Schäden. Konstitutionelle Polymorphismen der NER-Gene ERCC1 und ERCC2 könnten einen Einfluss auf die DNA-Reparaturkapazität haben und somit das Ansprechen und die Prognose nach einer platinhaltigen Chemotherapie beeinflussen.

In dieser Studie wird eine gut dokumentierte Gruppe von 181 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Magenkarzinom untersucht, welche neoadjuvant mit einer platinbasierten Chemotherapie behandelt und anschließend chirurgisch adäquat therapiert wurden.

Ziel dieser Studie ist es, folgende Fragen zu beantworten:

1. Besteht eine Assoziation zwischen den drei Polymorphismen ERCC1-118, ERCC1-8092 und ERCC2-751 und dem klinischen bzw. histopathologischen Ansprechen auf die platinbasierte Chemotherapie?
2. Besteht eine Assoziation zwischen diesen Polymorphismen und dem tumorabhängigen bzw. dem rezidivfreien Überleben?

3 Materialien und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Erhebung patientenbezogener Daten

Zur statistischen Auswertung wurden folgende patientenbezogene Daten erhoben: Angaben zur Person, klinische Daten, Pathologiebefunde, Daten zum weiteren Verlauf der Tumorerkrankung, sowie Todesdaten.

Klinische Daten wurden aus dem klinikinternen pathologisch-klinischem Informationssystem (PKIS von SAP, Walldorf) gewonnen: Es wurden u. a. Arztbriefe, Endoskopie-, (Endo-) Sonographie- und CT-Befunde eingesehen und ausgewertet. Die Pathologiebefunde stammen aus dem Pathologischen Anwendungssystem (PAS von Paschmann, Oberhausen). Angaben zum weiteren Krankheitsverlauf, wie Progression, Rezidiv und Todesdatum, wurden ebenfalls im PKIS ermittelt, vorausgesetzt, dass die Patienten das Nachsorgeangebot am Klinikum rechts der Isar wahrnahmen. Ansonsten wurde telefonisch Kontakt zu Patienten, Angehörigen, Hausärzten und anderen Krankenhäusern aufgenommen, um die notwendigen Daten zu ermitteln.

3.1.2 Patienten und Einschlusskriterien

In die Studie wurden Patienten mit lokal fortgeschrittenem Magenkarzinom eingeschlossen, die im Zeitraum vom 21.10.1991 bis zum 01.02.2005 (Datum des Chemotherapiebeginns) im Klinikum rechts der Isar neoadjuvant therapiert wurden.

Zusätzlich zum Gesamtkollektiv wurden die Patienten, die ab dem 01.01.1999 konsekutiv erfasst wurde, separat analysiert, um einen systematischen Fehler durch eine mögliche Überrepräsentation von Langzeitüberlebenden zu verhindern.

Die Studienprotokolle sowie die Untersuchung von Paraffinmaterial verstorbener Patienten sind durch die Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar genehmigt worden. Die übrigen Patienten haben ihr Einverständnis zur molekulargenetischen DNA-Analyse im Rahmen von wissenschaftlichen Studien gegeben.

134 von 181 Patienten sind bereits im Rahmen einer Studie von Ott et al. (Ott, 2004) molekulargenetisch untersucht worden und erfüllten die Einschlusskriterien. Die anderen 47 Patienten wurden ebenfalls am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München behandelt und nach unten stehenden Kriterien ausgewählt.

Einschlusskriterien waren ein histologisch gesichertes Adenokarzinom des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs II und III, Erhalt von mindestens 50% der vorgesehenen Dosis einer platinbasierten, neoadjuvanten Chemotherapie, Alter bei Diagnosestellung zwischen 18 und 80 Jahren, ECOG 0/1, klinisches Staging uT3/4 N0/+ cM0, Ausschluss einer Peritonealkarzinose durch Laparoskopie (eine positive Lavagezytologie ist kein Ausschlusskriterium), entsprechend der Risikoabschätzung ausreichende körperliche Fitness für platinhaltige Chemotherapie mit nachfolgender Resektion, Leukozyten >4000/ μ l, Thrombozyten >150000/ μ l, Kreatinin <1,5 mg/dl, Kreatininclearance >60 ml/min und Bilirubin <2mg/dl.

Ausschlusskriterien sind vorausgegangene Zweittumoren (bis auf semimaligne, kurativ behandelte Hauttumore und in situ Karzinome der Zervix uteri), histologisch gesicherte Peritonealkarzinose, Fernmetastasen, vorausgegangene Chemotherapie, Strahlentherapie, Lasertherapie, Stenteinlage, eine Magenausgangsstenose, die eine parenterale Ernährung erforderlich macht, unkontrollierbare Blutungen, Lebenserwartung weniger als 3 Monate sowie Schwangerschaft.

3.1.3 Prätherapeutisches Staging

Bei allen Patienten wurde routinemäßig eine klinische Untersuchung, eine Laborabnahme mit Differenzialblutbild, Gerinnung, Serumwerten, Elektrophorese, Tumormarkern (CEA, CA 19-9 und Ca 72-4), ein Röntgen Thorax und eine Sonographie des Abdomens durchgeführt. Zur histologischen Sicherung, Festlegung der Lokalisation und zur Klassifizierung der uT-Kategorie erfolgten eine Videoendoskopie und ein endoluminaler Ultraschall. Pathologen des Klinikums rechts der Isar bestimmten das Grading, die WHO-Klassifizierung des Tumors und den Wachstumstyp nach Lauren. Eine Computertomographie des Abdomens wurde mit oralem und intravenösen Kontrast und Vollfüllung des Magens zur besseren Beurteilung der Dicke der Magenwand durchgeführt. Bei Tumoren des proximalen Drittels erfolgte zusätzlich ein CT des Thorax. Die Eröffnung der Bursa omentalis und ein laparoskopischer Ultraschall der Leber soll gemäß Protokoll erfolgen. Bei suspekten Befunden ist eine Biopsie obligat. Routinemäßig wurde zu Beginn und vor Abschluss der Laparoskopie eine abdominelle Lavage nach einem prospektiv festgelegtem Studienprotokoll durchgeführt. Weder konventionell zytologisch noch immunhistochemisch positive Tumorzellen in der Lavage sind derzeit ein Ausschlusskriterium aus dem neoadjuvanten Konzept. Zur Applikation der Chemotherapie erhalten die Patienten ein systemisch venöses Portsystem in die Vena cephalica

implantiert. Die funktionelle Abklärung umfasst Labordiagnostik, Herzecho, ein kardiologisches Konsil sowie Lungenfunktions-diagnostik.

Nach Abschluss der Stagingdiagnostik wurden alle Befunde im interdisziplinären Tumorboard vorgestellt. Durch das Tumorboard werden die klinischen Stadien der Tumoren festgelegt. Bei einem uT3/4 cN0/+ cM0 Stadium wird der Patient bei Erfüllung der anderen Einschlusskriterien (3.1.1) in ein neoadjuvantes Konzept eingebracht.

3.1.4 Neoadjuvante Chemotherapie

Im Folgenden sind die einzelnen Chemotherapieschemata (jeweils 1 Zyklus) aufgeführt (siehe Tabelle 12 bis Tabelle 17). Die Dosisangaben der Wirkstoffe beziehen sich auf die Körperoberfläche der Patienten. Beim EAP-Schema sind 3-4 Zyklen im Abstand von 4 Wochen vorgesehen, bei den übrigen Schemata zwei Zyklen.

Tabelle 12: PLF-Schema (130 Patienten)

Cisplatin 50 mg/m ²	Tag 1	Woche 1,3,5
Leucovorin 500 mg/m ²	Tag 1 2 h inf.	Woche 1,2,3,4,5,6
5-FU 2000 mg/m ²	Tag 1 24 h inf.	Woche 1,2,3,4,5,6

Tabelle 13: PLF + Docetaxel (16 Patienten)

Docetaxel 50mg/m ²	Am Tag vor Cisplatin	Woche 1, 3, 5
-------------------------------	----------------------	---------------

Tabelle 14: PLF + Paclitaxel (14 Patienten)

Paclitaxel 85 mg/m ²	Am Tag vor Cisplatin	Woche 1,3,5
---------------------------------	----------------------	-------------

Tabelle 15: PLF + Epirubicin (10 Patienten)

Epirubicin 30 mg/m ²	Tag 1	Woche 2,4,6
---------------------------------	-------	-------------

Tabelle 16: OLF-Schema (7 Patienten)

Oxaliplatin 85 mg/m ²	Tag 1	Woche 1,3,5
Leucovorin 500 mg/m ²	Tag 1 2 h inf.	Woche 1,2,3,4,5,6
5-FU 2000 mg/m ²	Tag 1 24 h inf.	Woche 1,2,3,4,5,6

Tabelle 17: EAP-Schema (4 Patienten)

Etoposid 120 mg/m ²	Tag 4,5,6	Woche 1
Adriablastin 20 mg/m ²	Tag 1 und 7	Woche 1
Cisplatin 40 mg/m ²	Tag 2 und 7	Woche 1

Restaginguntersuchungen (siehe 3.1.5) werden jeweils nach Abschluss eines Zyklus durchgeführt. Die Operation ist in der 2. – 3. Woche nach Abschluss des letzten Zyklus nach erfolgtem Restaging geplant. Eine postoperative adjuvante oder additive Therapie wird nicht durchgeführt.

3.1.5 Responseevaluation

Vor der Operation werden alle Staginguntersuchungen bis auf die Laparoskopie, wie unter 3.1.3 beschrieben, erneut durchgeführt. Die klinische Responsebeurteilung erfolgt nach Vorstellung aller Befunde ohne Kenntnis der ebenfalls durchgeführten PET durch das interdisziplinäre Tumorboard. Es werden folgende Kriterien angewendet:

Tabelle 18: Klinische Response

Befunde	Bewertung
Abnahme der Wanddicke <u>und</u> der kraniokaudalen Ausdehnung im CT um mindestens 50% <u>und</u> komplette Rückbildung <u>oder</u> nur noch minimale Residuen in der Endoskopie	Responder
Oben genannten Befunde fehlen	Nonresponder

Die histopathologische Aufarbeitung zur Responseevaluation erfolgte standardisiert per Protokoll durch eine Pathologin (Dr. med. Karen Becker). Seit 1987 werden die Magenkarzinome mit Orientierung der Schnittebenen fotografisch dokumentiert und fotokopiert. Es wird der Residualtumor makroskopisch bezüglich der Größe erfasst. Dann folgt eine Einbettung des gesamten makroskopisch erkennbaren Tumorbettes in 0,5 cm dicke Stufen von oral nach aboral orientiert. Alle Schnittpräparate des Tumoralagers werden routinemäßig mit 3 Färbungen gefärbt (HE, EvG, PAS). Zweifelhafte epitheliale Zellen werden immunhistochemisch analysiert. Die histologische Typisierung, der Malignitätsgrad und die Klassifikation nach Lauren erfolgt entsprechend der Richtlinien der WHO. Die Tumorausdehnung und der Residualtumorstatus werden entsprechend den Richtlinien der UICC klassifiziert.

Zur Regressionsbeurteilung, und damit zur Beurteilung des Ansprechens auf die Chemotherapie, wird die Menge des Residualtumorgewebes im Verhältnis zum gesamten Tumoralager in Prozent beurteilt und vier Regressionsgrade unterschieden (siehe Tabelle 19) (Becker et al., 2003)

Tabelle 19: Pathologischer Regressionsgrad und pathologische Response (Becker et al., 2003)

Regressionsgrad	Residualtumor / Tumorbett	Pathologische Response
1a = komplett	0%	Responder
1b = subtotal	<10%	
2 = partiell	10-50%	Nonresponder
3 = gering	>50%	

3.1.6 Operation

Die Operation erfolgte zwei bis drei Wochen nach Abschluss der neoadjuvanten Chemotherapie.

Bei Tumoren des mittleren oder distalen Drittels wurde eine totale Gastrektomie durchgeführt, wobei der Resektionsrand oral im Bereich der anatomischen Kardia liegt. Es wurde eine erweiterte Lymphadenektomie (D2) durchgeführt. Diese schließt bei weit distal gelegenen Tumoren die Lymphknotenstationen 12 (Ligamentum hepatoduodenale), 13 (retroduodenale Lnn.) und 16 (rechts paraaortale Lnn.) ein. Als Rekonstruktion wurde eine einfache Ösophagojejunostomie oder eine Ösophagojejunoplicatio jeweils nach Roux-Y durchgeführt.

Bei Tumoren des proximalen Drittels wurde eine transhiatal erweiterte Gastrektomie vorgenommen. Nach Eröffnung des Hiatus wurde der distale Anteil des Ösophagus mitreseziert. Die Durchtrennung des Ösophagus erfolgt in der Regel auf Höhe der unteren Lungenvene, jedoch sind auch Resektionen bis auf Höhe der Vena azygos möglich. Die systematische Lymphadenektomie beinhaltet hier auch die Ausräumung der Lymphknotenstationen 10 und 11. Die dazu durchgeführte pankreaserhaltende Splenektomie wird in den letzten Jahren zunehmend verlassen. Initial vor allem in der Phase des EAP-Protokolls sowie des E-PLF-Protokolls ist manchmal zusätzlich eine Pankreaslinksresektion vorgenommen worden. Außerdem wird die Lymphknotenstation 16 (links paraaortale Lnn.) ebenfalls ausgeräumt, da die Lymphdrainage des retroperitoneal gelegenen Magenfundus sowie der Kardia in Richtung der linken Nebenniere und dem linken Nierenstiel erfolgt. Die Rekonstruktion erfolgte durch eine Ösophagojejunostomie nach Roux-Y.

In Einzelfällen sind Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs Typ II nach individueller Indikationsstellung mit weit in den Ösophagus reichenden Tumoren transmediastinal ösophagektomiert worden. Die Rekonstruktion erfolgte durch einen Magenhochzug nach Schlauchmagenbildung im hinteren Mediastinum.

In seltenen Fällen wurde aufgrund der proximalen Lokalisation sowie der großen Tumorausdehnung eine Ösophagogastrektomie mit Rekonstruktion durch ein Koloninterponat vorgenommen.

3.1.7 Tumornachsorge

Die Nachsorge der Patienten erfolgte ambulant über das Tumortherapiezentrum: Im ersten Jahr vierteljährlich, im 2. und 3. Jahr halbjährlich und im 4. und 5. Jahr jährlich. Bei Rezidivfreiheit endet die Nachsorge normaler Weise nach 60 Monaten (5 Jahre), kann darüber hinaus aber auch fortgeführt werden.

Es wurden jeweils eine klinische Untersuchung, Tumormarkerbestimmungen (CEA, CA 19-9, CA 72-4), ein Röntgen Thorax, eine Sonographie des Abdomens, eine ÖGD sowie ein CT des Abdomens und Beckens durchgeführt. Wenn sich aufgrund bildgebender Verfahren der Verdacht auf ein Rezidiv ergibt, wird eine Probeentnahme zur histologischen Sicherung angestrebt.

Zu allen Patienten liegen Nachsorgedaten vor. Die letzte Aktualisierung der Daten erfolgte im Oktober 2005.

3.2 Geräte

In Tabelle 20 sind die verwendeten Geräte mit Name, Firma und der Methode, bei der das Gerät angewendet wurde, aufgelistet.

Tabelle 20: Geräte

Bezeichnung: Name	Firma / Firmensitz (Land)	Methode
Zentrifuge: Varifuge 3.2RS	Heraeus Sepatech / Osterode	DNA-Isolierung
Photometer: DU® 530	Beckmann Instruments / Fullerton, CA, USA	Bestimmung des DNA-Gehalts
Digitale Bilddokumentation: Eagle Eye™ II	Stratagene / La Jolla, CA, USA	Gelelektrophorese
Elektrophoresekammer: Wide Mini Sub™ Cell	BIO-RAD Laboratories / Hercules, CA, USA	Gelelektrophorese
Spannungsgerät	BIO-RAD Laboratories / Hercules, CA, USA	Gelelektrophorese
PCR-Prozessor: GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt	PCR
PCR-Prozessor: Mastercycler gradient	Eppendorf / Hamburg	PCR
Zentrifuge: Centrifuge 5417 R	Eppendorf / Hamburg	DNA-Aufreinigung

Bezeichnung: Name	Firma / Firmensitz (Land)	Methode
DHPLC: WAVE® DNA Fragment Analysis System	Transgenomic / San Jose, CA, USA	DHPLC
Sequenziergerät: 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt	DNA-Sequenzierung

3.3 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 21: Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung: (Name)	Firma / Firmensitz (Land)	Methode
Blutröhrchen: Kalium-EDTA Monovette 9ml	Sarstedt / Nümbrecht	DNA-Isolierung
DNA-Isolierungskit: FlexiGene DNA Kit	Qiagen / Hilden	DNA-Isolierung
Reaktionsgefäße: Safe-Lock Tubes 1,5ml	Eppendorf / Hamburg	DNA-Isolierung
Zentrifugenröhrchen: NUNC 50 ml	Nunc / Wiesbaden-Biebrich	DNA-Isolierung
Isopropanol 100%	(technische Befüllanlage)	DNA-Isolierung
Ethanol 96, 70, 50 %	(technische Befüllanlage)	DNA-Isolierung
Proteinase K	Roche / Basel (Schweiz)	DNA-Isolierung
Eosinlösung, wässrig	(Hausapotheke)	DNA-Isolierung
PCR-Reaktionsgefäße: PCR Softtubes 0,5ml	Biozym ® / Oldendorf	PCR
Polymerase: AmpliTaq Gold®	Applied Biosystems / Weiterstadt	PCR
Polymerase: Taq DNA Polymerase	Amersham Biosciences / Little Chalfont, Buckinghamshire (England)	PCR
Primer	in der GSF synthetisiert	PCR
Nukleotide: dNTPs 200 µmolar	Applied Biosystems / Weiterstadt	PCR
Agarosegel: SeaKem® LE Agarose	Cambrex Bio Science / Rockland (USA)	Gelelektrophorese
Ethidiumbromid	Eurobio / Les Ullis (Frankreich)	Gelelektrophorese
Molekulargewichtsmarker: Phi 174X/HAE III	Boehringer / Mannheim	Gelelektrophorese
Restriktionsendonuklease + Puffer: MboII (5 u/µl) + 10x Buffer B	Fermentas / Burlington (Kanada)	RFLP-Analyse
Restriktionsendonuklease + Puffer: BseMI (= BsrDI) (5 u/µl) + 10x Buffer R	Fermentas / Burlington (Kanada)	RFLP-Analyse
Wasserfiltrationsanlage für HPLC-	Millipore, Eschborn	DHPLC

Bezeichnung: (Name)	Firma / Firmensitz (Land)	Methode
Qualität		
Acetonitril	Sigma, Deisenhofen	
Mikroplatte (96-Loch)	Biozym / Oldendorf	DHPLC
PCR-Reinigungskit: QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen / Hilden	DNA-Sequenzierung
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit VERSION 1.1	Applied Biosystems / Weiterstadt	DNA-Sequenzierung
PCR-Reinigungskit: Centri Sep	Princeton Separations / Foster City, CA (USA)	DNA-Sequenzierung
Zentrifugen-Filtergefäße: Centri Sep Spin Columns	Applied Biosystems / Weiterstadt	DNA-Sequenzierung
Elektrophoresegel: Long ranger Hydrolink Gel	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf	DNA-Sequenzierung

3.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 22: Proteinase K-Puffer

50 mM Tris/HCl pH 8,5
1 mM EDTA pH 8,0
0,5% Tween 20
pH 8,0
Zur längeren Haltbarkeit wurde der Puffer steril filtriert.

Tabelle 23: TE-Puffer

10 mM Tris
1 mM EDTA
pH 8,0

Tabelle 24: Herstellung des PCR-Puffer (10fach konzentrierte Stammlösung)

20 ml Tris-HCl, 1 M, pH 8,3
100 ml KCl, 1 M
200 mg Gelatine
80 ml H ₂ O (Millipore)
ad 50 ml:
für 10 mM-Puffer: 500 µl MgCl ₂ , 1 M
für 15 mM-Puffer: 750 µl MgCl ₂ , 1 M

Gelladepuffer: Blue Dextran/ EDTA, Applied Biosystems, Weiterstadt

Tabelle 25: TBE-Puffer (10x konzentriert)

1,0 M Tris
0,9 M Borsäure pH 8,0
0,01 M EDTA

Tabelle 26: DHPLC-Puffer

Puffer A:		Puffer B:	
50 ml	TEAA (2M)	50 ml	TEAA (2M)
250 µl	Acetonitril	250 ml	Acetonitril
Ad 1000 ml	HPLC-Wasser	Ad 1000 ml	HPLC-Wasser

Puffer C:		Puffer D:	
750 ml	Acetonitril	80 ml	Acetonitril
250 ml	HPLC-Wasser	Ad 1000 ml	HPLC-Wasser

3.5 DNA-Extraktion

Wie in Kapitel 3.1 erwähnt, wurde bereits bei 134 der 181 Patienten eine DNA-Extraktion zur molekulargenetischen Untersuchung vorgenommen. Sie wurde teils aus Vollblut und teils aus in Paraffin fixiertem, gesundem Gewebe extrahiert (Ott, 2004). Die gleichen Methoden kamen auch bei den 47 Patienten, von denen noch keine DNA-Lösungen vorlagen, zum Einsatz.

3.5.1 Isolierung aus Blut

Die Isolierung der DNA aus bei -20 °C gelagertem EDTA-Blut erfolgte mit Hilfe des FlexiGene DNA Kits, einem DNA-Isolierungskit von Qiagen, nach den Angaben des Herstellers. Der DNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt (siehe 3.5.3).

3.5.2 Isolierung aus Paraffinschnitten

Bei einem Patienten gelang die DNA-Isolierung aus Blut nicht. Daher erfolgte die DNA-Extraktion aus dem Gewebe einer formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Ösophagusprobeentnahme, welche laut pathologischem Befund nur gesundes Gewebe enthielt.

Zunächst wurden fünf 8 µm dicke Schnitte vom entsprechenden Paraffinblock angefertigt. Diese wurden entparaffiniert (siehe Tabelle 27) und mit Hämalaun gefärbt (siehe Tabelle

28). Das auf diese Weise markierte Gewebe konnte mittels Skalpell vom Objektträger abgetragen und in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl Proteinase K-Puffer (siehe 3.4) überführt werden. Dann wurden 2 µl einer 20mg/ml konzentrierten Proteinase K-Lösung (= 40 µg Proteinase K) hinzugefügt, was einer Endkonzentration von ca. 200 µg/ml entspricht. Mit diesem Enzym, das zum Abbau von Zellproteinen und der Kernmembran und somit zur Freilegung der DNA führt, erfolgte über Nacht eine Inkubation bei 55 °C in einem Schnippschüttler. Anschließend wurde die Lösung zur Inaktivierung der Proteinase K 10 min gekocht.

Tabelle 27: Entparaffinierung in absteigender Alkohohlreihe

Xylol	10 min
Isopropanol 100 %	5 min
Ethanol 96 %	5 min
Ethanol 70 %	5 min
Ethanol 50 %	5 min
Aqua dest.	5 min

Tabelle 28: Hämalaunfärbung

Hämalaun, saures nach Mayer	20 – 30 s
Fließendes Leitungswasser	10 min
Aqua dest.	Abspülen
TE-Puffer (siehe 3.4)	Abspülen
Trocknen lassen	

3.5.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Menge und Verdünnung zur Gebrauchslösung

Nach erfolgter DNA-Extraktion wurden die sog. Stocklösungen im Verhältnis 1:20 – 1:50 verdünnt, und der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt. Dabei wird die UV-Absorption bei 260 nm gemessen, da bei dieser Wellenlänge das maximale Absorptionsvermögen von DNA liegt.

In Abhängigkeit vom DNA-Gehalt der Stocklösung erfolgte eine Verdünnung mit TE-Puffer auf eine DNA-Konzentration von 20 ng/µl. Die aus Paraffin gewonnenen DNA-Stocklösungen wurden standardmäßig 1:10 verdünnt. Die so erhaltenen Gebrauchslösungen konnten nun in der PCR (siehe 3.6) eingesetzt werden.

3.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) ermöglicht eine selektive, exponentielle Vervielfältigung einzelner DNA-Abschnitte und somit die molekulargenetische Analyse dieser Sequenzen.

Jeder Zyklus der PCR läuft in drei Schritten ab: Im ersten Schritt, der Denaturierung oder *Melting*, werden die DNA-Doppelstränge bei 95°C voneinander gelöst, so dass sie als Einzelstränge vorliegen. An diese binden im zweiten Schritt, dem *Annealing*, bei ca. 50-60°C die beiden für das PCR-Produkt spezifischen Primer. Dies sind aus 15-20 Basen bestehende Oligonukleotide. Die Primer wiederum dienen als Ausgangspunkte für die Synthese (oder Extension) in 5'→3' Richtung durch eine thermostabile DNA-Polymerase bei ca. 72°C, so dass am Ende eines Zyklus die gewünschte DNA-Sequenz verdoppelt worden ist. Dieser Zyklus wird ca. 30-40 Mal wiederholt und somit die DNA exponentiell vervielfältigt. Die Polymerase-Kettenreaktion wird in automatisierten Thermostaten, so genannten Thermocyclern, durchgeführt. Die Auswahl der Primer erfolgte aufgrund von Literaturangaben (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Verwendete Primer

ERCC1-118 (Stoehlmacher et al., 2004)	
Primer, vorwärts	5'-GCA GAG GTC ACC TGA GGA AC-3'
Primer, rückwärts	5'-GAG GTG CAA GAA GAG GTG GA-3'
Amplifikatlänge	208 bp
ERCC1-8092 (Zhou et al., 2004)	
Primer, vorwärts	5'-GGG CAC CTT CAG CTT TCT TT-3'
Primer, rückwärts	5'-CAG AGA CAG TGC CCC AAG AG-3'
Amplifikatlänge	161 bp
ERCC2-751 (Duell et al., 2000)	
Primer, vorwärts	5'-CCC CCT CTC CCT TTC CTC TG-3'
Primer, rückwärts	5'-AAC CAG GGC CAG GCA AGA C-3'
Amplifikatlänge	184 bp

Anschließend wurden die Versuchsbedingungen optimiert. Diese sind dann gegeben, wenn man in der Gelelektrophorese (siehe 3.7) nur eine klar abgrenzbare Bande der erwarteten Basenpaarlänge sieht.

Initial wurden die primerspezifischen Annealingtemperaturen mit Hilfe des Mastercycler gradient eppendorf etabliert. Dies ist ein PCR-Gradientencycler, der die gleichzeitige Amplifizierung mehrerer Proben bei verschiedenen Annealingtemperaturen erlaubt.

Es wurde ein 15 mM MgCl₂-PCR-Puffer (siehe Tabelle 24) verwendet und dieser bei unbefriedigenden Ergebnissen durch einen 10 mM MgCl₂-PCR-Puffer ersetzt, so dass Endkonzentrationen von 1,5 mM bzw. 1 mM MgCl₂ im PCR-Ansatz vorlagen. Die Mg²⁺-Konzentration beeinflusst das Anlagern des Primers an die zu amplifizierende DNA-Sequenz und hat somit Einfluss auf die Spezifität der Amplifikation.

Standardmäßig wurde die Taq DNA Polymerase eingesetzt. Wenn jedoch kein befriedigendes Ergebnis mittels Puffereinstellung und Wahl der Annealingtemperatur erzielt wurde, wurde die AmpliTaq Gold® Polymerase verwendet und Annealingtemperatur und Puffer erneut eingestellt.

Die PCR für die Genotypisierung wurde dann im Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Zu Beginn wurde der PCR-Ansatz bei Verwendung der Taq Polymerase einmalig für 4 min auf 94 °C, bei Verwendung der AmpliTaq Gold® Polymerase 10 min zur Aktivierung des Enzyms auf 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgten 40 Durchgänge des folgenden Zyklus: 30 s bei 94 °C, 30 s bei der jeweiligen Annealingtemperatur und 30 s bei 72 °C. Dem letzten Zyklus folgten noch 7 min bei 72 °C. Abschließend wurde der Ansatz auf 4 °C abgekühlt. Zur Überprüfung der Reinheit des Ansatzes wurde jeweils eine Negativkontrolle ohne zugefügte DNA mitgeführt.

In Tabelle 31 ist ein PCR-Ansatz beschrieben. Die PCR-Bedingungen bei den verschiedenen Polymorphismen sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 30: PCR-Pipettierschema

H ₂ O	15,25 µl
PCR-Puffer*	2,5 µl (10 o. 15 mM MgCl ₂)
dNTPs	4,0 µl (200 µmolar)
Primer 1	0,5 µl (20 pmol/µl)
Primer 2	0,5 µl (20 pmol/µl)
Template	2,0 µl (20 ng/µl)
Taq-Polymerase	0,25 µl (5 U/µl)
Gesamt	25 µl
* Zusammensetzung siehe Kapitel 3.4	

Tabelle 31: PCR-Ansatz

10 mM Tris-HCl pH 8,3
50 mM KCl
1 – 1,5 mM MgCl ₂
0,01% Gelatine
200 µM dNTPs*
0,4 µM Primer**
pro 25 µl Ansatz:
1,25 U Taq-Polymerase
20 – 40 ng DNA-Probe
* je 50 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
** je 0,2 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer

Tabelle 32: PCR-Bedingungen

	ERCC1-118	ERCC1-8092	ERCC2-751
MgCl ₂ -Konzentration	1,0 mM	1,5 mM	1,0 mM
Polymerase	Taq DNA Polymerase	AmpliTaq Gold®	Taq DNA Polymerase
Annealing-Temperatur	55 °C	62 °C	59 °C

3.7 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde einerseits verwendet, um die Reinheit und Größe der PCR-Produkte (Amplifikate) zu überprüfen, und andererseits, um die RFLP-Analyse (siehe 3.8) durchzuführen.

Es wurden je nach Konzentration 4 µl oder 14 µl des Amplifikats mit je 1 µl eines 10-fach konzentrierten Gelladepuffers (Blue Dextran/ EDTA) in die Taschen eines 2%igen Agarosegels (siehe Tabelle 33) pipettiert. Das so beladene Gel wurde in eine mit Laufpuffer (1fach konzentrierter TBE-Puffer plus 1 Tropfen Ethidiumbromid pro 100 ml) gefüllte Elektrophoresekammer eingebracht und eine Gleichspannung angelegt. Nun wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle in Richtung der Anode. Nach einer Laufzeit von ca. 20-30 min wurde anschließend unter UV-Licht das fluoreszierende Ethidiumbromid sichtbar gemacht, welches nun die DNA durch Interkalierung markiert hatte.

Eine einzelne, klar abgrenzbare Bande und keine Bande in der Negativkontrolle sprechen für die Reinheit des Amplifikats. Die Länge des Amplifikats bzw. der

Restriktionsfragmente wurde durch Vergleich der Laufhöhe der Bande und dem jeweils mitgeführten Molekülgrößenmarker abgeschätzt.

Tabelle 33: 2%iges Agarosegel

Agar 2mg
1x TBE-Puffer 100 ml
Ethidiumbromid 1 Tropfen

3.8 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse

Mit der PCR-basierten Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) wurde die Genotypisierung der Polymorphismen ERCC1-118 und ERCC2-751 vorgenommen.

Restriktionsenzyme (= Restriktionsendonukleasen) sind bakterielle Enzyme, welche eine DNA-Sequenz von 4-8 Basenpaaren erkennen und diese an spezifischer Stelle schneiden können. Ist die Zielsequenz verändert, wie z. B. im Falle eines Polymorphismus (siehe 1.2.1.1), kann dies dazu führen, dass das Restriktionsenzym diese nicht erkennt und somit auch nicht schneidet.

Analysiert man anschließend die DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese (3.7), so kann man drei verschiedene Bandenmuster unterscheiden.

1. Bei einer homozygoten Variante kommt es nicht zum enzymatischen Verdau. Man sieht nur eine Bande mit gleicher Molekülgröße, wie das eingesetzte PCR-Amplifikat.
2. Bei der anderen homozygoten Variante werden beide DNA-Einzelstränge geschnitten. Es entstehen kürzere DNA-Fragmente.
3. Heterozygote DNA wird dagegen je zur Hälfte verdaut und zur anderen Hälfte nicht. Es sind also 3 Banden in der Gelelektrophorese zu sehen.

Der Verdau erfolgt über eine ausreichend lange Zeit im Wasserbad bei restriktionsenzymspezifischer Temperatur und Pufferung.

Die Etablierung der RFLP-Analysen wurde unter publizierten Versuchsbedingungen und mit Restriktionsenzymen durchgeführt, die für die Genotypisierung der Polymorphismen geeignet sind (siehe Tabelle 34). Die Versuchsbedingungen wurden dann experimentell überprüft und eine geeignete Menge der einzusetzenden DNA ermittelt. Im Fall des Polymorphismus ERCC1-8092 konnten keine befriedigenden Resultate mittels RFLP-Analyse erzielt werden, so dass die DHPLC als Nachweismethode verwendet wurde (siehe 3.9).

Tabelle 34: Restriktionsenzyme zur RFLP-Analyse von ERCC1-118 und ERCC2-751

Polymorphismus	Restriktionsenzym	Schnittstelle	Länge der DNA-Fragment(e)
ERCC1-118	BsrDI (Stoehlmacher et al., 2004)	T-Allel: ja	128, 80
		C-Allel: nein	208
ERCC2-751	MboII (Duell et al., 2000)	A-Allel: ja	112, 72
		C-Allel: nein	184

In Tabelle 35 sind die Versuchsbedingungen der RFLP-Analyse und der Gelelektrophorese zur Genotypisierung von ERCC1-118 und ERCC2-751 aufgelistet. Die Volumenangaben beziehen sich jeweils auf eine Probe.

Tabelle 35: RFLP-Versuchsbedingungen von ERCC1-118 und ERCC2-751

1. Verdau	ERCC1-118	ERCC2-751
Aqua dest.	12,8 µl	3,1 µl
R-Puffer	2,0 µl	1,5 µl
Restriktionsendonuklease	0,2 µl (BsrDI)	0,4 µl (MboII)
DNA (PCR-Amplifikat)	5,0 µl	10,0 µl
Inkubationszeit	1 h	1 h
Temperatur (Wasserbad)	55 °C	37 °C
2. Gelelektrophorese		
Verwendetes Gel	Agarose 2%	Agarose 2%
Geladenes Volumen	10 µl	15 µl
Spannung	120 V	130 V
Laufzeit	25 min	25 min

3.9 Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Die denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (DHPLC) ermöglicht die Detektion von Mutationen, auch wenn Art und Ort nicht bekannt sind. Hier wurde diese Methode jedoch für den Nachweis eines bereits bekannten Polymorphismus (ERCC1-8092) eingesetzt.

Folgendes Prinzip liegt der DHPLC zugrunde: Individuen mit einer heterozygoten Variante eines Polymorphismus besitzen Wildtyp-DNA und die DNA-Variante im Verhältnis 1:1. Erhitzen des PCR-Amplifikats auf 94°C (Denaturierung) im Thermocycler und anschließend langsames Abkühlen (1°C pro min) bis auf Raumtemperatur führen zur

Hybridisierung der DNA-Einzelstränge untereinander und somit zu einer Mischung aus Homo- und Heteroduplizies (siehe Abbildung 5). Unter Heteroduplizies versteht man einen DNA-Doppelstrang mit einer Basenfehlpaarung, während Homoduplizies aus zwei komplementären Einzelsträngen bestehen und somit keine Fehlpaarung aufweisen.

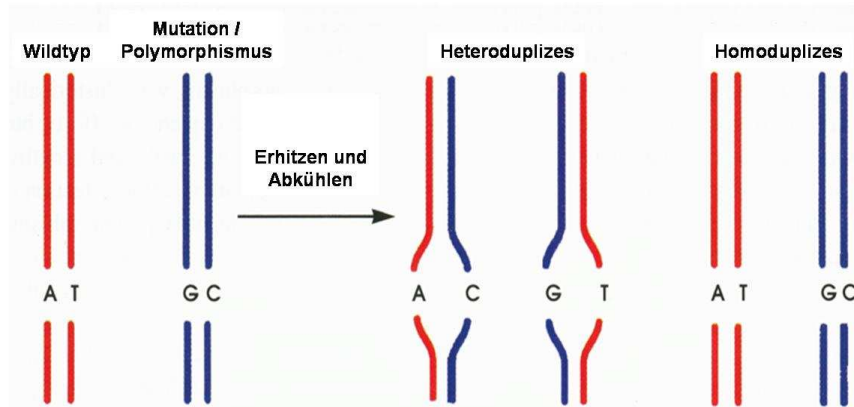


Abbildung 5: Bildung von Homo- und Heteroduplizies bei der DHPLC

Zunächst wird die DNA an eine Chromatographiesäule gebunden. Die Säulenmatrix kann die doppelsträngige DNA nur über das Brückenmolekül Triethylammoniumacetat (TEAA) binden, welches im Puffer enthalten ist. Dabei interagiert TEAA mit seinem positiv geladenen Ammoniumion mit den negativ geladenen Phosphationen der DNA-Moleküle und bindet mit seinem hydrophoben Anteil gleichzeitig an die Matrix (siehe Abbildung 6, links).

Das DHPLC-System ist nun in der Lage die Homo- und Heteroduplizies wie folgt voneinander zu unterscheiden: Durch eine graduelle Erhöhung der Acetonitrilkonzentration im Puffer und durch die damit einhergehende Verdrängung des TEAA werden nach und nach die DNA-Duplizies von der Chromatographiesäule eluiert. Dabei lösen sich unter bestimmten partiell denaturierenden Bedingungen (s. u.) die Homoduplizies später als die instabileren Heteroduplexmoleküle, bei denen die Auftrennung in Einzelstränge früher einsetzt.

Die optimale Temperatur des Systems wird durch eine Analyse des Schmelzverhaltens der jeweiligen DNA-Homoduplizies bestimmt und ist gegeben, wenn noch ca. 75 – 90% der Moleküle als Doppelstrang vorliegen. Sie liegt in der Regel zwischen 50 und 65°C und ist im Wesentlichen von der DNA-Sequenz (GC-Gehalt) des Fragments abhängig.

Die im Puffer gelösten DNA-Fragmente laufen durch ein integriertes Photometer, wo kontinuierlich (nach dem in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Prinzip) die DNA-Konzentration gemessen wird. Diese Daten werden auf einen Computer übertragen und können als ein

Diagramm der DNA-Konzentration über die Zeit dargestellt werden (siehe Abbildung 6, rechts).

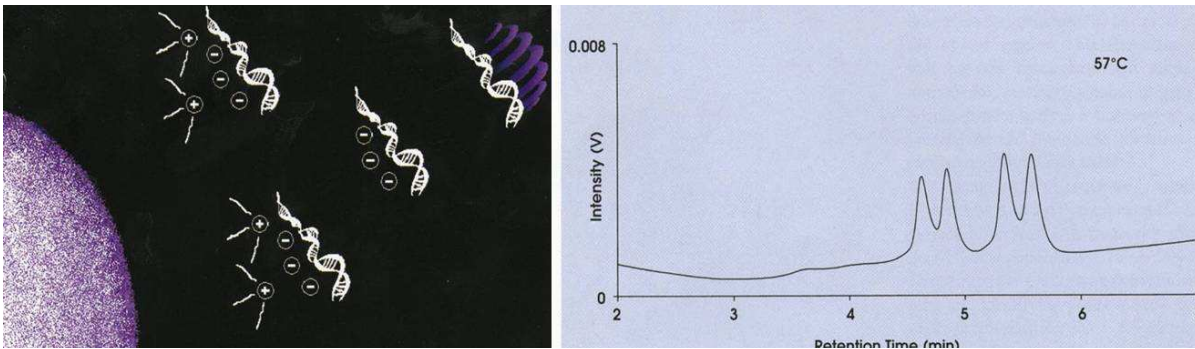


Abbildung 6: DHPLC: links: Binden der DNA-Duplizierten an die Säule; rechts: Lösen der vier Fraktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Theoretisch erhält man bei der Analyse heterozygoter DNA vier verschiedene Intensitätsmaxima: zwei für die Homoduplizierten und zwei für die Heteroduplizierten (wie in Abbildung 6). Oftmals jedoch (wie auch bei ERCC1-8092) verschmelzen diese *Peaks* der Homoduplizierten bzw. Heteroduplizierten zu jeweils einem. So sieht man zwei *Peaks* bei der heterozygoten und jeweils einen bei den homozygoten Varianten (siehe Abbildung 21).

Um die zwei homozygoten Varianten (mit jeweils einem *Peak*) zu unterscheiden, mischt man die DNA mit homozygoter Wildtyp-DNA und wiederholt die gesamte DHPLC-Analyse. Zeigt sich dann wiederum nur ein *Peak*, so handelt es sich um den homozygoten Wildtyp. Sieht man hingegen zwei *Peaks*, so ist es die andere homozygote Variante, da es sich jetzt quasi um einen „heterozygoten“ Mix handelt.

Nachdem das PCR-Amplifikat wie oben beschrieben erhitzt und abgekühlt wurde, wurde die DHPLC mit dem automatisierten WAVE® System von Transgenomic durchgeführt. Die zum WAVE®-System gehörende Software WAVEMAKER kann anhand der DNA-Sequenz des PCR-Amplifikats die theoretische Schmelzkurve und somit die optimalen Analysebedingungen, also Analysentemperatur, Pufferkonzentrationen und Gradienten (d. h. Änderung der Acetonitrilkonzentration pro Zeit) und dazugehörige Laufzeiten, berechnen (siehe Abbildung 7).

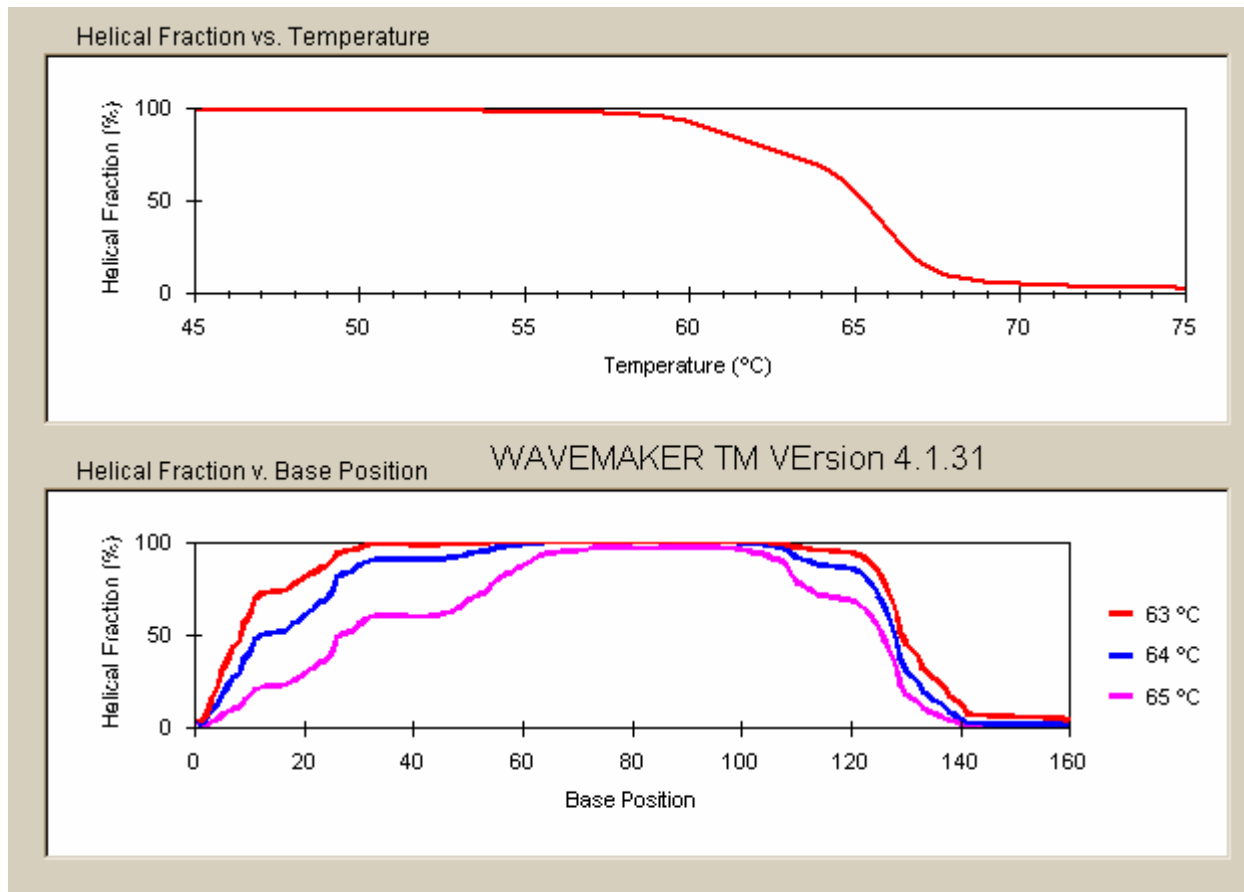


Abbildung 7: Schmelzkurvenberechnung durch Software WAVEMAKER und Auftrennung der DNA-Doppelhelix von beiden Fragmentenden bei verschiedenen Temperaturen (161 bp, ERCC1-8092)

Tabelle 36: Verkürzte endgültige DHPLC-Methode (ERCC1-8092)

eingesetztes PCR-Amplifikat = 10,0 µl; Schmelztemperatur = 64,5 °C			
Zeit	Puffer A	Puffer B	Puffer C
0,0 min	60%	40%	0%
0,1 min	55%	45%	0%
4,1 min	45%	55%	0%
4,2 min	0%	0%	100%
4,7 min	0%	0%	100%
4,8 min	60%	40%	0%
6,8 min	60%	40%	0%

Die durch das Programm vorgeschlagenen Versuchsbedingungen wurden anschließend optimiert. Hierzu wurden DHPLC-Analysen bei verschiedenen Temperaturen im entsprechenden Temperaturbereich durchgeführt und auch die Pufferkonzentrationen, Gradienten und Laufzeiten sowie die eingesetzte Amplifikatmenge wurden variiert. Durch

Vergleich der Kurven (Intensität über die Zeit) wurden dann die optimalen Versuchsbedingungen etabliert. Die letztendlich verwendeten Versuchsbedingungen der DHPLC des Polymorphismus ERCC1-8092 sind in Tabelle 36 aufgelistet. Man sieht, dass über 4 min der Anteil des Puffers B (mit hoher Acetonitrilkonzentration) von 45% auf 55% erhöht wurde.

3.10 DNA-Sequenzierung

Bei ca. 10 % der Patienten wurden die Ergebnisse der Genotypisierung durch direkte Sequenzierung kontrolliert.

Dazu wurde die Didesoxymethode nach Sanger angewendet (Sanger and Coulson, 1975). Dies ist ein enzymatisches Verfahren, welches automatisiert eingesetzt werden kann und als Kettenabbruchmethode funktioniert.

Der zu sequenzierende DNA-Abschnitt wird entweder mit dem Vorwärts- oder Rückwärtsprimer, amplifiziert. Beim Einbau eines fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotids (ddNTP), die dem Cycle-PCR-Ansatz hinzugefügt werden, kommt es zum Kettenabbruch. Da jedoch auch alle vier Basen als dNTPs vorliegen, kommt es nicht zwangsläufig zu einem Kettenabbruch. So entstehen Amplifikate in allen Längen, deren Ende jeweils fluoreszenzmarkiert ist.

Während des anschließenden elektrophoretischen Laufs über das Sequenzgel wird die DNA der Länge nach aufgetrennt und ein automatisches Lesegerät kann die fluoreszenzmarkierten DNA-Abbruchenden messen und so die Abfolge der Sequenz interpretieren.

Die DNA-Sequenzierung wurde mit dem Big-Dye®-Terminator-Kit Version 1.1 durchgeführt. Zur Vorbereitung auf die Sequenzierung wurden die PCR-Amplifikate zunächst mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt und danach die Reinheit elektrophoretisch überprüft. Anschließend wurde die eigentliche Sequenzierungs-PCR (Tabelle 37) mit den für den Kettenabbruch verantwortlichen Terminatoren angesetzt, eine geeignete Annealing-Temperatur berechnet (Tabelle 38) und nach unten stehendem Schema (Tabelle 39) amplifiziert. Die Amplifikate wurden nochmals mit den Centri-Sep Spin Columns (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers gereinigt. Dies dient dazu, nicht eingebaute markierte ddNTPs durch Gelfiltration zu entfernen. Anschließend wurde im 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sequenziert.

Tabelle 37: Sequenzierungs-PCR (20 µl-Ansatz)

DNA	1 – 3 µl (je nach Stärke der Bande in der PCR)
Big Dye Sequencing Buffer (10 fach)	2 µl
Primer	0,5 µl (10 pmol/ µl)
Premix*	3 µl
H ₂ O	Ad 20 µl
* enthält Polymerase, fluoreszenzmarkierte ddNTPs und dNTPs	

Tabelle 38: Faustregel zur Berechnung der Annealing-Temperatur für die Cycle-PCR

Für ein A oder T (des Primers)	je 2°C
Für ein C oder G (des Primers)	je 4°C
Gesamttemperatur =	Summe – 5°C
Maximale Temperatur =	60°C

Tabelle 39: Cycle-PCR-Ablauf

Initial	96°C	1 min
25 Zyklen	96°C	10 s
	Annealing-Temperatur (siehe Tabelle 38)	5 s
	60°C	4 min
Endtemperatur	4°C	

3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistik-Programm SPSS® Version 13.0.1 (The Apache Software Foundation) durch das Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie durchgeführt.

Die statistische Analyse erfolgte zunächst univariat und anschließend multivariat. Dies ist deswegen notwendig, weil nur auf diese Weise die Signifikanz und Unabhängigkeit eines prognostischen Faktors bewiesen werden kann (Siewert et al., 2001a).

3.11.1 Endpunkte der Studie

Die Endpunkte der Studie sind in Tabelle 40 aufgelistet. Als tumorabhängig verstorben gilt ein Patient, wenn er entweder direkt an der Tumorerkrankung (z. B. Metastasen, Tumorprogression) oder indirekt durch die Therapie (z. B. Anastomoseninsuffizienz nach

OP) verstirbt. In Tabelle 41 sind die Ereignisse und mögliche Zensierungsgründe aufgezählt.

Tabelle 40: Endpunkte und intermediäre Endpunkte der Studie

(intermediärer) Endpunkt	Messniveau	Definition
Klinisches Ansprechen	Kategorial	(Abnahme der Wanddicke des Tumors <u>und</u> der kraniokaudalen Ausdehnung im CT um mindestens 50%) <u>und</u> (komplette Rückbildung <u>oder</u> nur noch minimale Residuen in der Endoskopie)
Histopathologisches Ansprechen	Kategorial	Höchstens 10% vitale Tumorzellen im Tumorbett (siehe Tabelle 19)
Tumorabhängiges Überleben	Metrisch	Zeitraum vom 1.Tag der Chemotherapie bis zum tumorabhängigen Versterben. Dieser Parameter wird für alle Patienten berechnet.
Rezidivfreies Überleben	Metrisch	Zeitraum vom Tag der OP bis zum Tag der Rezidivdiagnose. Dieser Parameter wird nur für R0-Patienten berechnet.

Tabelle 41: Ereignisse und Zensierungen für das tumorabhängige und rezidivfreie Überleben

	Bedeutung für rezidivfreies Überleben	Bedeutung für tumorabhängiges Überleben
Patient lebt und hatte kein Rezidiv im Oktober 2005	Zensierung	Zensierung
Diagnose eines Rezidivs	Ereignis	Keine
Tumorabhängiges Versterben	(Zensierung*)	Ereignis
Tumorunabhängiges Versterben	(Zensierung**)	Zensierung
Kein Rezidiv nach 5 Jahren Nachsorge	Zensierung am Tag des letzten Patientenkontakts	Zensierung am Tag des letzten Patientenkontakts
* falls Patient noch rezidivfrei war, z. B. wenn therapieabhängig verstorben aufgrund einer Anastomoseninsuffizienz		
** falls Patient noch rezidivfrei war		

3.11.2 Klinische und histopathologische Parameter

In der folgenden Tabelle sind die klinischen und histopathologischen Parameter beschrieben, die zur statistischen Auswertung herangezogen wurden.

Bei den histopathologisch festgestellten Fernmetastasen (ypM-Kategorie) ist hinzuzufügen, dass es sich hierbei entweder um eine Peritonealkarzinose, um Lymphknotenmetastasen oder Metastasen im Ösophagus handelt. Da diese chirurgisch komplett entfernt werden können, kann ein Patient mit einem ypM1-Status trotzdem einen R0-Status haben.

Tabelle 42: Definitionen und Erläuterungen klinischer und pathologischer Parameter

Parameter	Messniveau	Definition / Beschreibung
Prätherapeutisch		
Alter	metrisch	Alter des Patienten am ersten Tag der neoadjuvanten Chemotherapie*
Geschlecht	kategorial	2 Gruppen: 1. männlich, 2. weiblich
Tumorlokalisation	kategorial	4 Gruppen: 1. proximal = AEG II, AEG III und Fundus, 2. mittel = Corpus, 3. distal = Antrum, 4. Linitis
Laurenklassifikation	kategorial	Beurteilung des OP-Präparates durch Pathologen; 3 Gruppen: 1. intestinal, 2. diffus, 3. Mischtyp
Grading	kategorial	Histologisches Grading bei Erstdiagnose durch Probeentnahme; wenn nicht vorhanden, dann Grading des OP-Präparates; 2 Gruppen: 1. G1 und G2, 2. G3
Art der Chemotherapie	kategorial	6 verschiedene Chemotherapie-Schemata (siehe Kapitel 3.1.4)
ypT-Kategorie	kategorial	Beurteilung des OP-Präparates durch den Pathologen; y: nach der Chemotherapie; 5 Gruppen: ypT0, ypT1, ypT2, ypT3, ypT4
ypN-Kategorie	kategorial	Beurteilung des OP-Präparates durch Pathologen; 4 Gruppen: ypN0, ypN1, ypN2, ypN3
ypM-Kategorie	kategorial	M-Status zum Zeitpunkt der OP; 2 Gruppen: ypM0, ypM1
Residualtumorstatus	kategorial	2 Gruppen: 1. R0, 2. R1 / R2 (siehe Tabelle 7)
* in der Regel einige Tage später als die Diagnosestellung		

3.11.3 Statistische Tests

Folgende statistische Testverfahren wurden verwendet. Signifikanz wurde stets bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ angenommen.

Der 2-seitige X^2 -Test (sprich Chi-Quadrat-Test) nach Pearson wurde eingesetzt, um die Abhängigkeit zweier kategorialer (nominal oder ordinal) Parameter zu prüfen (z. B. Genotypen und Tumorlokalisation).

Bei der Prüfung der Häufigkeitsverteilung der Genotypen kam ein spezieller X^2 -Test zur Anwendung. Bei einem $p > 0,05$ geht man von einem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht aus.

Der Fischer-Exakt-Test wurde anstelle des X^2 -Tests eingesetzt, wenn über 20% der Erwartungswerte ≤ 5 war (z. B. bei vielen kleinen Patientengruppen, die unterschiedlich chemotherapiert wurden).

Statistische Vergleiche bezüglich des Überlebens zwischen Patientengruppen wurden mit dem Log-Rank-Test durchgeführt (z. B. Unterschiede des rezidivfreien Überlebens zwischen den Gruppen unterschiedlicher Genotypen).

Der T-Test diente zum Vergleich von Mittelwerten eines metrischen Parameters in zwei Kategorien (z. B. Mittelwerte des Alters bei Respondern vs. Non-Respondern).

Mit dem ANOVA-Test (Analysis of Variance) wurden Mittelwerte eines metrischen Merkmals in mehr als zwei Kategorien verglichen (z. B. Mittelwerte des Alters bei Patienten mit drei verschiedenen Genotypen).

3.11.4 Multivariate Analyse

Die multivariate Analyse wurde mit Hilfe des Cox-Modells durchgeführt. Mit diesem Modell kann die Korrelation zwischen dem Überleben und mehreren anderen kategorialen oder stetigen Parametern gleichzeitig berechnet werden. So werden nur Parameter berücksichtigt, die unabhängig auf das Überleben Einfluss nehmen. Parameter, die dagegen stark untereinander korreliert sind, werden, wenn sie das Überleben in geringerem Maße beeinflussen als die stärker signifikante Variable, nicht berücksichtigt.

Es wurde die Methode „schrittweise-vorwärts“ nach Wald verwendet, d. h. signifikante Parameter werden schrittweise in das Modell aufgenommen. Diese Methode schließt im ersten Schritt den signifikantesten Prädiktor ein. Im zweiten Schritt wird dann wiederum der Parameter ins Modell aufgenommen, der es am besten ergänzt, also in diesem neuen Modell neben dem ersten Prädiktor der signifikanteste ist. Dadurch werden nicht signifikante Prädiktoren im Modell vermieden und stark interkorrelierte Prädiktoren weitgehend ausgeschlossen.

3.11.5 Haplotypenanalyse

Zur Abschätzung der größten Haplotypwahrscheinlichkeiten (*Maximum-Likelihood Estimation*) wurde der so genannte EM-Algorithmus (*expectation-maximization*) eingesetzt. Mit diesem kann man aus den Genotypdaten und Allelfrequenzen des gesamten Patientenkollektivs für jede Genotypkombination (in diesem Fall $2^3 = 8$ mögliche Kombinationen) die Wahrscheinlichkeiten für das Vorliegen eines bestimmten Haplotyps berechnen. Somit können dann für jeden Patienten die zwei wahrscheinlichsten Haplotypen berechnet werden.

Anschließend wurden wiederum univariate Analysen durchgeführt: Patienten, die einen bestimmten Haplotypen mit über 50%iger Wahrscheinlichkeit haben, wurden verglichen mit Patienten, bei denen dieser Haplotyp wahrscheinlich nicht vorliegt (Wahrscheinlichkeit $< 50\%$). Dazu wurden die gleichen statistischen Tests wie zur Analyse der anderen Parameter eingesetzt (siehe 3.11.3).

3.11.6 Kaplan-Meier-Überlebenskurve

Kaplan-Meier-Kurven (z. B. Abbildung 8) werden zur vergleichenden Darstellung des Überlebens bzw. rezidivfreien Überlebens verschiedener Patientengruppen (z. B. Responder vs. Non-Responder) verwendet. Auf der X-Achse ist die Zeit in Monaten aufgetragen, auf der Y-Achse das kumulative Überleben ($1,0 = 100\%$). Das Eintreten eines Ereignisses (siehe Tabelle 41) drückt sich in einem Abfall der Kurve aus. Zensierungen (siehe Tabelle 41) sind durch ein Kreuz (+) gekennzeichnet.

Der Wert des kumulativen Überlebens in Prozent bei 60 Monaten entspricht der 5-Jahres-Überlebensrate und die Zeit in Monaten beim kumulativen Überleben von $0,5 = 50\%$ entspricht dem medianen Überleben.

4 Ergebnisse

Das genaue Vorgehen bei der statistischen Auswertung wird im Kapitel 3.11 erläutert. In diesem Kapitel werden die p-Werte daher in der Regel ohne den verwendeten statistischen Test notiert. In Tabellen werden signifikante p-Werte $\leq 0,05$ fett gedruckt und p-Werte $\leq 0,1$ kursiv. Es wird nochmals darauf hingewiesen, dass zusätzlich zum Gesamtkollektiv (n = 181) auch die konsekutiv erfassten Patienten ab 1999 (n = 131) betrachtet werden.

4.1 Klinische und histopathologische Patientencharakteristika

In Tabelle 43 sind alle erhobenen Patientencharakteristika aufgeführt. Die Prozentzahlen aller Angaben beziehen sich dabei auch bei der Gruppe der operierten Patienten entweder auf das Gesamtkollektiv (181 = 100%) oder auf die Gruppe der konsekutiv ab 1999 eingeschlossenen Patienten (131 = 100%).

Zu beachten ist, dass bei 14 R0-Patienten präoperativ ein ypM1-Status vorlag: 6 hatten eine lokalisierte Peritonealkarzinose, 6 Lymphknotenmetastasen und 2 eine Infiltration des Ösophagus. Es konnte jedoch in diesen Fällen sämtliches makroskopisches Tumormaterial entfernt werden, so dass eine R0-Resektion vorlag.

Tabelle 43: Patientencharakteristika

		Gesamtkollektiv	Patienten ab 1999
		Jahre (\pm S)	Jahre (\pm S)
Alter	Mittleres Alter \pm SD	55,8 \pm 10,3	56,8 \pm 10,3
	Medianes Alter	56,2	58,9
	Spannweite	23,1 – 77,2	29,8 – 77,2
		n (%)	n (%)
Patientenkollektiv	Gesamt	181 (100,0)	131 (100,0)
Geschlecht	Männlich	135 (74,6)	95 (72,5)
	Weiblich	46 (25,4)	36 (27,5)
Tumorlokalisation	Proximales Drittel	119 (65,7)	89 (67,9)
	Mittleres Drittel	36 (19,9)	22 (16,8)
	Distales Drittel	14 (7,7)	10 (7,6)
	Linitis	12 (6,6)	10 (7,6)
Laurenklassifikation	intestinal	75 (41,4)	53 (40,5)
	Mischtyp	35 (19,3)	31 (23,7)
	diffus	71 (39,2)	47 (35,9)
Grading	G1+G2	29 (16,0)	22 (16,8)
	G3	152 (84,0)	109 (83,2)

		n (%)	n (%)
Histopathologisches Ansprechen	Responder	52 (28,7)	41 (31,3)
	Non-Responder	129 (71,3)	90 (68,7)
Klinisches Ansprechen	Responder	54 (29,8)	34 (26,0)
	Non-Responder	127 (70,2)	97 (74,0)
Chemotherapie	PLF	130 (71,8)	95 (72,5)
	Docetaxel-PLF	16 (8,8)	16 (12,2)
	Paclitaxel-PLF	14 (7,7)	13 (9,9)
	E-PLF	10 (5,5)	0 (0,0)
	OLF	7 (3,9)	7 (5,3)
	EAP	4 (2,2)	0 (0,0)
Operierte Patienten		174 (96,1)	125 (95,4)
R-Kategorie	R0	143 (79,0)	107 (81,7)
	R1 / R2	31 (17,1)	18 (13,7)
ypT-Kategorie	ypT0	13 (7,2)	11 (8,4)
	ypT1	12 (6,6)	11 (8,4)
	ypT2	104 (57,5)	70 (53,4)
	ypT3	40 (22,1)	28 (21,4)
	ypT4	5 (2,8)	5 (3,8)
ypN-Kategorie	ypN0	72 (39,8)	56 (42,7)
	ypN1	59 (32,6)	43 (32,8)
	ypN2	29 (16,0)	19 (14,5)
	ypN3	14 (7,7)	7 (5,3)
ypM-Kategorie	ypM0	138 (76,2)	104 (79,4)
	ypM1	36 (19,9)	21 (16,0)

Tabelle 44 zeigt die hochsignifikante Korrelation der beiden Responsearten und die Tatsache, dass bei 38 Patienten die klinische Response nicht der histopathologischen entspricht.

Tabelle 44: Klinisches Ansprechen und histopathologisches Ansprechen (p < 0,001)

	Klinische Responder	Klinische Non-Responder
Histopathol. Responder	34	18
Histopathol. Non-Responder	20	109

4.1.1 Ansprechen auf die Chemotherapie und Prognose

Das tumorabhängige Überleben wurde mit den Daten aller 181 Patienten berechnet. 76 Patienten verstarben tumorabhängig im Beobachtungszeitraum. Die mediane

Beobachtungszeit der nicht tumorabhängig verstorbenen Patienten ($n = 105$) betrug 44,6 Monate ab Beginn der Chemotherapie. Das rezidivfreie Überleben wurde für die Gruppe der 143 R0-Patienten berechnet. Bei 58 wurde ein Rezidiv im Beobachtungszeitraum festgestellt. Die mediane Beobachtungszeit der rezidivfreien Patienten ($n = 85$) betrug 40,3 Monate ab OP. Sowohl klinische als auch histopathologische Responder wiesen im Vergleich zu Non-Respondern eine signifikant höhere Überlebensrate und eine längere Rezidivfreiheit auf (siehe Abbildung 8 bis Abbildung 11).

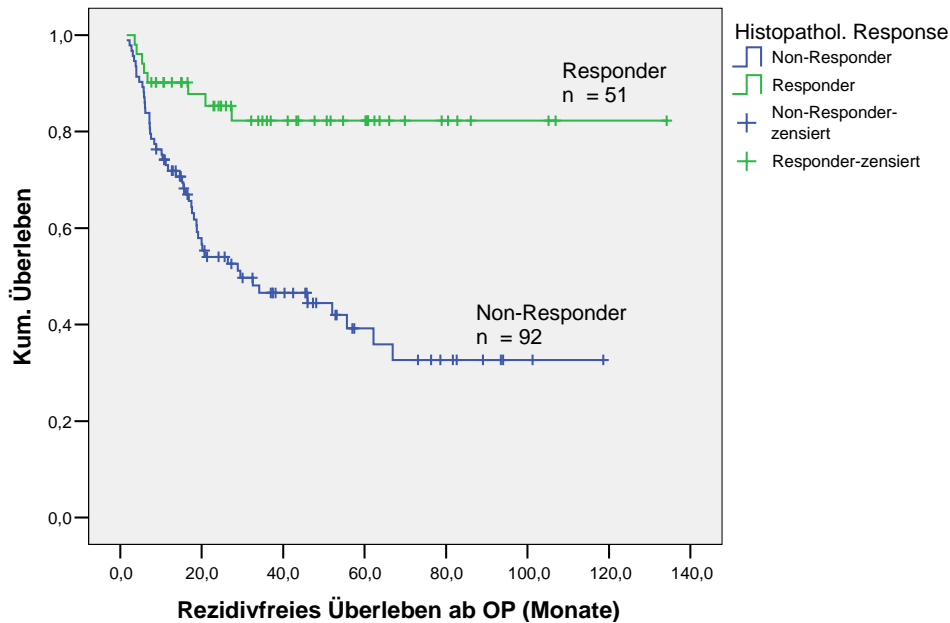


Abbildung 8: Histopathologisches Ansprechen und rezidivfreies Überleben ($p = 4e-5$)

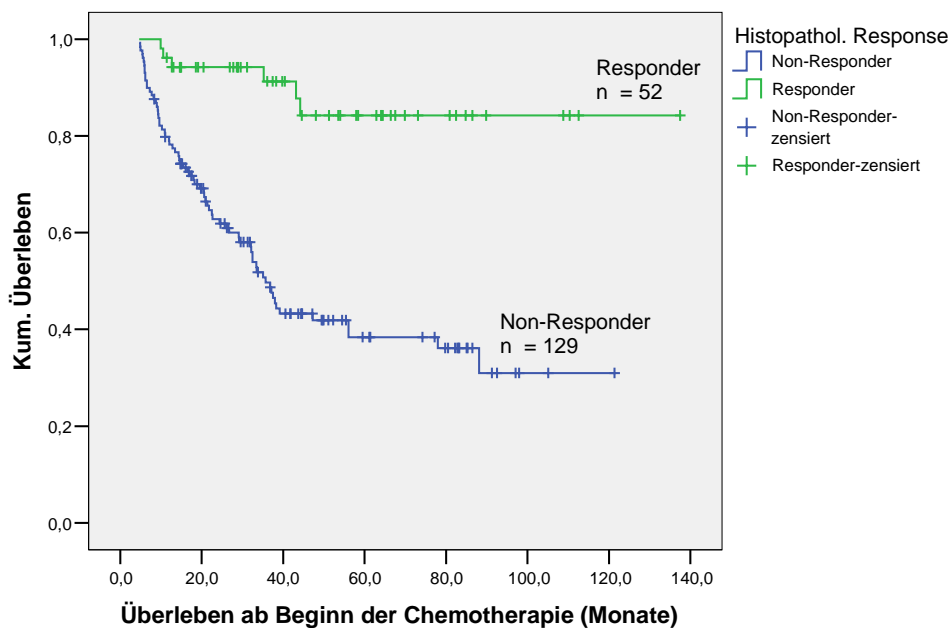


Abbildung 9: Histopathologische Response und tumorabh. Überleben ($p = 9e-7$)

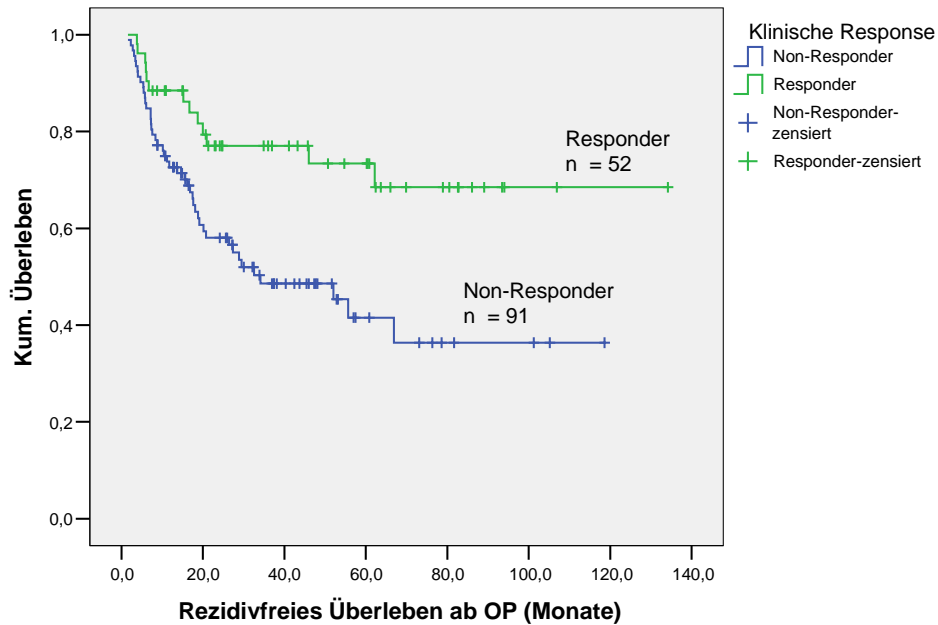


Abbildung 10: Klinische Response und rezidivfreies Überleben ($p = 0,003$)

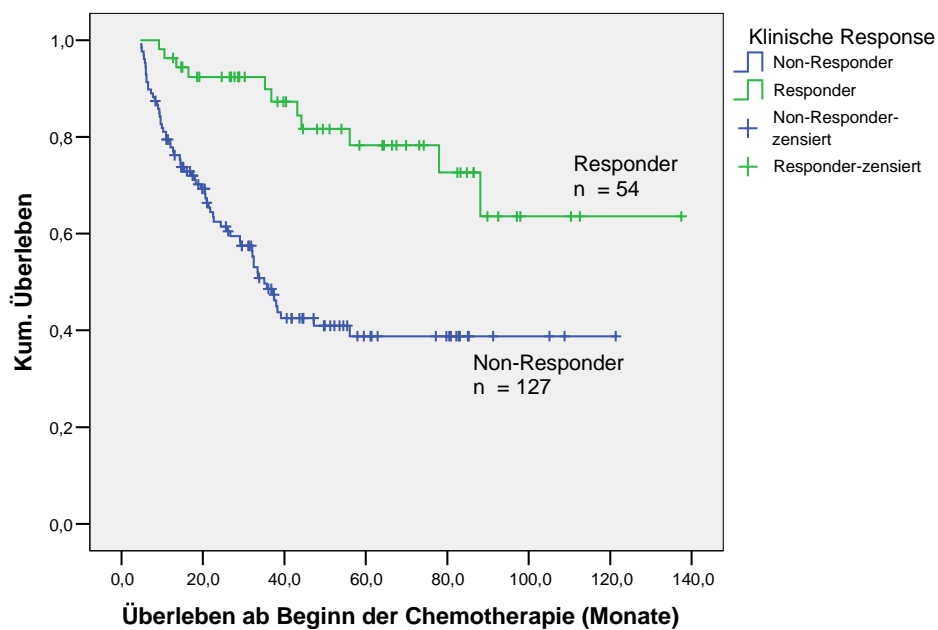


Abbildung 11: Klinische Response und tumorabhängiges Überleben ($p = 1e-5$)

4.1.2 Klinische und histopathologische Parameter und Ansprechen auf die Chemotherapie

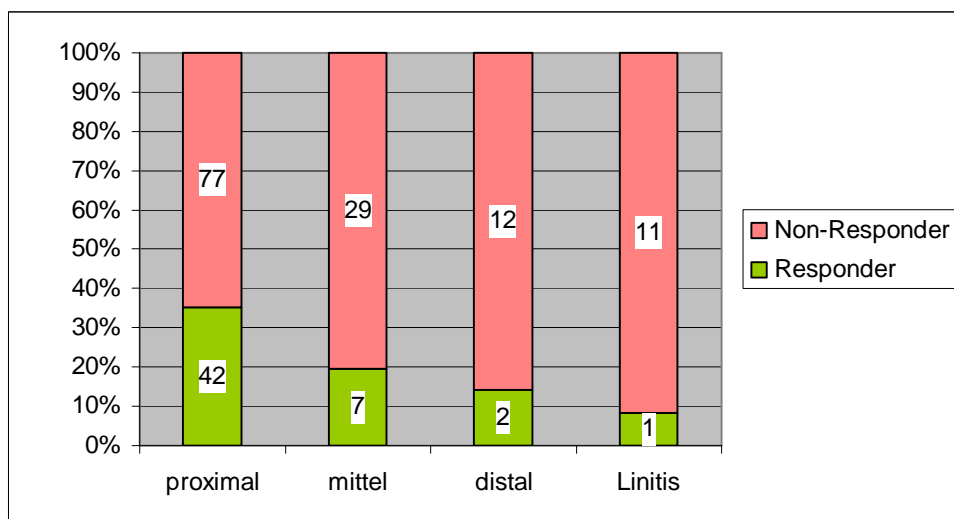
Die klinischen und histopathologischen Parameter wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf das Ansprechen auf die Chemotherapie untersucht (siehe Tabelle 45).

Tabelle 45: Klinische und histopathologische Parameter und Ansprechen

	Klinische Response	Histopathol. Response	Patienten ab 1999 klinische Response	Patienten ab 1999 histopathol. Response
Alter	0,145	0,912	0,147	0,855
Geschlecht	0,309	0,112	0,136	0,072
Tumorlokalisation	0,004	0,048*	0,008	0,123
Laurenklassifikation	0,005	0,006*	0,008	0,026
Grading	0,005	0,003*	0,005	0,038
Art der Chemotherapie	0,025	0,640	0,001	0,434

* Ergebnisse sind grafisch dargestellt.

Proximal lokalisierte Tumoren sprachen klinisch signifikant besser an als solche anderer Lokalisationen ($p = 0,004$; Patienten ab 1999 $p = 0,008$). In Bezug auf das histopathologische Ansprechen war diese Tendenz nur beim Gesamtkollektiv signifikant ($p = 0,048$; Patienten ab 1999 $p = 0,123$) (siehe Abbildung 12).

**Abbildung 12: Tumorlokalisation und histopathologische Response ($p = 0,048$)**

Tumoren vom intestinalen Typ nach Lauren sprachen klinisch und histopathologisch signifikant besser auf die Chemotherapie an als solche vom diffusen Typ (Abbildung 13).

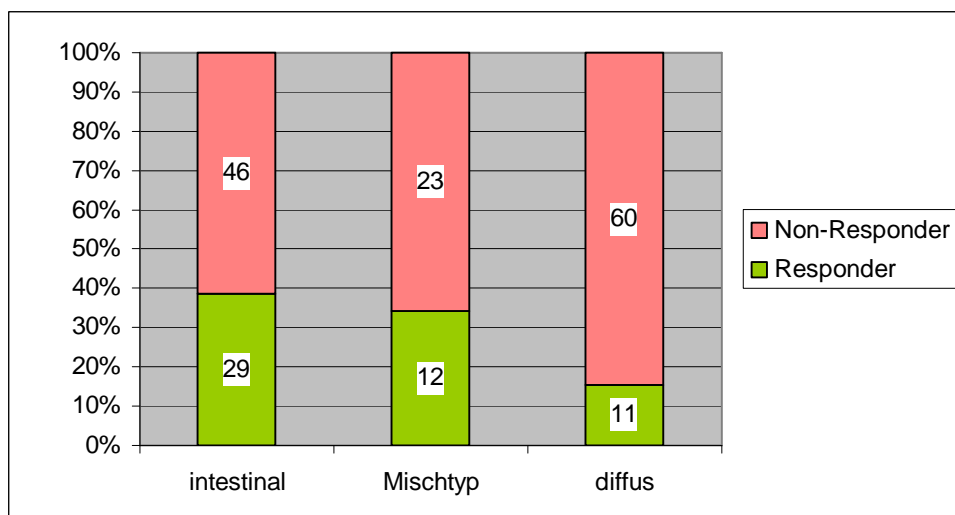


Abbildung 13: Laurenklassifikation und histopathologische Response (p = 0,006)

Gering differenzierte Tumoren (G3) sprachen klinisch und histopathologisch signifikant schlechter an als relativ gut differenzierte (G1/G2) (siehe Abbildung 14).

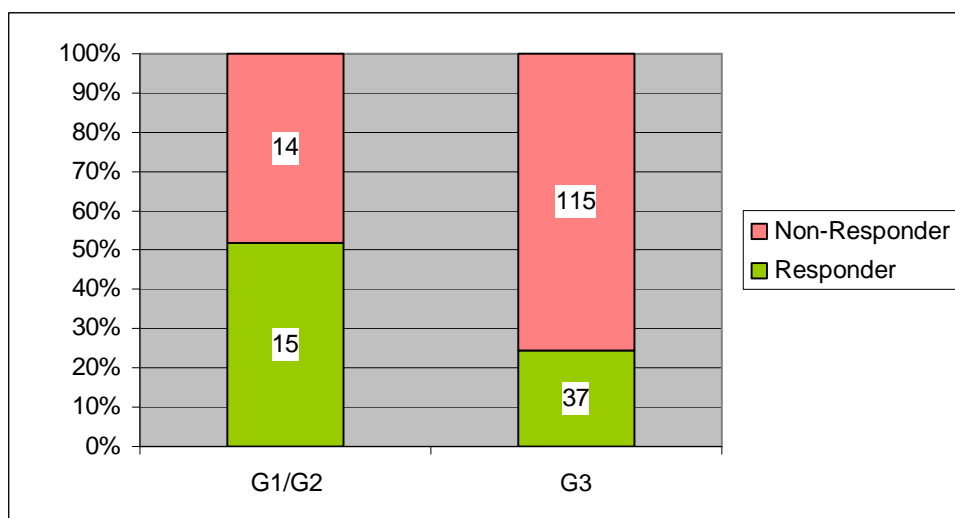


Abbildung 14: Grading und histopathologische Response (p = 0,003)

Es ergab sich ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen den verschiedenen Chemotherapien und der klinischen Response (p = 0,018; Patienten ab 1999 p = 0,001). Nach dem Paclitaxel-PLF-Schema therapierte Patienten waren überdurchschnittlich häufig Responder (9 von 14 bzw. ab 1999 9 von 13 Patienten), während sich die übrigen Chemotherapiegruppen nicht signifikant unterschieden. Bezüglich der histopathologischen Response traten keine signifikanten Unterschiede auf (p = 0,556; Patienten ab 1999 p = 0,389) (keine Abbildung).

4.1.3 Klinische und histopathologische Parameter und Prognose

Zwischen den klinischen und histopathologischen Parametern und dem Überleben zeigten sich folgende signifikante Korrelationen (siehe Tabelle 46).

Tabelle 46: Klinische und histopathologische Parameter und Überleben

	Rezidivfreies Überleben	Tumorabh. Überleben	Patienten ab 1999 Rezidivfreies Überleben	Patienten ab 1999 Tumorabh. Überleben
Alter	0,562	0,565	0,154	0,701
Geschlecht	0,154	0,067*	0,122	0,035
Tumorlokalisation	0,043	<0,001*	0,068	0,006
Laurenklassifikation	0,613	0,023*	0,527	0,269
Grading	0,076	0,011*	0,126	0,051
Chemotherapie	0,748	0,077	0,749	0,037
Nur operierte Patienten:				
ypT-Kategorie	0,007	<0,001	0,013	<0,001
ypN-Kategorie	<0,001	<0,001	0,005	<0,001
ypM-Kategorie	<0,001	<0,001	0,002	<0,001
Residualtumorstatus		<0,001		<0,001
* Ergebnisse sind grafisch dargestellt.				

Im Gesamtkollektiv zeigten Männer tendenziell eine günstigere Prognose (Abbildung 15). In den ab 1999 erfassten Patienten war diese Tendenz signifikant ($p = 0,035$).

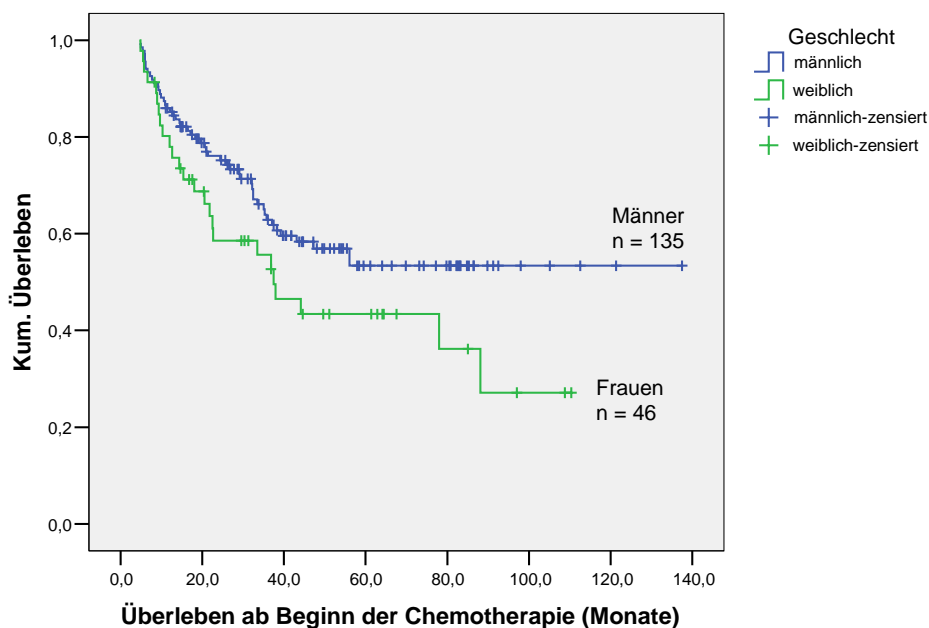


Abbildung 15: Geschlecht und tumorabhängiges Überleben ($p = 0,067$)

Die Tumorlokalisation war signifikant mit der Prognose assoziiert. Patienten mit distal gelegenen Tumoren hatten trotz der schlechten Response (siehe oben, Abbildung 12) eine bessere Überlebensrate als solche mit proximalen Tumoren. Bei Patienten mit Linitis war die Prognose infaust (siehe Abbildung 16).

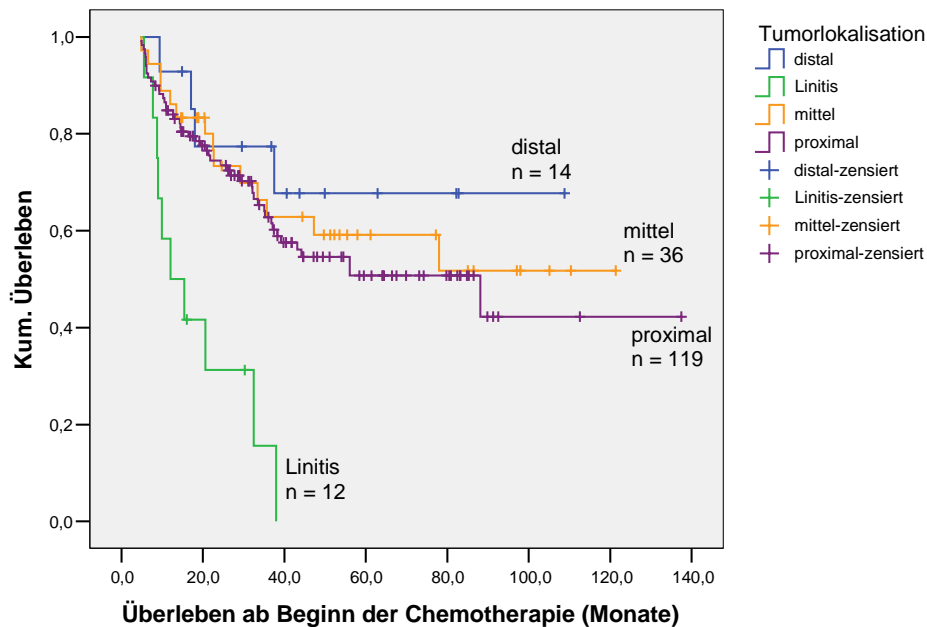


Abbildung 16: Tumorlokalisation und tumorabhängiges Überleben ($p < 0,001$)

Das schlechte Therapieansprechen der Karzinome vom diffusen Typ nach Lauren spiegelte sich auch in einer signifikant geringeren Überlebensrate wieder. Beim rezidivfreien Überleben wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen beobachtet (Abbildung 17 und Abbildung 18).

Das Grading war ebenfalls ein signifikanter prognostischer Faktor in Bezug auf das tumorabhängige Überleben (Abbildung 19). Die Korrelation mit dem rezidivfreien Überleben war grenzwertig nicht signifikant.

Patienten, die mit dem Paclitaxel-PLF-Schema therapiert wurden ($n = 14$; Patienten ab 1999: $n = 13$), wiesen ein günstigeres tumorabhängiges Überleben auf. Patienten, die Docetaxel-PLF erhielten ($n = 16$), verstarben dagegen überdurchschnittlich früh. Bei dieser Gruppe war die mittlere Beobachtungszeit allerdings gering (keine Abbildung).

Das TNM-Stadium und die R-Kategorie waren hochsignifikant mit dem rezidivfreien und dem tumorabhängigen Überleben korreliert (keine Abbildung).

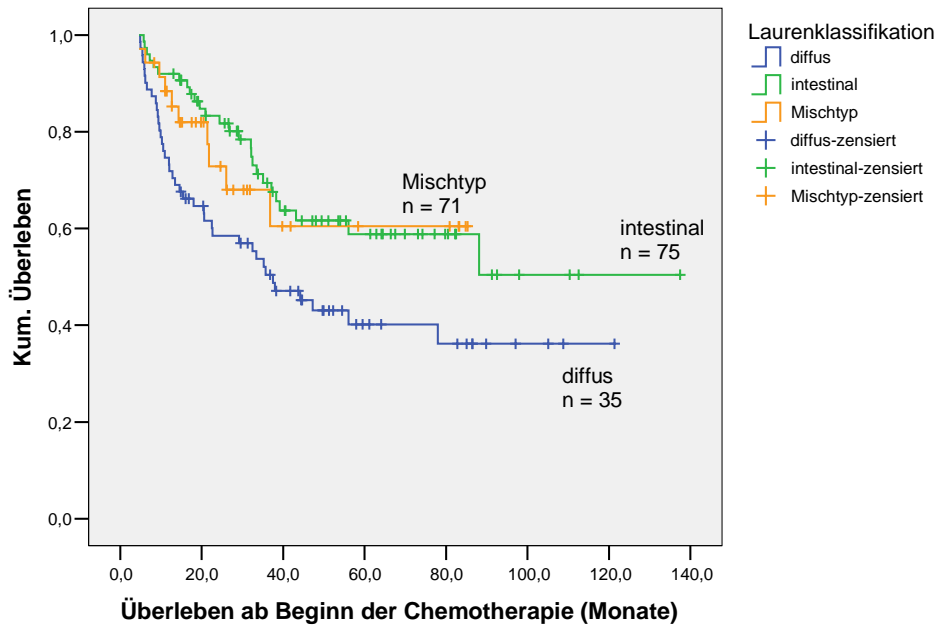


Abbildung 17: Laurenklassifikation und tumorabhängiges Überleben ($p = 0,023$)

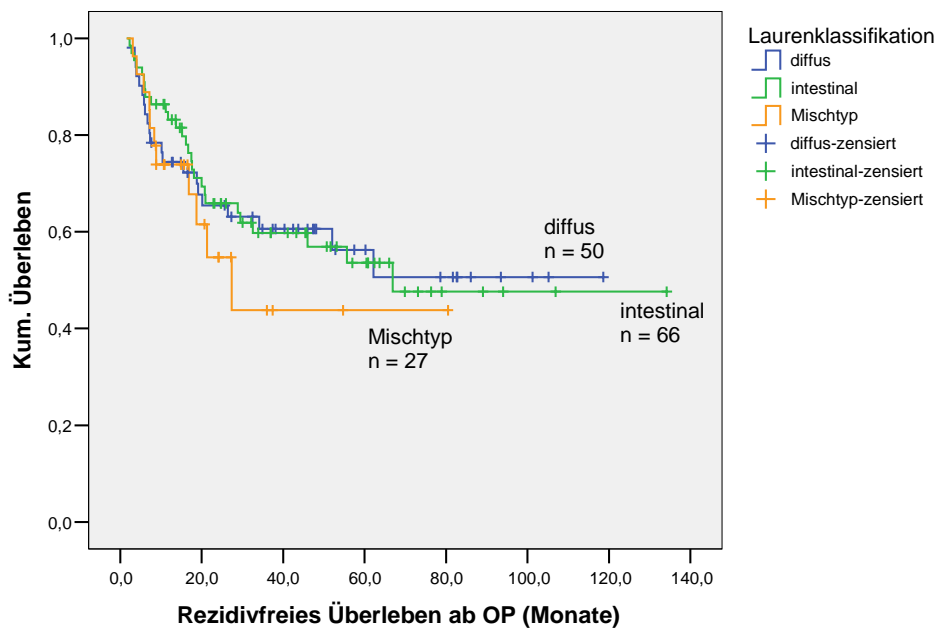


Abbildung 18: Laurenklassifikation und rezidivfreies Überleben ($p = 0,613$)

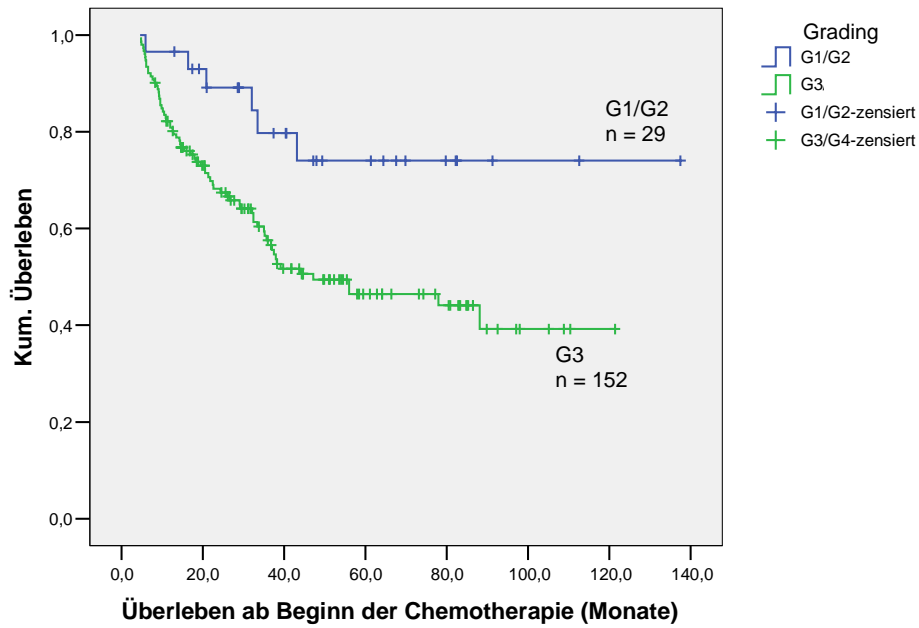


Abbildung 19: Grading und tumorabhängiges Überleben ($p = 0,011$)

4.2 DNA-Polymorphismen

Von jedem der 181 Patienten gelang die Genotypisierung aller drei Polymorphismen. Im Folgenden sind beispielhaft die Ergebnisse der Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau und der DHPLC dargestellt (Abbildung 20 und Abbildung 21).

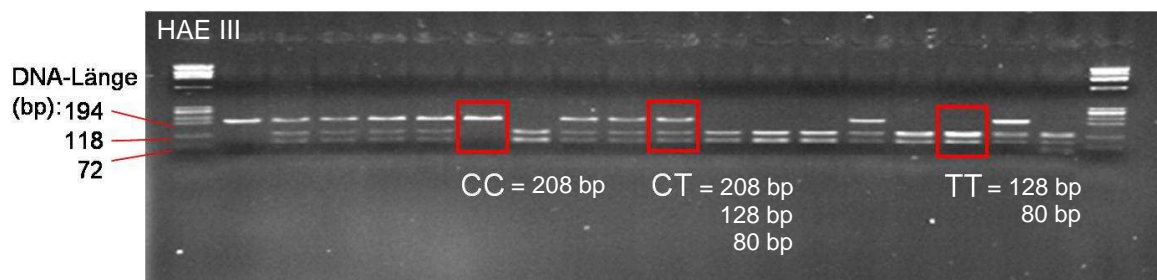


Abbildung 20: RFLP-Analyse des Polymorphismus ERCC1-118

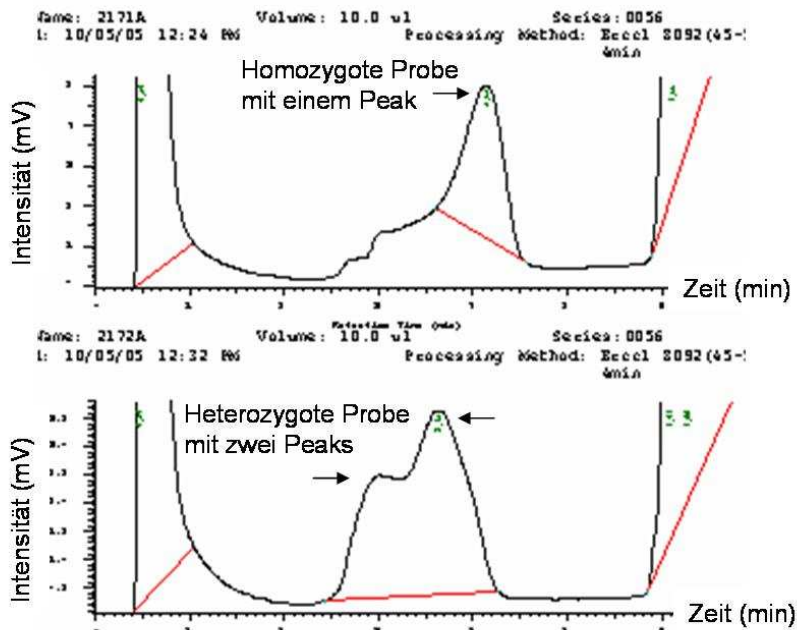


Abbildung 21: DHPLC des Polymorphismus ERCC1-8092: homozygote und heterozygote DNA-Probe

Jeweils 10% der Genotypisierungsergebnisse mittels RFLP-Analyse und DHPLC wurden durch direkte Sequenzierung überprüft. Alle überprüften Ergebnisse stimmten mit der Sequenzierung überein. Abbildung 22 bis Abbildung 24 zeigen beispielhaft die Ergebnisse der Sequenzierung des Polymorphismus ERCC2-751.

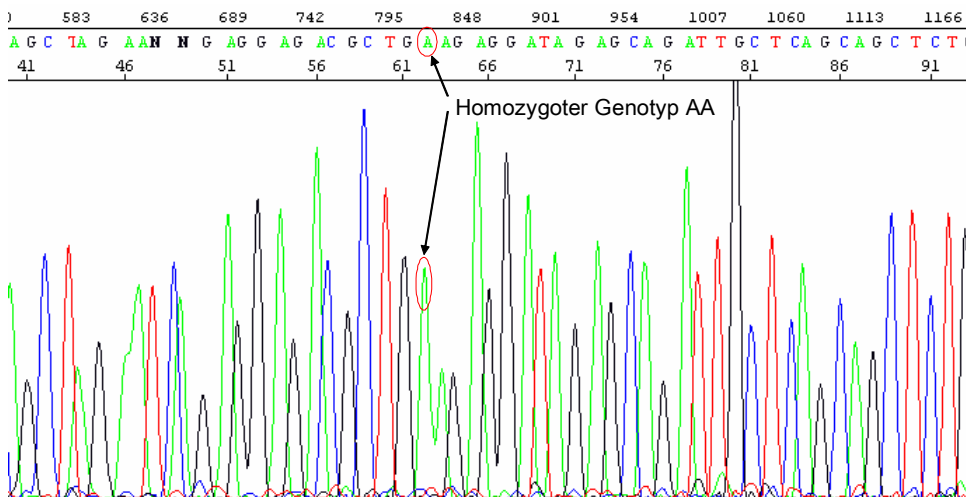


Abbildung 22: Sequenzierung des Polymorphismus ERCC2-751 (homozygot AA)

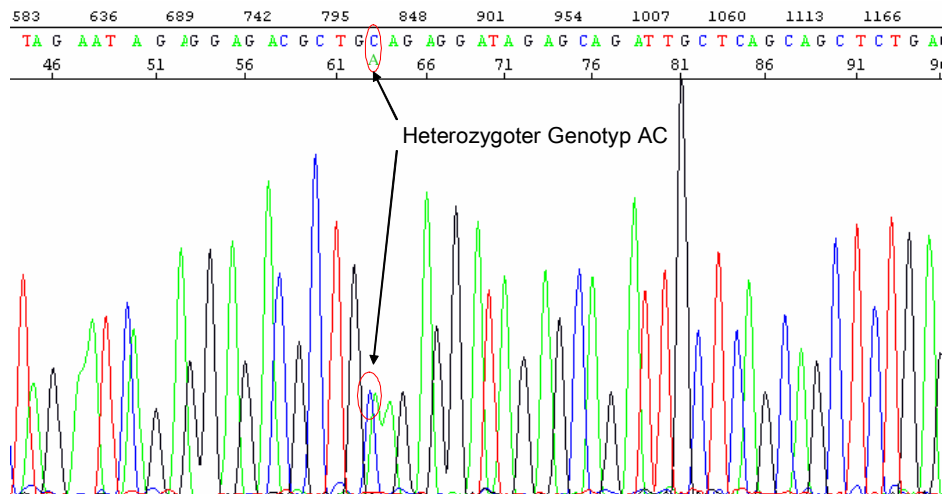


Abbildung 23: Sequenzierung des Polymorphismus ERCC2-751 (heterozygot AC)

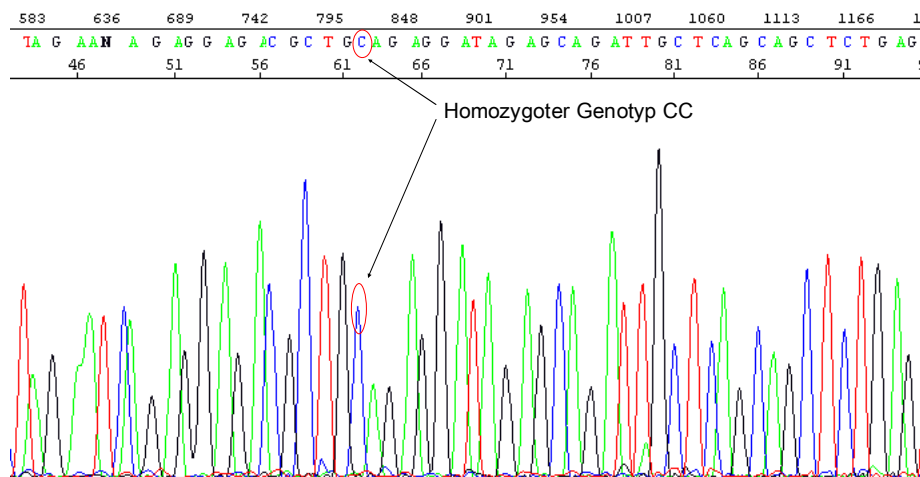


Abbildung 24: Sequenzierung des Polymorphismus ERCC2-751 (homozygot CC)

4.2.1 ERCC1-118

Die Häufigkeiten der Genotypen waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p = 0,62$) (siehe Tabelle 47).

Tabelle 47: Genotypenverteilung und Allelfrequenz von ERCC1-118

	Gesamtkollektiv	Patienten ab 1999
CC	24 (13,3%)	18 (13,7%)
CT	88 (48,6%)	64 (48,9%)
TT	69 (38,1%)	49 (37,4%)
C-Allel	136 (37,6%)	100 (38,2%)
T-Allel	226 (62,4%)	162 (61,8%)

4.2.1.1 ERCC1-118 und klinische und histopathologische Parameter

Patienten mit dem Genotyp ERCC1-118-CC waren signifikant jünger als Patienten mit anderen Genotypen (siehe Tabelle 48 und Abbildung 25).

Tabelle 48: ERCC1-118 und Alter (p-Werte bei ANOVA: CC vs. CT vs. TT = 0,037; CC vs. CT+TT = 0,014)

ERCC1-118 T	Mittleres Alter	n	SD	Spannweite
CC	51,03	24	12,65	23,1 – 69,6
CT	56,01	88	9,25	29,4 – 77,2
TT	57,22	69	10,22	33,2 – 74,0
CT+TT	56,54	157	9,68	29,4 – 77,2
Total	55,81	181	10,25	23,1 – 77,2

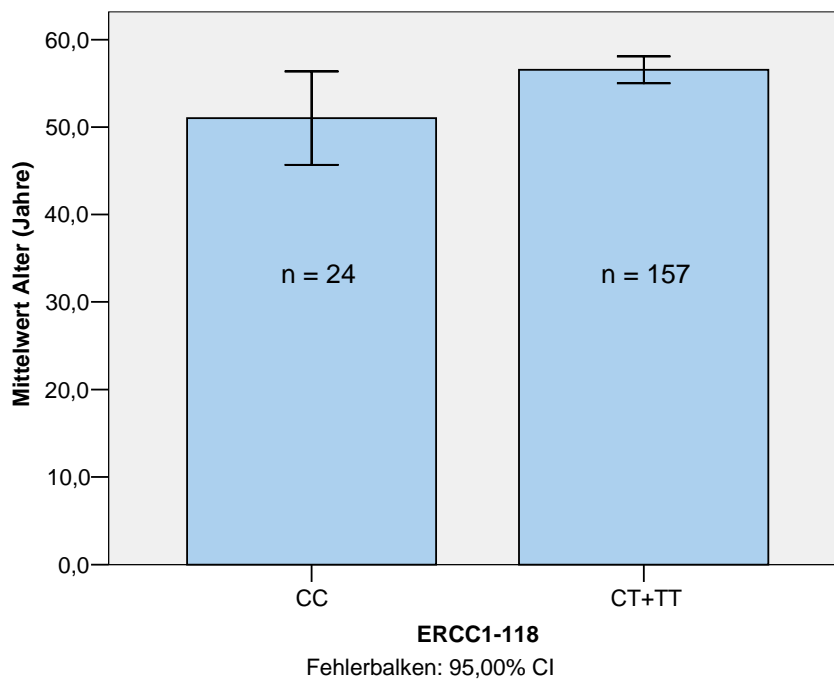


Abbildung 25: Korrelation zwischen ERCC1-118 (CC vs. CT+TT) und Alter (p = 0,014)

Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen ERCC1-118 und folgenden Parametern: Geschlecht, Tumorlokalisierung, Laurenklassifikation, Grading, Art der Chemotherapie, TNM-Stadium und R-Kategorie.

4.2.1.2 ERCC1-118 und Ansprechen auf die Chemotherapie

Zwischen ERCC1-118 und dem Therapieansprechen wurde keine signifikante Korrelation festgestellt (siehe Tabelle 49 bis Tabelle 51 und Abbildung 26).

Tabelle 49: ERCC1-118 und Ansprechen (X²-Test)

		p-Wert	Patienten ab 1999 p-Wert
Histopathol. Response	CC vs. CT vs. TT	0,731*	0,503
	CC+CT vs. TT	0,462	0,300
	CC vs. CT+TT	0,959	0,841
	CT vs. CC+TT	0,453	0,253
Klinische Response	CC vs. CT vs. TT	0,283	0,149
	CC+CT vs. TT	0,230	0,768
	CC vs. CT+TT	0,174	0,054
	CT vs. CC+TT	0,808	0,298

* Ergebnisse sind grafisch dargestellt.

Tabelle 50: ERCC1-118 und Histopathologische Responderate

Genotyp	Gesamtkollektiv (n = 181); p = 0,731			Patienten ab 1999 (n = 131); p = 0,503		
	n	Responder	Rate (%)	n	Responder	Rate (%)
CC	24	7	29,1	18	6	33,3
CT	88	23	26,1	64	17	26,6
TT	69	22	31,9	49	18	36,7

Tabelle 51: ERCC1-118 und Klinische Responderate

Genotyp	Gesamtkollektiv (n = 181); p = 0,283			Patienten ab 1999 (n = 131); p = 0,149		
	n	Responder	Rate (%)	n	Responder	Rate (%)
CC	24	10	41,7	18	8	44,4
CT	88	27	30,7	64	14	21,9
TT	69	17	24,6	49	12	24,5

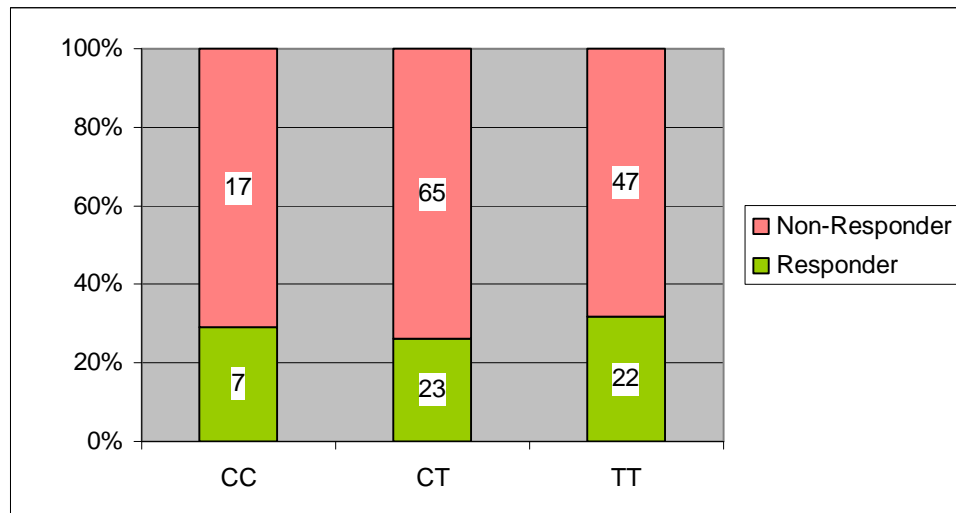


Abbildung 26: ERCC1-118 und histopathologische Response (p = 0,731)

4.2.1.3 ERCC1-118 und Prognose

In der Gruppe der konsekutiv erfassten Patienten wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem ERCC1-118-Genotyp und dem rezidivfreien Überleben festgestellt. Tendenziell zeigten Patienten mit dem heterozygoten Genotyp CT eine günstigere Prognose sowohl in Bezug auf das rezidivfreie und tumorabhängige Überleben (siehe Tabelle 52).

Tabelle 52: ERCC1-118 und Überleben (Log-Rank-Test)

		p-Wert	Patienten ab 1999 p-Wert
Tumorabh. Überleben	CC vs. CT vs. TT	0,212*	0,409
	CC+CT vs. TT	0,122	0,571
	CC vs. CT+TT	0,735	0,328
	CT vs. CC+TT	0,084	0,229
Rezidivfreies Überleben	CC vs. CT vs. TT	0,127*	0,042
	CC+CT vs. TT	0,278	0,214
	CC vs. CT+TT	0,169	0,075
	CT vs. CC+TT	0,060	0,021
* Ergebnisse sind grafisch dargestellt.			

In der univariaten Coxregression zeigten sich keine signifikanten Assoziationen zwischen dem ERCC1-118-Genotyp und dem tumorabhängigen Überleben (Tabelle 52 und Abbildung 27). Der Genotyp CT war in der Gruppe der Patienten ab 1999 grenzwertig

nicht signifikant mit einem längeren rezidivfreien Überleben korreliert, im Gesamtkollektiv dagegen nicht (siehe Tabelle 54 und Abbildung 28).

Tabelle 53: Univariate Coxregression ERCC1-118 und tumorabhängiges Überleben

Genotyp	Gesamtkollektiv (n = 181); p = 0,217				Patienten ab 1999 (n = 131); p = 0,414			
	n	Todesfälle	Rel. Risiko	95% CI	n	Todesfälle	Rel. Risiko	95% CI
CC	24	11	0,90	0,45 – 1,76	18	9	1,24	0,57 – 2,68
CT	88	30	0,65	0,40 – 1,06	64	21	0,75	0,42 – 1,37
TT	69	35	1		49	23	1	

Tabelle 54: Univariate Coxregression ERCC1-118 und rezidivfreies Überleben

Genotyp	Alle R0-Patienten (n = 143); p = 0,134				R0-Patienten ab 1999 (n = 107); p = 0,050			
	n	Rezidive	Rel. Risiko	95% CI	n	Rezidive	Rel. Risiko	95% CI
CC	18	9	1,31	0,61 – 2,79	15	8	1,44	0,63 – 3,31
CT	70	23	0,65	0,37 – 1,13	52	14	0,52	0,26 – 1,04
TT	55	26	1		40	19	1	

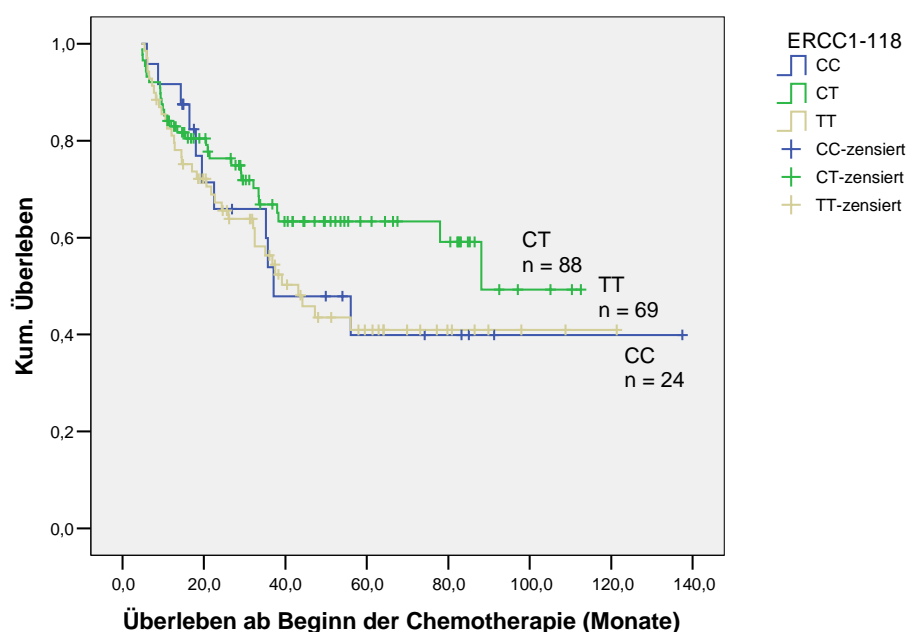


Abbildung 27: ERCC1-118 und tumorabhängiges Überleben (p = 0,212)

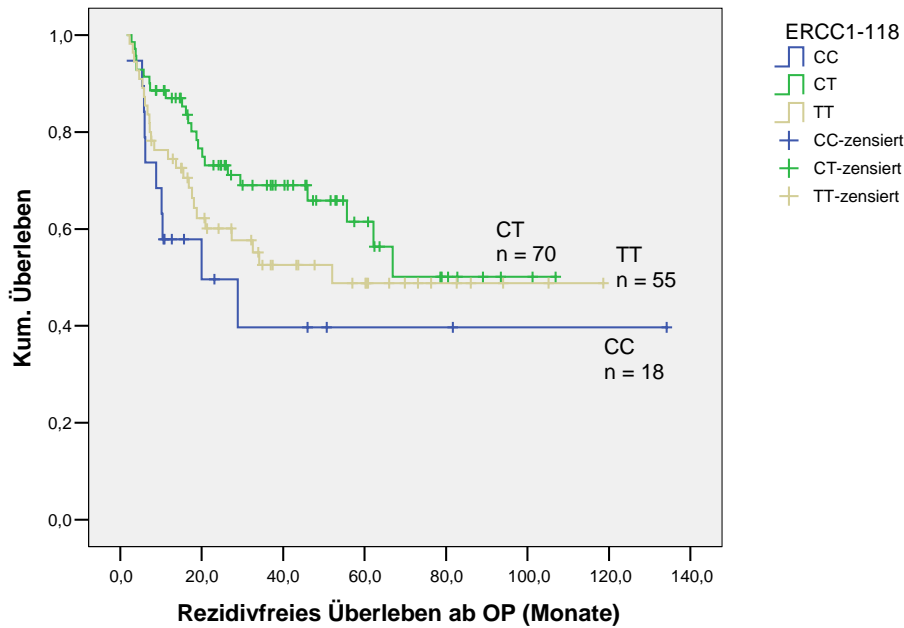


Abbildung 28: ERCC1-118 und rezidivfreies Überleben ($p = 0,127$)

4.2.2 ERCC1-8092

Die Häufigkeiten der ERCC1-8092-Genotypen sind im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p = 0,34$) (siehe Tabelle 55).

Tabelle 55: Genotypenverteilung und Allelfrequenz bei ERCC1-8092

	Gesamtkollektiv	Patienten ab 1999
AA	10 (5,5%)	9 (6,9%)
AC	75 (41,4%)	58 (44,3%)
CC	96 (53,0%)	64 (48,9%)
A-Allel	95 (26,2%)	76 (29,0%)
C-Allel	267 (73,8%)	186 (71,0%)

4.2.2.1 ERCC1-8092 und klinische und histopathologische Parameter

Analog zu ERCC1-118 zeigte sich eine Assoziation zwischen Alter und ERCC1-8092, welche jedoch nicht signifikant war (siehe Tabelle 56).

Zwischen ERCC1-8092 und den übrigen klinischen und histopathologischen Parametern wurde keine signifikante Korrelation beobachtet.

Tabelle 56: ERCC1-8092 und Alter (p = 0,114)

ERCC1-8092	Mittleres Alter	n	Standardabweichung
AA	50,50	10	13,62
AC	55,04	75	10,24
CC	56,97	96	9,75
Total	55,81	181	10,25

4.2.2.2 ERCC1-8092 und Ansprechen auf die Chemotherapie

Beim Vergleich vom AA-Genotyp mit den restlichen Genotypen zeigte sich in der konsekutiv erfassten Patientengruppe eine signifikante Korrelation mit dem klinischen Ansprechen (siehe Tabelle 57). Sonst wurden keine signifikanten Assoziationen beobachtet (siehe Tabelle 58, Tabelle 59 und Abbildung 29).

Tabelle 57: ERCC1-8092 und Ansprechen (X²-Test)

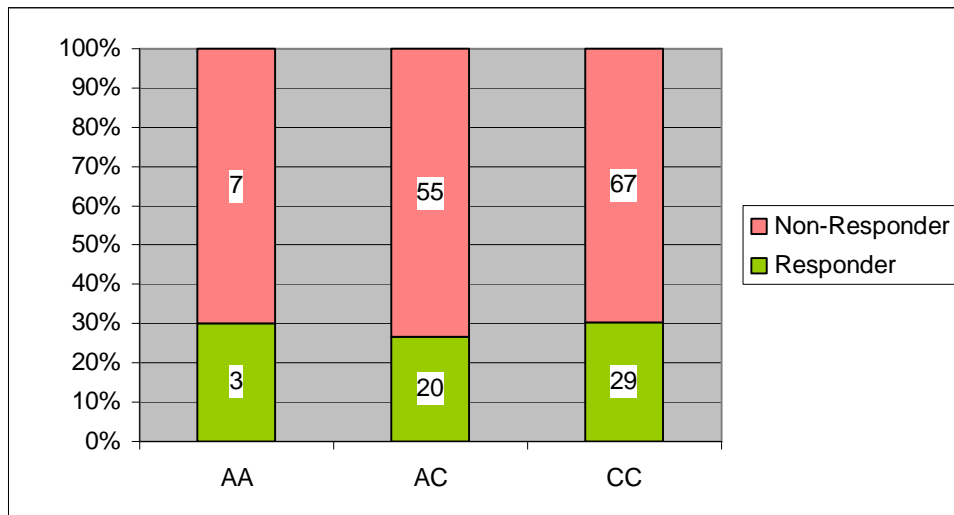
		p-Wert	Patienten ab 1999 p-Wert
Histopathol. Ansprechen	AA vs. AC vs. CC	0,875*	0,715
	AA+AC vs. CC	0,640	0,458
	AA vs. AC+CC	0,927	0,891
	AC vs. AA+CC	0,606	0,414
Klinisches Ansprechen	AA vs. AC vs. CC	0,352	0,110
	AA+AC vs. CC	0,593	0,521
	AA vs. AC+CC	0,152	0,036
	AC vs. AA+CC	0,901	0,673
* Ergebnisse sind grafisch dargestellt.			

Tabelle 58: ERCC1-8092 und histopathologische Responserate

Genotyp	Gesamtkollektiv (n = 181); p = 0,875			Patienten ab 1999 (n = 131); p = 0,715		
	n	Responder	Rate (%)	n	Responder	Rate (%)
AA	10	3	30,0	9	3	33,3
AC	75	20	26,7	58	16	27,6
CC	96	29	30,2	64	22	34,4

Tabelle 59: ERCC1-8092 und klinische Responserate

Genotyp	Gesamtkollektiv (n = 181); p = 0,352			Patienten ab 1999 (n = 131); p = 0,110		
	n	Responder	Rate (%)	n	Responder	Rate (%)
AA	10	5	50,0	9	5	55,5
AC	75	22	29,3	58	14	24,1
CC	96	27	28,1	64	15	23,4

**Abbildung 29: ERCC1-8092 und Histopathologische Response (p = 0,875)**

4.2.2.3 ERCC1-8092 und Prognose

Zwischen ERCC1-8092 und dem rezidivfreien Überleben zeigte sich eine signifikante Korrelation, die bei den Patienten ab 1999 allerdings nicht signifikant war (siehe Tabelle 60, Abbildung 30 und Abbildung 31).

Tabelle 60: ERCC1-8092 und Überleben (Log-Rank-Test)

		p-Wert	Patienten ab 1999 p-Wert
Tumorabh. Überleben	AA vs. AC vs. CC	0,240*	0,721
	AA+AC vs. CC	0,490	0,708
	AA vs. AC+CC	0,185	0,427
	AC vs. AA+CC	0,204	0,980
Rezidivfreies Überleben	AA vs. AC vs. CC	0,015*	<i>0,096</i>
	AA+AC vs. CC	0,138	0,253
	AA vs. AC+CC	0,033	0,127
	AC vs. AA+CC	0,022	<i>0,071</i>

* Ergebnisse sind grafisch dargestellt.

Im Gegensatz zum tumorabhängigen Überleben (Tabelle 61) stellte sich in der univariaten Coxregression ein geringeres Rezidivrisiko bei Patienten mit heterozygotem ERCC1-8092-Genotyp heraus (siehe Tabelle 62).

Tabelle 61: Univariate Coxregression ERCC1-8092 und tumorabhängiges Überleben

Genotyp	Gesamtkollektiv (n = 181); p = 0,248				Patienten ab 1999 (n = 131); p = 0,723			
	n	Todesfälle	Rel. Risiko	95% CI	n	Todesfälle	Rel. Risiko	95% CI
AA	10	6	1,58	0,67 – 3,70	9	5	1,48	0,57 – 3,85
AC	75	25	0,77	0,47 – 1,25	58	21	1,05	0,59 – 1,85
CC	96	45	1		64	27	1	

Tabelle 62: Univariate Coxregression ERCC1-8092 und rezidivfreies Überleben

Genotyp	Alle R0-Patienten (n = 143); p = 0,020				R0-Patienten ab 1999 (n = 107); p = 0,108			
	n	Rezidive	Rel. Risiko	95% CI	n	Rezidive	Rel. Risiko	95% CI
AA	8	5	2,13	0,83 – 5,48	7	4	1,77	0,61 – 5,14
AC	57	16	0,55	0,31 – 0,99	45	12	0,58	0,29 – 1,15
CC	78	37	1		55	25	1	

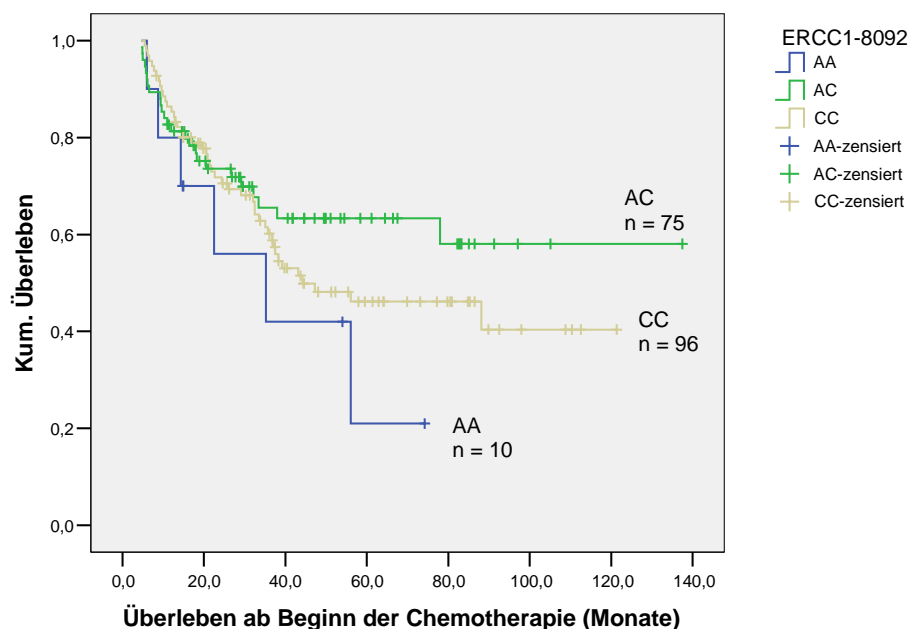


Abbildung 30: ERCC1-8092 und tumorabhängiges Überleben (p = 0,240)

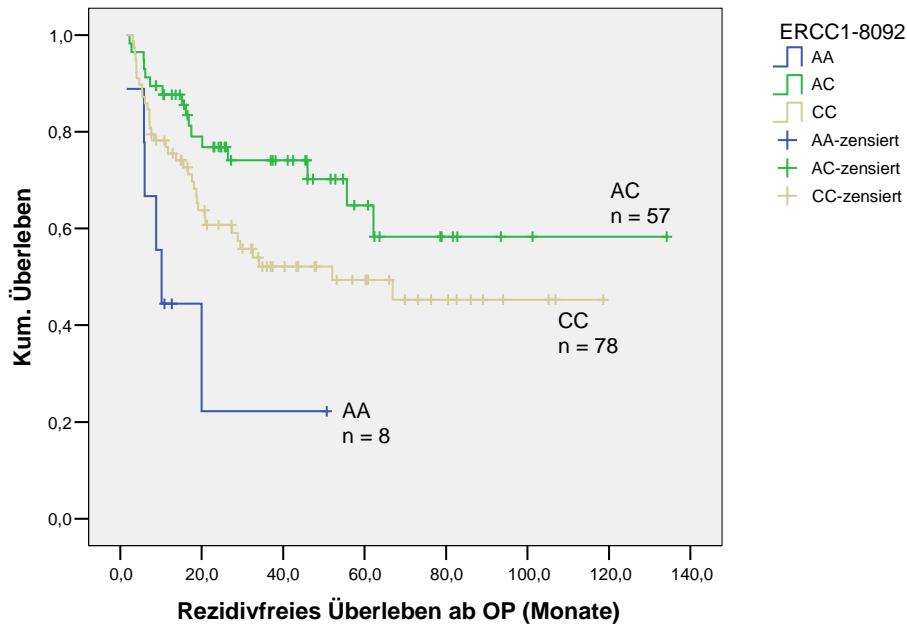


Abbildung 31: ERCC1-8092 und rezidivfreies Überleben ($p = 0,015$)

4.2.3 ERCC2-751

Die Häufigkeiten der Genotypen waren nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. ($p = 0,003$) (Tabelle 63).

Tabelle 63: Allelfrequenz und Genotypenverteilung bei ERCC2-751

	Gesamtkollektiv	Patienten ab 1999
AA	69 (38,1%)	48 (36,6%)
AC	69 (38,1%)	51 (38,9%)
CC	43 (23,8%)	32 (24,4%)
A-Allel	207 (57,2%)	149 (56,9%)
C-Allel	155 (42,8%)	113 (43,1%)

4.2.3.1 ERCC2-751 und klinische und histopathologische Parameter

Zwischen den ERCC2-751-Genotypen und den Parametern Alter, Geschlecht, Tumorlokalisierung, Laurenklassifikation, Grading, Art der Chemotherapie, TNM-Stadium und Residualtumorstatus wurde keine signifikante Korrelation festgestellt.

4.2.3.2 ERCC2-751 und Ansprechen auf die Chemotherapie

Zwischen ERCC2-751 und dem Ansprechen auf die Chemotherapie zeigte sich keine Korrelation (siehe Tabelle 64 bis Tabelle 66 und Abbildung 32).

Tabelle 64: ERCC2-751 und Ansprechen (X²-Test)

		p-Wert	Patienten ab 1999 p-Wert
Histopathol. Response	AA vs. AC vs. CC	0,197*	0,747
	AA+AC vs. CC	0,073	0,666
	AA vs. AC+CC	0,537	0,702
	AC vs. AA+CC	0,340	0,448
Klinische Response	AA vs. AC vs. CC	0,981*	0,952
	AA+AC vs. CC	0,948	0,887
	AA vs. AC+CC	0,845	0,850
	AC vs. AA+CC	0,890	0,755
* Ergebnis grafisch dargestellt			

Tabelle 65: ERCC2-751 und histopathologische Responderate

Genotyp	Gesamtkollektiv (n = 181); p = 0,197			Patienten ab 1999 (n = 131); p = 0,747		
	n	Responder	Rate (%)	n	Responder	Rate (%)
AA	69	18	26,1	48	16	33,3
AC	69	17	24,6	51	14	27,5
CC	43	17	39,5	32	11	34,4

Tabelle 66: ERCC2-751 und Klinische Responderate

Genotyp	Gesamtkollektiv (n = 181); p = 0,981			Patienten ab 1999 (n = 131); p = 0,952		
	n	Responder	Rate (%)	n	Responder	Rate (%)
AA	69	20	29,0	48	12	25,0
AC	69	21	30,4	51	14	27,5
CC	43	13	30,2	32	8	25,0

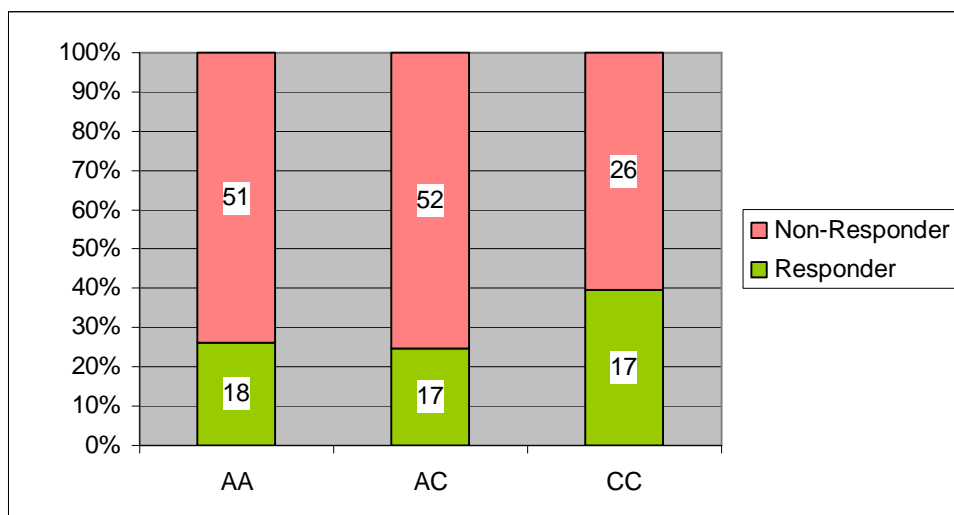


Abbildung 32: ERCC2-751 und histopathologische Response (p = 0,197)

4.2.3.3 ERCC2-751 und Prognose

Eine grenzwertig signifikante Korrelation zwischen dem ERCC2-751-Genotyp und dem rezidivfreien Überleben zeigte sich im Gesamtkollektiv (siehe Tabelle 67 und Tabelle 69). Diese war in der konsekutiv erfassten Patientengruppe nicht signifikant.

Tabelle 67: ERCC2-751 und Überleben (Log-Rank-Test)

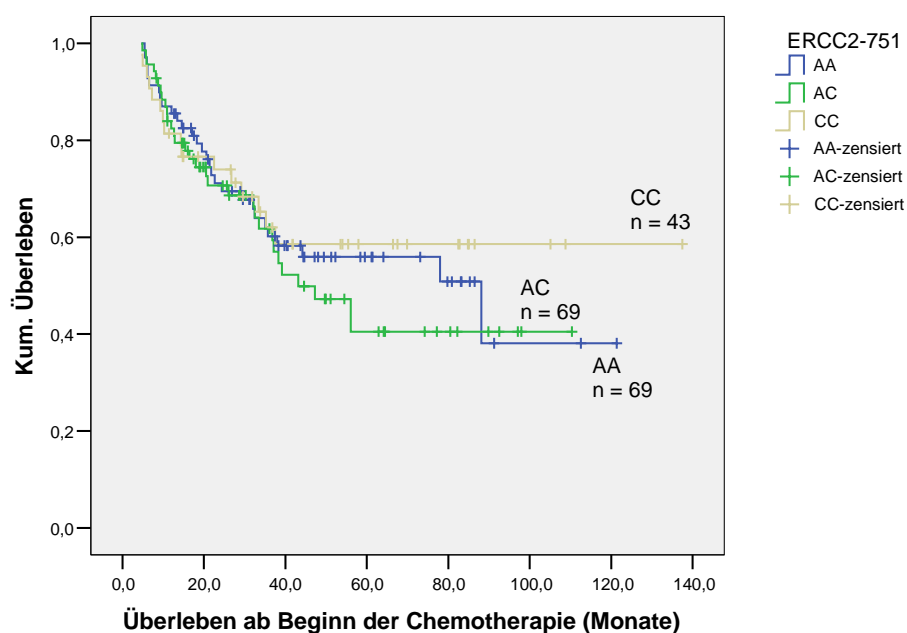
		p-Wert	Patienten ab 1999 p-Wert
Tumorabh. Überleben	AA vs. AC vs. CC	0,642*	0,445
	AA+AC vs. CC	0,506	0,601
	AA vs. AC+CC	0,776	0,204
	AC vs. AA+CC	0,376	0,402
Rezidivfreies Überleben	AA vs. AC vs. CC	0,048*	0,120
	AA+AC vs. CC	0,055	0,630
	AA vs. AC+CC	0,604	0,119
	AC vs. AA+CC	0,024	0,043

Tabelle 68: Univariate Coxregression ERCC2-751 und tumorabhängiges Überleben

	Gesamtkollektiv (n = 181); p = 0,643				Patienten ab 1999 (n = 131); p = 0,449			
Genotyp	n	Todesfälle	Rel. Risiko	95% CI	n	Todesfälle	Rel. Risiko	95% CI
AA	69	29	1,11	0,60 – 2,04	48	17	0,70	0,34 – 1,42
AC	69	31	1,31	0,72 – 2,40	51	22	1,02	0,52 – 2,00
CC	43	16	1		32	14	1	

Tabelle 69: Univariate Coxregression ERCC2-751 und rezidivfreies Überleben

	Alle R0-Patienten (n = 143); p = 0,054				R0-Patienten ab 1999 (n = 107); p = 0,129			
Genotyp	n	Rezidive	Rel. Risiko	95% CI	n	Rezidive	Rel. Risiko	95% CI
AA	52	19	1,57	0,71 – 3,47	40	12	0,82	0,34 – 2,01
AC	58	30	2,39	1,13 – 5,05	44	21	1,66	0,73 – 3,76
CC	33	9	1		23	8	1	

**Abbildung 33: ERCC2-751 und tumorabhängiges Überleben (p = 0,642)**

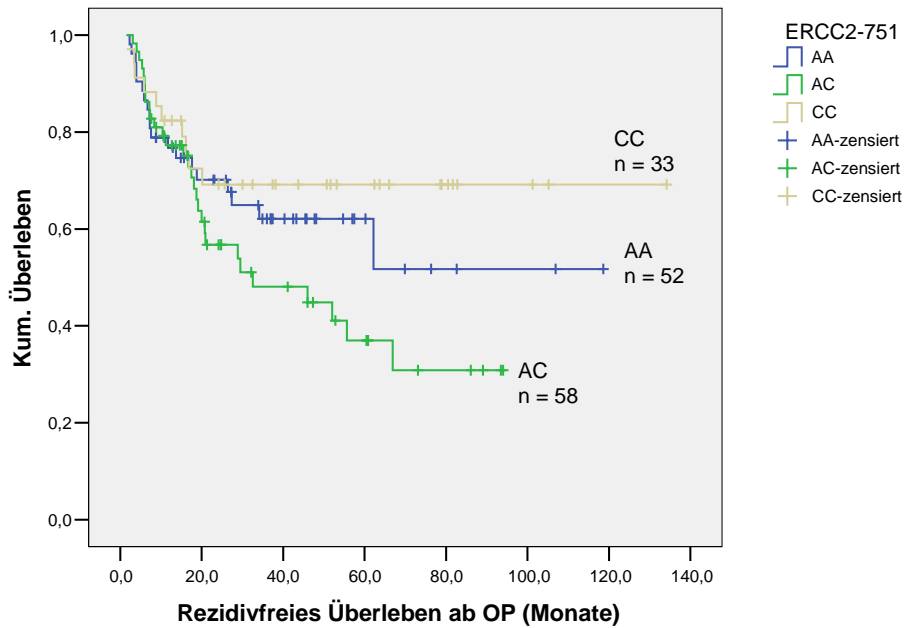


Abbildung 34: ERCC2-751 und rezidivfreies Überleben ($p = 0,048$)

4.2.4 Haplotypenanalyse

Die drei Polymorphismen sind hochsignifikant miteinander korreliert. Am stärksten ist die Assoziation zwischen ERCC1-118 und ERCC1-8092, am schwächsten zwischen ERCC1-118 und ERCC2-751 (siehe Tabelle 70).

Tabelle 70: Assoziationen zwischen den Polymorphismen

	ERCC1-8092 (Patienten ab 1999)	ERCC2-751 (Patienten ab 1999)
ERCC1-118	<0,001 (<0,001)	0,040 (0,109)
ERCC1-8092	--	<0,001 (0,003)

In Tabelle 71 sind die mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode geschätzten Haplotypen angegeben. Beispiel für Schreibweise: Haplotyp CAA = ERCC1-118C, ERCC1-8092A und ERCC2-751A. Die folgenden Analysen schließen die Haplotypen TAA und TAC wegen ihrer geringen Frequenz nicht ein.

In der univariaten Analyse zeigte der Haplotyp CCA ein signifikant schlechteres rezidivfreies Überleben (siehe Tabelle 72).

Tabelle 71: Geschätzte Haplotypfrequenzen

Haplotyp*	Wahrscheinlichkeit (%)	95% CI (%)	n
CAA	7,8	3,7 – 11,8	23
CAC	17,2	11,1 – 23,3	61
CCA	8,8	4,5 – 13,2	34
CCC	3,8	1,0 – 6,7	9
TAA	1,0	-0,5 – 2,4	3
TAC	0,3	-0,5 – 1,1	1
TCA	39,6	30,4 – 48,9	114
TCC	21,5	14,7 – 28,3	69

* Haplotyp der Polymorphismen ERCC1-118, ERCC1-8092 und ERCC2-751
n = Geschätzte Patientenzahl, die mind. ein Exemplar des Haplotypen besitzt

Tabelle 72: Haplotypen und Ansprechen und Überleben

Haplotyp*	Klinisches Ansprechen**	Histopathol. Ansprechen**	Tumorabhängiges Überleben***	Rezidivfreies Überleben***
CAA	0,33	1	0,105	0,398
CAC	0,61	1	0,942	0,260
CCA	0,3	0,3	0,708	0,037
CCC	0,73	0,28	0,202	0,520
TCA	0,51	0,61	0,557	0,873
TCC	0,87	0,31	0,796	0,937

* Haplotyp der Polymorphismen ERCC1-118, ERCC1-8092 und ERCC2-751
** p-Wert im X²-Test; ***p-Wert im log-Rank-Test

4.2.5 Multivariate Analyse der Prognose

Die multivariate Analyse des tumorabhängigen Überlebens (welches nur bei operierten Patienten berechnet wurde) und des rezidivfreien Überlebens wurde mit dem Cox-Modell und der Methode „schrittweise-vorwärts“ nach Wald durchgeführt (siehe 3.11.4). Alle klinischen und histopathologischen Parameter, die in der univariaten Analyse mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,1$ entweder mit dem tumorabhängigen Überleben oder dem rezidivfreien Überleben korreliert waren, wurden im Cox-Modell berücksichtigt. Dies sind folgende zehn Parameter: Geschlecht, Tumorlokalisierung, Laurenklassifikation, Grading, ypT-Kategorie, ypN-Kategorie, ypM-Kategorie, Residualtumorstatus (dieser nicht beim

rezidivfreien Überleben), die histopathologische und die klinische Response. Ausnahme ist der Parameter „Art der Chemotherapie“, der wegen vieler zahlenmäßig kleiner Patientengruppen ausgeschlossen wurde, obwohl er mit einem p-Wert von 0,077 grenzwertig und in der Gruppe der konsekutiv erfassten Patienten sogar signifikant ($p = 0,037$) mit dem tumorabhängigen Überleben assoziiert war. Zusätzlich wurde auch der Einfluss aller Polymorphismen untersucht, unabhängig davon, ob ein signifikantes Resultat in der univariaten Analyse vorlag.

Im Folgenden sind die Parameter aufgelistet, welche die Methode nach Wald als signifikant bewertet hat. Das Vorhandensein einer Fernmetastasierung erhöhte das Risiko, tumorabhängig zu versterben, um das 7,7fache (siehe Tabelle 73). Histopathologische Non-Responder hatten ein fast fünffach erhöhtes Sterberisiko. Das Risiko der Patienten mit dem Genotyp ERCC1-118 TT war gegenüber heterozygoten CT-Trägern etwa um den Faktor 2,56 erhöht.

Tabelle 73: Cox-Modell „schrittweise-vorwärts“ nach Wald des tumorabhängigen Überlebens (nur operierte Patienten) (3 Schritte)

Parameter	Kategorie	p-Wert	Rel. Risiko	95%-CI
ypM-Kategorie	ypM1	< 0,001	1	
	ypM0	< 0,001	0,13	0,08 – 0,22
Histopathol. Ansprechen	Responder	< 0,001	1	
	Non-Responder	< 0,001	4,71	2,01 – 11,03
ERCC1-118	CC	0,327	0,71	0,36 – 1,41
	CT	0,001	0,39	0,23 – 0,66
	TT	0,002	1	

Ähnliche Ergebnisse gab es, wenn die Analyse auf die ab 1999 konsekutiv beobachtete Patientengruppe beschränkt wurde. Hier wurde zusätzlich der Residualtumorstatus in das Modell mit aufgenommen (Tabelle 74).

Auch bei der Analyse des rezidivfreien Überlebens (nur R0-Patienten) wurde der Polymorphismus ERCC1-118 als signifikanter prädiktiver Faktor eingestuft (relatives Risiko TT vs. CT = 2,0). Wie beim tumorabhängigen Überleben waren die stärksten Faktoren die ypM-Kategorie und das histopathologische Ansprechen. Darüber hinaus war die Tumorlokalisierung mit dem Rezidivrisiko, korreliert (Tabelle 75).

Bei den konsekutiv beobachteten Patienten wählte die Methode nach Wald die Tumorlokalisierung nicht aus. Der Genotyp ERCC1-118 CT erwies sich aber auch hier als günstig (siehe Tabelle 76).

Tabelle 74: Cox-Modell „schrittweise-vorwärts“ nach Wald des tumorabhängigen Überlebens (nur operierte Patienten) ab 1999 (4 Schritte)

Parameter	Kategorie	p-Wert	Rel. Risiko	95%-CI
ypM-Kategorie	ypM1	< 0,001	1	
	ypM0	< 0,001	0,18	0,08 – 0,41
Histopathol. Ansprechen	Responder	0,005	1	
	Non-Responder	0,005	3,99	1,52 – 10,48
Residual- tumorstatus	R1/R2	0,012	1	
	R0	0,012	0,34	0,15 – 0,79
ERCC1-118	CC	0,248	1,62	0,72 – 3,65
	CT	0,041	0,48	0,23 – 0,97
	TT	0,020	1	

Tabelle 75: Cox-Modell „schrittweise-vorwärts“ nach Wald des rezidivfreien Überlebens (4 Schritte)

Parameter	Kategorie	p-Wert	Rel. Risiko	95%-CI
ypM-Kategorie	ypM1	< 0,001	1	
	ypM0	< 0,001	0,14	0,07 – 0,30
Histopathol. Ansprechen	Responder	< 0,001	1	
	Non-Responder	< 0,001	5,20	2,42 – 11,18
Tumor- lokalisation	proximal	0,819	1,15	0,35 – 3,72
	mittel	0,105	0,36	0,11 – 1,24
	distal	0,276	0,41	0,08 – 2,06
	Linitis	0,009	1	
ERCC1-118	CC	0,479	1,32	0,61 – 2,86
	CT	0,019	0,50	0,28 – 0,89
	TT	0,018	1	

Tabelle 76: Cox-Modell „schrittweise-vorwärts“ nach Wald des rezidivfreien Überlebens ab 1999 (3 Schritte)

Parameter	Kategorie	p-Wert	Rel. Risiko	95%-CI
Histopathol. Ansprechen	Responder	< 0,001	1	
	Non-Responder	< 0,001	5,09	2,10 – 12,32
ypM-Kategorie	ypM1	0,001	1	
	ypM0	0,001	0,19	0,07 – 0,51
ERCC1-118	CC	0,764	1,14	0,50 – 2,61
	CT	0,002	0,29	0,13 – 0,62
	TT	0,002	1	

Um die Ergebnisse der multivariaten Analyse zu illustrieren, wurden in der Gruppe der Patienten ohne Fernmetastasen (ypM0) das tumorabhängige Überleben und das rezidivfreie Überleben in Bezug auf ERCC1-118 univariat berechnet. In dieser Gruppe (n = 138 bzw. n = 129) ist die Prognose dem Cox-Modell zufolge hauptsächlich vom histopathologischen Ansprechen und vom ERCC1-118-Genotyp abhängig. Die Unterschiede zwischen dem CT- und dem TT-Genotyp sind in dieser Untergruppe signifikant (siehe Abbildung 35).

In der multivariaten Analyse wurde stets das Vorliegen von Fernmetastasen (ypM-Kategorie) und nicht der Residualtumorstatus (R-Kategorie) als der prognostisch wichtigste Faktor gewertet. Daher wurde der Einfluss des einen Parameters bei gegebenem anderem Parameter untersucht. Die folgenden Abbildungen veranschaulichen, dass ypM0-Patienten sowohl bei den R0- als auch bei den R1-Patienten signifikant länger überleben. Der Residualtumorstatus hat bei den ypM1-Patienten einen signifikanten Einfluss ($p = 0,036$) auf das tumorabhängige Überleben, nicht jedoch auf ypM0-Patienten ($p = 0,286$).

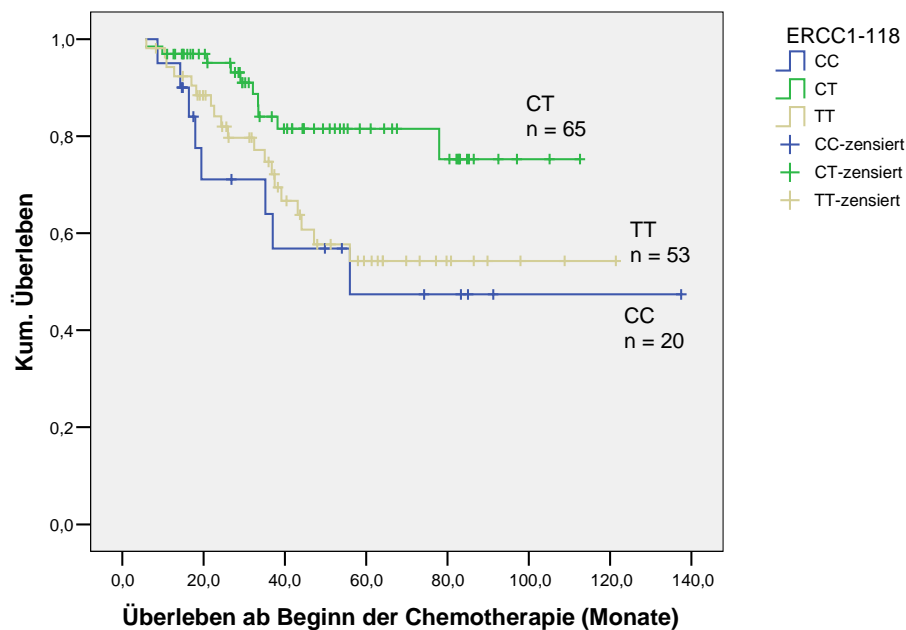


Abbildung 35: ERCC1-118 und tumorabhängiges Überleben bei Patienten ohne Fernmetastasen zum Zeitpunkt der OP ($p = 0,028$)

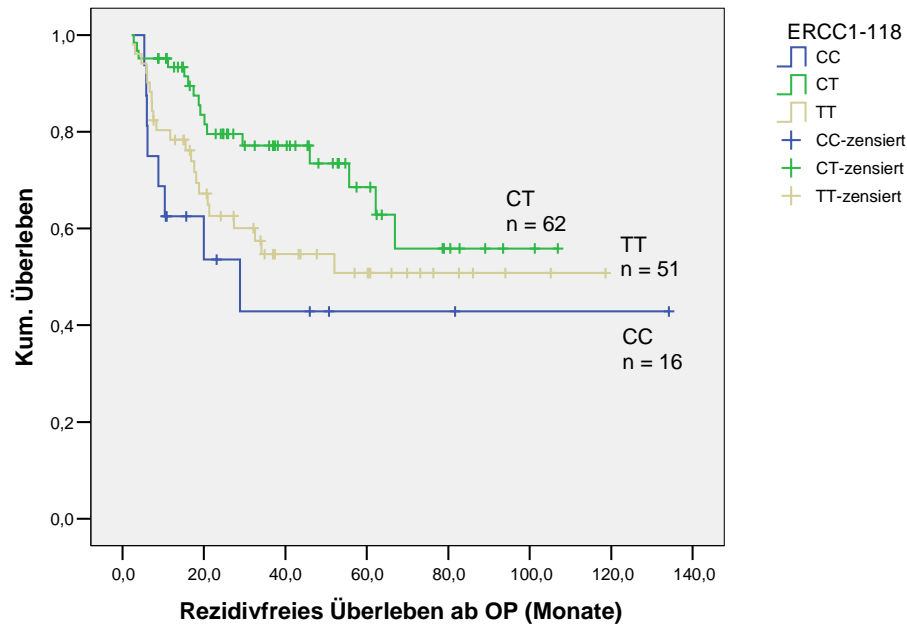


Abbildung 36: ERCC1-118 und rezidivfreies Überleben bei R0-Patienten ohne Fernmetastasen zum Zeitpunkt der OP ($p = 0,041$)

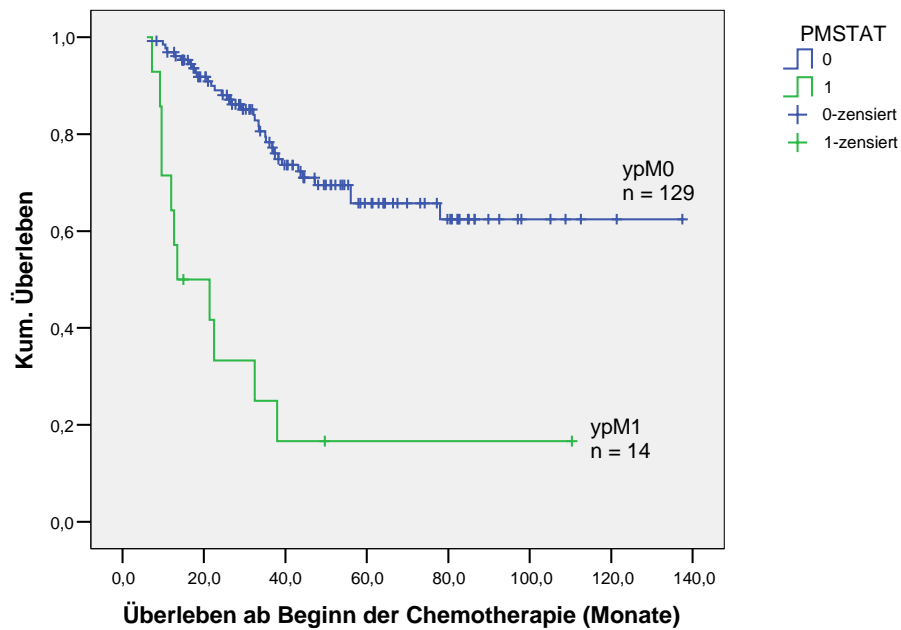


Abbildung 37: R0-Patienten: ypM-Kategorie und tumorabh. Überleben ($p < 0,001$)

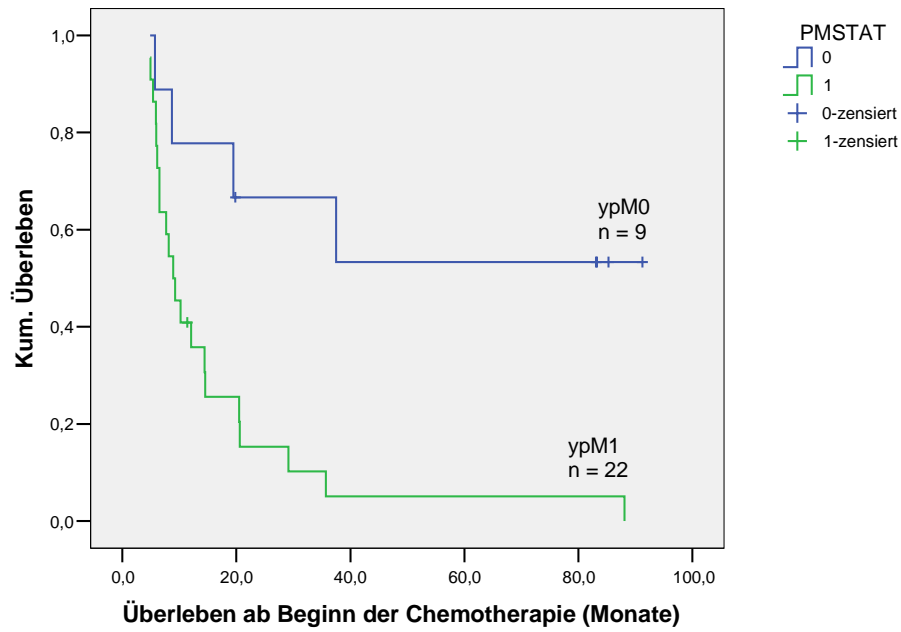


Abbildung 38: R1-Patienten: ypM-Kategorie und tumorabh. Überleben ($p = 0,003$)

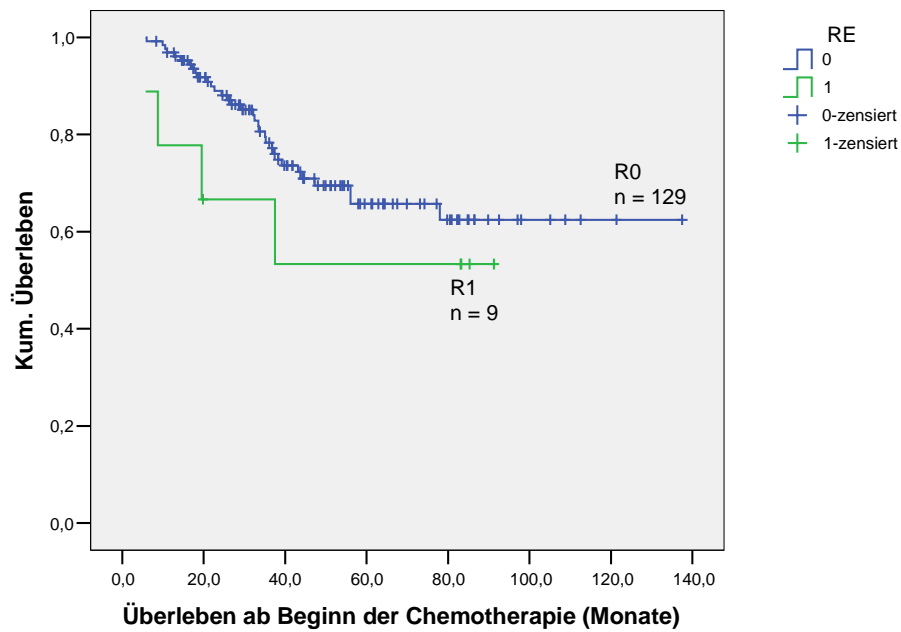


Abbildung 39: ypM0-Patienten: R-Kategorie und tumorabh. Überleben ($p = 0,286$)

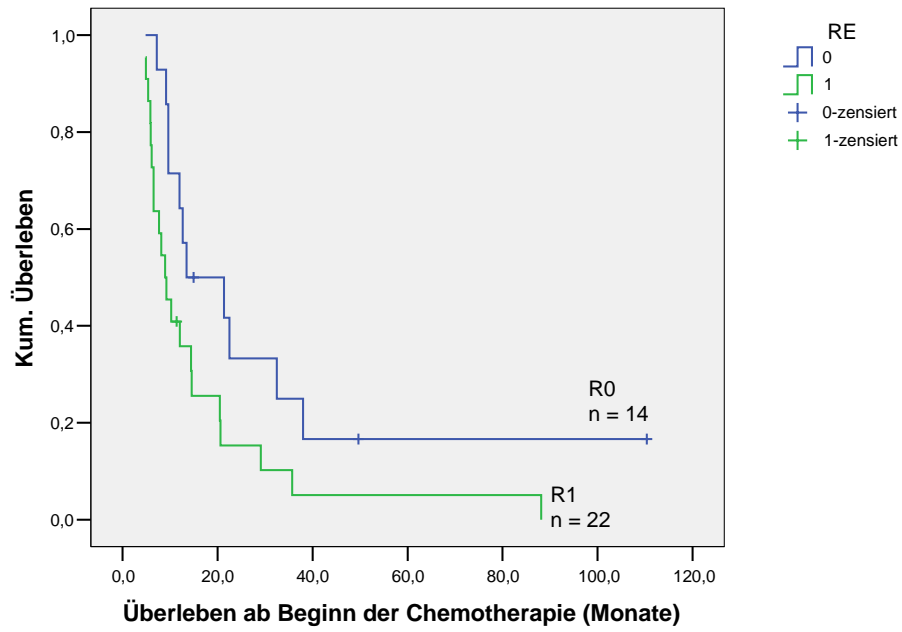


Abbildung 40: ypM1-Patienten: R-Kategorie und tumorabh. Überleben ($p = 0,036$)

5 Diskussion

Der vorliegenden Studie liegt die Hypothese zugrunde, dass konstitutionelle Polymorphismen in DNA-Reparaturgenen der Nukleotidexzisionsreparatur einen Einfluss auf die DNA-Reparaturkapazität dieser Gene haben. Eine verminderte Kapazität der Nukleotidexzisionsreparatur wiederum könnte mit einer besseren Wirksamkeit einer platinhaltigen Chemotherapie und somit auch mit einer besseren Prognose einhergehen.

Wie im Kapitel 1.2.1 erläutert wurde, sind die Helikase ERCC2 und die Exzisionsnuklease XPF-ERCC1 entscheidende Enzyme der Nukleotidexzisionsreparatur. Drei Polymorphismen in den DNA-Reparaturgenen ERCC1 und ERCC2 wurden in dem vorliegenden Patientenkollektiv untersucht. In mehreren Studien konnte bei verschiedenen Tumorentitäten eine Assoziation dieser Polymorphismen mit dem Ansprechen bzw. mit der Prognose nach einer platinhaltigen Chemotherapie gezeigt werden (siehe 1.3). In weiteren Studien konnte eine direkte Assoziation des Polymorphismus ERCC2-751 mit der DNA-Reparaturkapazität der betroffenen Zellen nachgewiesen werden (Kapitel 1.3.3).

Die drei Polymorphismen ERCC1-118, ERCC1-8092 und ERCC2-751 wurden auf ihre prädiktive und prognostische Wertigkeit beim lokal fortgeschrittenen neoadjuvant therapierten Magenkarzinom untersucht.

5.1 Endpunkte

Im Folgenden sollen kurz einige Aspekte der Endpunkte dieser Studie diskutiert werden. Eine Übersicht der Definitionen dieser Endpunkte gibt Tabelle 40 (Kapitel 3.11.1).

5.1.1 Klinische und histopathologische Response

In der vorliegenden Studie zeigen sowohl klinische als auch histopathologische Responder ein hochsignifikant längeres rezidivfreies und tumorabhängiges Überleben als Non-Responder. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Literatur (Fink et al., 1995; Lowy et al., 1999; Ott et al., 2003). Die Ansprechraten (26,0% - 31,3%) liegen eher im unteren Bereich bereits publizierter Daten (Ott, 2004).

Interessant ist, dass immerhin 38 Patienten (21%) bezüglich klinischer und histopathologischer Response diskrepant bewertet wurden (siehe Tabelle 44). Besonders in diesen Fällen stellt sich die Frage, ob möglicherweise ein Parameter dem anderen als Prognosefaktor überlegen ist.

Die klinische Beurteilung des Therapieansprechens beim Magenkarzinom, die auf dem endoskopischen und endosonographischen Befund basiert, ist trotz moderner Diagnostik

problematisch, weil bei dieser nicht bidimensional messbaren Läsion die für die Remissionsbeurteilung definierten Kriterien der WHO nicht angewendet werden können und sie u. a. vom Füllungszustand des Magens und vom Untersucher abhängen (Ott, 2004, S. 12; Siewert et al., 2001a, S. 480).

Genauer und objektiver scheint die histopathologische Response nach Becker (Anteil der vitalen Karzinomzellen im Tumorbett) (Becker et al., 2003) zu sein. Ein zentrifugaler Verlauf der Tumorregression beispielsweise kann dazu führen, dass durch die Entstehung einer zentralen tumorfreien Narbenzone der Tumor zwar schrumpft (*Downshrinking*), es aber wegen vitaler Tumorzellen in der Peripherie nicht zu einem *Downstaging* kommt (Becker et al., 2003).

Zu diesen theoretischen Überlegungen passend stellte sich in dieser Studie die histopathologische gegenüber der klinischen Response als überlegen heraus. In der multivariaten Analyse zeigte sich nämlich eine hochsignifikante Korrelation des histopathologischen Ansprechens mit dem tumorabhängigen Überleben ($p < 0,001$; Patienten ab 1999: $p = 0,005$) und ein stark erhöhtes relatives Sterberisiko der Non-Responder (4,71; Patienten ab 1999: 3,99). Das Risiko, ein Rezidiv zu erleiden, war bei histopathologischen Non-Respondern auf das Fünffache erhöht ($p < 0,001$).

Das bedeutet also, dass in unserem Patientenkollektiv die histopathologische Response eine stärkere Korrelation zur Prognose aufweist und somit einen besseren prognostischen Wert hat, als die klinische Response.

5.1.2 Tumorabhängiges und rezidivfreies Überleben

Es sollen kurz einige Vor- und Nachteile der zwei verwendeten prognostischen Endpunkte erörtert werden.

Das tumorabhängige Überleben bietet den Vorteil, dass es für alle 181 Patienten berechnet werden kann und das Todesdatum einfach zu ermitteln ist. Andererseits können die Werte verzerrt werden durch additive Therapien, die Patienten mit Rezidiv möglicher Weise erhalten und die in unserem Patientenkollektiv nicht erfasst wurden. Problematisch ist ebenfalls, dass die Patienten, welche nicht tumorabhängig versterben, zensiert werden. Davon waren in dieser Studie allerdings nur zwei Patienten betroffen.

Das rezidivfreie Überleben kann bei den Patienten, die ein Rezidiv erleiden, bereits zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt bestimmt werden als das tumorabhängige Überleben. Additive Therapien haben keinen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben, da diese frühestens bei Auftreten eines Rezidivs beginnt. Ein Nachteil ist jedoch, dass Patienten mit mikro- und makroskopischen Residualtumoren (R1 und R2) von vornherein

ausgeschlossen sind. Im Gesamtkollektiv der vorliegenden Studie betrifft dies immerhin 31 Patienten (17,1%).

5.2 Assoziationsstudien

Bei sporadisch auftretenden Karzinomen stellt ein erkrankter Verwandter ersten Grades einen signifikanten Risikofaktor dar. Diese Tatsache spricht dafür, dass der genetischen Konstitution und somit auch den häufig vorkommenden Polymorphismen, nicht nur in sog. „Krebsfamilien“, eine Schlüsselrolle zukommt (Shen et al., 1998).

Es gibt eine große Zahl an retrospektiven Studien, welche den Zusammenhang zwischen den hier untersuchten Polymorphismen und dem Therapieansprechen und der Prognose, untersuchten. Die Ergebnisse sind aus folgenden Gründen jedoch nur schwer zu interpretieren.

Die Assoziationsstudien sind durch viele unterschiedliche Therapieschemata und verschiedene Tumorentitäten nur bedingt untereinander bzw. mit unserer Studie vergleichbar (siehe Tabelle 8, 9 und 11). Denn das Ansprechen auf andere Chemotherapeutika wird wiederum durch andere Gene bzw. Proteine beeinflusst. So spielen beispielsweise die Thymidilatsynthase und die Thymidin Phosphorylase eine wesentliche Rolle beim Ansprechen auf das häufig mit Platinderivaten kombinierte 5-Fluorouracil (Metzger et al., 1998; Ott, 2004). Außerdem ist es auch denkbar, dass ein Polymorphismus unterschiedliche Wirkungen auf verschiedene DNA-Schäden hat (Matullo et al., 2001).

Mit 39 bis 129 eingeschlossenen Patienten waren die untersuchten Kollektive zudem eher klein, wodurch wiederum die Wahrscheinlichkeit für falsch positive und falsch negative Ergebnisse relativ hoch ist. Diese ist umso größer, da der quantitative Effekt eines einzelnen Polymorphismus auf das Ansprechen und die Prognose insbesondere im Vergleich zu anderen klinischen Faktoren eher gering sein dürfte.

Die Studienergebnisse sind außerdem äußerst heterogen und widersprüchlich. Dadurch wurde auch indirekt die statistische Aussagekraft dieser Studie geschwächt. Weil nicht von vornherein klar war, in welcher Weise die Polymorphismen mit dem Ansprechen und dem Überleben assoziiert sind, wurde in alle Richtungen getestet und somit eine große Fülle an Testergebnissen erzeugt. Hinzu kommt noch die Verdopplung der Testergebnisse durch die zusätzliche Untersuchung der konsekutiv erfassten Patientengruppe. Bei wachsender Anzahl statistischer Tests nimmt jedoch die Wahrscheinlichkeit des Fehlers 1. Art zu. Das heißt, dass man signifikante p-Werte erhält, obwohl es eigentlich keinen Zusammenhang zwischen zwei Parametern gibt (Weiß, 2002).

Ein weiterer zu bedenkender Unsicherheitsfaktor ist die Publikationsbias. Darunter versteht man die Tendenz, Studien mit positivem Ergebnis eher zu veröffentlichen, als solche mit negativem und somit vermeintlich uninteressantem Resultat.

Es soll nochmals betont werden, dass eine Assoziationsstudie trotz theoretischer Grundlage keinen kausalen Einfluss der Polymorphismen auf die DNA-Reparaturkapazität beweist. Es ist ebenso möglich, dass diese nur mit anderen genetischen Veränderungen gekoppelt sind, welche letztlich entscheidend sind. Diese Erklärung erscheint sogar wahrscheinlicher, weil es bisher bei keinem der drei Polymorphismen gelang, eindeutig eine funktionelle Relevanz nachzuweisen bzw. plausibel zu machen.

5.3 ERCC1-118

In unserem Patientenkollektiv wurde eine Frequenz des C-Allels von ca. 0,38 beobachtet, was ungefähr den Angaben in der Literatur entspricht (ca. 0,40 in der weißen Bevölkerung) (Matullo et al., 2005; Zhou et al., 2005). Die Häufigkeiten der Genotypen waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p = 0,62$).

5.3.1 ERCC1-118 und Ansprechen auf die Chemotherapie

In Bezug auf das Therapieansprechen zeigte sich weder im Gesamtkollektiv noch in der konsekutiv erfassten Patientengruppe (ab 1999) ein signifikanter Zusammenhang mit dem ERCC1-118-Genotyp. Zwar war die klinische Responserate des CC-Genotyps mit 41,7% (Patienten ab 1999: 44,4%) überdurchschnittlich hoch, aufgrund der geringen Patientenzahl (10 bzw. 8) war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant (CC vs. CT+TT: $p = 0,174$; Patienten ab 1999: 0,054).

Mehrere Studien zeigten eine positive Korrelation des T-Allels mit einer besseren Ansprechrate auf eine platinbasierte Chemotherapie (siehe Tabelle 8): Viguiet et al. fanden eine signifikant höhere Responserate bei Kolonkarzinompatienten mit mindestens einem T-Allel (Viguiet et al., 2005). Steffensen et al. konnten bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom und einem ERCC1-118-TT-Genotyp eine bessere Responserate nachweisen. Liu untersuchte diesen Zusammenhang bei Melanompatienten, die eine Chemotherapie aus Cisplatin, Vinblastin, Dacarbazin, IL-2, IFN- α \pm Tamoxifen erhielten (Liu et al., 2005). Auch er konnte wie Viguiet bei Patienten mit mindestens einem T-Allel ein signifikant besseres Ansprechen feststellen.

Ähnlich den Ergebnissen der vorliegenden Studie konnten Ruzzo et al. bei 175 adjuvant therapierten Magenkarzinompatienten keine signifikante Assoziation zwischen dem Polymorphismus ERCC1-118 und dem Ansprechen finden (Ruzzo et al., 2006). Auch in

einer Studie mit 109 chemotherapierten Lungenkarzinompatienten wurde keine Assoziation des Polymorphismus auf das Therapieansprechen beobachtet (Ryu et al., 2004).

Su hingegen fand bei 110 NSCLC-Patienten mit dem Genotyp ERCC1-118-CC eine signifikant höhere Responderate im Gegensatz zum CT-Genotyp (Su et al., 2007).

In Anbetracht der heterogenen Literaturangaben und den Ergebnissen dieser Studie erscheint eine relevante Assoziation zwischen dem Polymorphismus ERCC1-118 und dem Ansprechen von Magenkarzinomen auf eine platinbasierte Chemotherapie unwahrscheinlich.

5.3.2 ERCC1-118 und Prognose

Trotz fehlender Assoziation zwischen ERCC1-118 und dem Therapieansprechen wurde in dieser Studie eine Korrelation zwischen ERCC1-118 und der Prognose gefunden.

Es zeigte sich in der konsekutiv erfassten Gruppe ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben bei Patienten mit dem heterozygoten Genotyp ERCC1-118-CT ($p = 0,021$). Dieser Zusammenhang erreichte im Gesamtkollektiv allerdings nicht das Signifikanzniveau ($p = 0,060$). In der univariaten Coxregression lag für ERCC1-118-CT-Träger das relative Risiko eines Rezidivs bei 0,52 (0,26 – 1,04; $p = 0,050$). Beim tumorabhängigen Überleben war dieser Zusammenhang nicht signifikant ($p = 0,084$; Patienten ab 1999: $p = 0,229$). Zudem zeigte sich besonders beim rezidivfreien Überleben folgender Effekt (siehe Abbildung 28): Die zunächst in relativ großem Abstand verlaufenden CT- und TT-Kurven nähern sich nach 70 Monaten gänzlich an. Man kann also nicht von der Beobachtung eines Langzeiteffekts sprechen.

Die multivariate Analyse nach Wald zeigte jedoch eine deutliche und signifikante Assoziation zwischen ERCC1-118 und der Prognose. Neben zehn relevanten klinischen und histopathologischen Parametern wurden die drei Polymorphismen im Cox-Modell einbezogen (siehe 4.2.5).

Im Gesamtkollektiv zeigte sich ein relatives tumorabhängiges Sterberisiko von 0,39 (95%-CI = 0,23 – 0,66) der CT-Träger gegenüber den TT-Trägern ($p = 0,001$). In der konsekutiv erfassten Patientengruppe lag das relative Risiko der CT-Träger bei 0,48 (95%-CI = 0,23 – 0,97, $p = 0,041$). Das relative Rezidivrisiko betrug im Gesamtkollektiv für CT-Träger 0,50 (95%-CI = 0,28 – 0,89, $p = 0,019$) und in der konsekutiv erfassten Patientengruppe 0,29 (95%-CI = 0,13 – 0,62, $p = 0,002$).

Da der multivariat signifikanteste Faktor die ypM-Kategorie war, wurde zusätzlich univariat die Assoziation zwischen ERCC1-118 und der Prognose bei den Patienten

untersucht, bei denen zum Zeitpunkt der OP keine Fernmetastasen bekannt waren. Dadurch wird die ypM-Kategorie als prognostischer Faktor ausgeschlossen.

Es war ein signifikant positiver Effekt des CT-Genotyps in dieser Untergruppe festzustellen (siehe Abbildung 35 und Abbildung 36). Jedoch zeigte sich auch hier, dass sich die Rezidivraten nach etwa 70 Monaten stark annäherten. Dies lässt vermuten, dass sich auch das tumorabhängige Überleben nach längerer Beobachtungszeit weiter angleicht. Daher wäre eine Überprüfung dieser Ergebnisse zu einem späteren Zeitpunkt sinnvoll. In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, welche die Assoziation von ERCC1-118 und der Prognose nach einer platinbasierten Chemotherapie bei verschiedenen Tumoren untersuchten (Tabelle 8).

Während de las Penas und Zhou keine Korrelation zwischen ERCC1-118 und der Prognose von Patienten mit nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen nach einer platinbasierten Chemotherapie feststellten, fanden Isla und Ryu eine Assoziation des CC-Genotyps mit einem besseren Überleben (de Las Penas et al., 2006; Isla et al., 2004; Ryu et al., 2004; Zhou et al., 2004). Park und Stoehlmacher konnten diesen positiven Effekt des CC-Genotyps bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen beobachten (Park et al., 2003; Stoehlmacher et al., 2004).

Im Gegensatz dazu fand Liu in einer Studie mit 90 Melanompatienten einen ungünstigen Einfluss des CC-Genotyps auf das Ansprechen und die Prognose (Liu et al., 2005). Allerdings wurden diese Patienten neben Cisplatin zusätzlich mit Vinblastin, Dacarbazin, Interleukin-2, IFN- α und teilweise mit Tamoxifen behandelt.

In den zwei Studien von Ruzzo und Steffensen wurde kein Zusammenhang zwischen der Prognose von adjuvant chemotherapierten Magenkarzinompatienten bzw. Ovarialkarzinompatienten und ERCC1-118 festgestellt (Ruzzo et al., 2006; Steffensen et al., 2007).

Dies ist die erste Studie, welche eine Assoziation des heterozygoten ERCC1-118-Genotyps mit der Prognose zeigte. In der Regel wurde ein homozygoter Genotyp mit den zusammengefassten anderen beiden Genotypen verglichen, in unserem Fall z. B. CC vs. CT+TT. Dies erscheint dann sinnvoll, wenn man davon ausgeht, dass der Polymorphismus einen direkten Einfluss ausübt, es also einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und dem Überleben der Patienten gibt. Dies kann mit dieser Studie und auch mit anderen Assoziationsstudien jedoch nicht beantwortet werden.

Der Polymorphismus ERCC1-118 verändert weder die Aminosäuresequenz, noch liegt er an einer regulatorischen Bindungsstelle oder in einer Spliceregion (Shen et al., 1998;

Stoehlmacher et al., 2004). Es liegt zudem keine Studie vor, welche direkt die Funktion des Polymorphismus ERCC1-118 untersucht. Es bleibt also die Frage offen, in welcher Weise dieser Polymorphismus Einfluss auf die DNA-Reparaturkapazität nehmen könnte.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass Kopplungseffekte mit anderen genetischen Varianten eine Rolle spielen. Damit ließe sich auch die Assoziation mit einem heterozygoten Genotyp erklären. Es erscheint daher sinnvoll, an Stelle von einzelnen Polymorphismen eine Vielzahl von Polymorphismen zu genotypisieren und dann Kombinationen von Polymorphismen bzw. Haplotypen zu untersuchen.

Ein Schritt in diese Richtung wurde in dieser Studie gemacht. Mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode und den Daten der Genotypisierung wurde auf die jeweils wahrscheinlichsten Haplotypen eines Patienten geschlossen. In der univariaten Analyse wurde eine Assoziation zwischen Patienten mit mindestens einem CCA-Haplotyp (n = 34) und einem schlechteren rezidivfreien Überleben gefunden. Dieses Resultat ist allerdings sehr zurückhaltend zu interpretieren, da es sich nur um eine Schätzung der Haplotypwahrscheinlichkeiten handelt und somit ein zusätzlicher Unsicherheitsfaktor gegeben ist.

Da es einerseits eine Assoziation des heterozygoten ERCC1-118-Genotyps (CT) mit einer günstigen Prognose, andererseits jedoch keine signifikante Korrelation zwischen ERCC1-118 und der klinischen Ansprechrate auf die Chemotherapie gab, stellt sich auch die Frage, ob diese Beobachtungen tatsächlich auf eine veränderte DNA-Reparaturkapazität zurückzuführen sind.

Lediglich zwei kleine Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen ERCC1-118 und der ERCC1-mRNA-Konzentration und kamen zu konträren Ergebnissen (siehe auch unten). In einer Studie war das T-Allel mit einer erhöhten mRNA-Konzentration assoziiert (Park et al., 2002), in der anderen war das T-Allel mit verminderter mRNA-Konzentration und geringerer DNA-Reparaturkapazität assoziiert (Yu et al., 2000).

Möglicherweise lässt sich die fehlende Übereinstimmung des Einflusses auf die Prognose und auf das Therapieansprechen auch durch die Tatsache erklären, dass das histopathologische und das klinische Ansprechen lediglich die makroskopische Wirkung auf den Tumor (*Downshrinking*) widerspiegelt. Nicht erfasst werden hingegen molekulare und zelluläre Veränderungen (und damit beispielsweise auch die systemische Wirkung auf Mikrometastasen), welche entscheidend zur Prognose beitragen können.

Dass antitumoröse Substanzen zwar einen positiven prognostischen Effekt jedoch keine oder nur eine geringe Wirkung auf die Tumorregression haben können, zeigt beispielhaft

der orale Multikinase-Inhibitor Sorafenib (Michaelis and Ratain, 2006). Trotz einer geringen Responderate von nur 2% (partielle Response = mindestens 50% Tumorregression), zeigte sich bei Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom ein progressionsfreies Überleben von 23 vs. 6 Wochen ($p = 0,0001$).

Es ist auch denkbar, dass es sich beim Genotyp ERCC1-118-CT um einen von der Chemotherapie unabhängigen Prognosefaktor handelt. Dies müsste allerdings durch einen Vergleich mit einem Patientenkollektiv verglichen werden, welches nicht neoadjuvant chemotherapiert wurde.

Madhusudan und Middleton geben außerdem zu bedenken, dass Studien, welche Assoziationen von Polymorphismen mit dem Ansprechen und der Prognose nach einer Chemotherapie untersuchen, dadurch kompliziert werden, dass protoxische und promutagene Effekte einen gegensätzlichen Effekt auf die Prognose haben können. Eine verringerte DNA-Reparaturkapazität kann zwar zu einem besseren Ansprechen auf die Chemotherapie führen (protoxisch), andererseits kann sie aber auch durch eine höhere Mutationsrate zu einem tumorbiologisch aggressiverem Tumor (promutagen) und damit zu einer schlechteren Prognose führen (Madhusudan and Middleton, 2005). In diesem Sinne könnte der heterozygote Genotyp also der prognostisch ideale Mittelweg sein.

Wenn man jedoch davon ausgeht, dass der Polymorphismus ERCC1-118 mit der DNA-Reparaturkapazität bzw. mit der ERCC1-mRNA-Konzentration assoziiert ist, so stellt sich die Frage, ob dies tatsächlich einen Einfluss auf das Ansprechen bzw. die Prognose nach einer platinhaltigen Chemotherapie hat. Hierzu gibt es unterschiedliche Studienergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass Substanzen, welche die ERCC1-Expression runterregulieren, ebenso die Reparatur cisplatininduzierter DNA-Schäden vermindern und die Platinsensitivität der betroffenen Zellen erhöhen (Reed, 2005). Bei Patienten mit Lungenkarzinom, kolorektalem Karzinom und Ösophaguskarzinom konnte der prognostisch günstige Effekt niedriger ERCC1-mRNA-Konzentrationen gezeigt werden (Joshi et al., 2005; Lord et al., 2002; Shirota et al., 2001). In einer randomisierten prospektiven Studie teilten Cobo et al. NSCLC-Patienten in zwei Gruppen ein: Die Kontrollgruppe ($n = 141$) erhielt stets Cisplatin und Docetaxel, ohne die mRNA-Konzentration zu messen. Die zweite Gruppe ($n = 225$) erhielt nur bei niedriger Tumor-ERCC1-mRNA-Konzentration gezielt eine Chemotherapie mit Cisplatin und Docetaxel ($n = 129$) und bei hoher Konzentration eine Therapie mit Gemcitabin und Docetaxel, d. h. also keine platinbasierte Chemotherapie ($n = 96$). Mit diesem „maßgeschneiderten“ Ansatz

konnte eine signifikant bessere Responserate erzielt werden, welche sich auch tendenziell allerdings nicht signifikant im Überleben niederschlug (Cobo et al., 2007).

Eine Gruppe konnte ein besseres Ansprechen auf eine platinbasierte Chemotherapie bei Ösophaguskarzinompatienten mit einem niedrigen Quotienten aus Tumor-ERCC1-mRNA und ERCC1-mRNA in Normalgewebe beobachten (Warnecke-Eberz et al., 2004). Langer et al. dagegen stellten bei Patienten mit Adenokarzinomen des Ösophagus weder eine Korrelation mit dem Ansprechen noch mit der Prognose fest (Langer et al., 2005). Lediglich zwei kleinere Studien untersuchten diesen Zusammenhang beim Magenkarzinom. Metzger et al. beobachteten eine Assoziation niedriger ERCC1-mRNA-Spiegel mit gutem Ansprechen und guter Prognose (Metzger et al., 1998). Napieralski et al. konnten diesen Zusammenhang jedoch nicht feststellen (Napieralski et al., 2005).

Insgesamt ist also die Datenlage zur Frage, ob der Polymorphismus ERCC1-118 mit der Prognose von Magenkarzinompatienten nach einer platinbasierten Chemotherapie assoziiert ist und vor allem aus welchem Grund, lückenhaft und widersprüchlich. Aufgrund dessen sollte die Aussagekraft des Ergebnisses dieser Studie, nämlich die Assoziation des Genotyps ERCC1-118-CT mit einer günstigen Prognose, zurückhaltend bewertet werden.

Zunächst wäre ein Vergleich mit einem nicht chemotherapierten Patientenkollektiv sinnvoll, um zu prüfen, ob der prognostische Wert von ERCC1-118 tatsächlich an die Chemotherapie gekoppelt ist. Letztendlich sind prospektive Studien, welche mehrere Polymorphismen und Haplotypen auf dem Chromosom 19 (Träger u. a. von ERCC1 und ERCC2) untersuchen, nötig, um ERCC1-118 als unabhängigen Prognosemarker etablieren zu können.

5.3.3 ERCC1-118 und klinische und histopathologische Parameter

Von allen klinischen und histopathologischen Parametern hatte nur das Diagnosealter eine statistisch signifikante Korrelation zu ERCC1-118 (siehe 5.3.3.1).

Da das Diagnosealter jedoch weder signifikant mit dem Therapieansprechen noch mit dem Überleben assoziiert ist (siehe 4.1.24.1.3), bleiben davon Korrelationen zwischen ERCC1-118 auf der einen und dem Therapieansprechen und der Prognose auf der anderen Seite unbeeinflusst.

5.3.3.1 ERCC1-118 und Diagnosealter

Interessanterweise waren Patienten mit dem Genotyp ERCC1-118-CC bei Diagnosestellung signifikant jünger. Das durchschnittliche Alter liegt bei dieser

Patientengruppe ($n = 24$) bei 51,03 Jahren, bei den CT-Trägern bei 56,01 Jahren und bei den TT-Trägern bei 57,22 Jahren ($p = 0,037$).

Eine hypothetische Erklärung hierfür wäre, dass der Genotyp CC mit einer schlechteren Reparaturkapazität assoziiert ist und sich so karzinogene Mutationen früher manifestieren können. Dafür würde eine Studie von Park et al. sprechen, in der bei kolorektalen Karzinomen ($n = 31$) eine Assoziation des T-Allels mit höheren intratumoralen ERCC1-mRNA-Konzentrationen festgestellt wurde, die jedoch aufgrund geringer Fallzahlen statistisch nicht besonders aussagekräftig erscheint (Park et al., 2002).

Konträr dazu steht ein Vergleich von Zelllinien, die sich im ERCC1-118-Genotyp unterscheiden. Hier gab es Hinweise auf eine Korrelation des ERCC1-118-T-Allels mit verminderten ERCC1-mRNA-Konzentrationen und reduzierter Reparaturkapazität (Yu et al., 2000). Doch ist auch dieser Vergleich unterschiedlicher Zelllinien kritisch zu bewerten, da diese sich möglicherweise noch in anderen relevanten Eigenschaften unterscheiden und die Fallzahl ebenfalls gering ist.

Eine Assoziation des Erkrankungsalters von Magenkarzinompatienten mit dem Polymorphismus ERCC1-118 wird in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben. Daten hierzu liegen weder zum Magenkarzinom noch zu anderen Tumorentitäten vor.

5.4 ERCC1-8092

Wie ERCC1-118 war auch ERCC1-8092 im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p = 0,34$) und lag mit einer A-Allelfrequenz von 0,26 in dem Bereich anderer veröffentlichter Studienergebnisse (ca. 0,25) (Wrensch et al., 2005; Zhou et al., 2005).

5.4.1 ERCC1-8092 und Ansprechen auf die Chemotherapie

Eine statistisch signifikante Assoziation ergab sich in der konsekutiv erfassten Gruppe beim Vergleich der klinischen Responderaten (AA vs. AC+CC, $p = 0,036$). Die klinische Responderate der Patienten mit ERCC1-8092-AA-Genotyp war hier mit 5 von 9 (55,5%) außergewöhnlich hoch. Aufgrund der kleinen Patientenzahl ist dieses Ergebnis jedoch zurückhaltend zu bewerten. Entsprechende Vergleichsdaten liegen derzeit in der Literatur nicht vor.

5.4.2 ERCC1-8092 und Prognose

Im Gesamtkollektiv war der ERCC1-8092-Genotyp signifikant mit dem rezidivfreien Überleben korreliert ($p = 0,015$). Die heterozygote Variante AC stellte sich dabei gegenüber CC als prognostisch günstig heraus (rel. Risiko 0,55; 0,31 – 0,99). Diese

Assoziation war jedoch in der konsekutiv erfassten Gruppe nicht signifikant ($p = 0,096$). Dieses Ergebnis entspricht der günstigen Prognose des CT-Genotyps von ERCC1-118 (5.3.2), und wird dadurch verständlich, dass beide Polymorphismen aufgrund ihrer räumlichen Nähe auf dem Chromosom 19 hochsignifikant ($p < 0,001$) miteinander assoziiert sind. Das tumorabhängige Überleben hingegen war nicht signifikant mit dem ERCC1-8092-Genotyp korreliert.

Zwei Studien befassten sich mit der Assoziation zwischen ERCC1-8092 und dem Überleben nach einer platinhaltigen Chemotherapie (Tabelle 9, Kapitel 1.3.2). Während Park keine signifikante Korrelation beim kolorektalen Karzinom feststellen konnte (Park et al., 2003), zeigte sich in Zhous Studie bei Patienten mit nicht kleinzelligem Lungenkarzinom und dem CC-Genotyp ein signifikant besseres Überleben (Zhou et al., 2004). Diese Resultate stimmen also nicht mit den Ergebnissen dieser Studie überein.

Ähnlich wie bei ERCC1-118 (siehe 5.3.2) ist auch die Assoziation von ERCC1-8092 mit der Prognose vorsichtig zu interpretieren, insbesondere da nur wenige und heterogene Daten hierzu existieren.

5.4.3 ERCC1-8092 und klinische und histopathologische Parameter

Es gab keine signifikante Korrelation zwischen den ERCC1-8092-Genotypen und klinischen und histopathologischen Parametern.

5.4.3.1 ERCC1-8092 und Diagnosealter

Analog zu ERCC1-118 zeigte sich eine nicht signifikante Assoziation ($p = 0,114$) zwischen einem jungen Diagnosealter und dem ERCC1-8092-Genotyp AA (AA vs. AC vs. CC: 50,50 vs. 55,04 vs. 56,97 Jahre).

Während es keine veröffentlichten Ergebnisse für das Magenkarzinom gibt, fanden Chen et al. bei 122 Patienten ein signifikant früheres Auftreten von Glioma bei Patienten mit dem Genotyp ERCC1-8092-CC (Chen et al., 2000).

5.5 ERCC2-751

Der Polymorphismus ERCC2-751, C. 2251 A>C, Lys751Gln trat mit einer C-Allelfrequenz von 0,43 auf. Die Auswertung von neun Studien ergab in der gesunden weißen Bevölkerung eine durchschnittliche Frequenz von 0,36 (0,29 – 0,42) (siehe 1.3.3).

Die Tatsache, dass die Genotypen nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht waren, könnte entweder durch eine studienbedingte Bias verursacht sein oder dadurch, dass bestimmte Genotypen ein erhöhtes Magenkrebsrisiko mit sich bringen. Eine Studie mit 281

Magenkarzinompatienten und 390 Kontrollen zeigte allerdings keine signifikante Korrelation zwischen ERCC2-751 und dem Magenkrebsrisiko (Huang et al., 2005).

5.5.1 ERCC2-751 und Ansprechen auf die Chemotherapie

In unserem Patientenkollektiv ergab sich keine signifikante Assoziation zwischen dem klinischen oder histopathologischen Ansprechen und dem ERCC2-751-Genotyp.

Es gibt Studienergebnisse, welche bei Lungenkarzinompatienten ebenfalls keinen Zusammenhang zeigten (Camps et al., 2003; Ryu et al., 2004). Sakano konnte auch bei Blasenkarzinompatienten, welche mit einer platinbasierten Radiochemotherapie behandelt wurden keinen Zusammenhang zwischen ERCC2-751 und der Responderate feststellen (Sakano et al., 2006). In einer Studie mit Kolonkarzinompatienten war hingegen der AA-Genotyp mit einem besseren Ansprechen assoziiert (Park et al., 2001).

Die Frage einer Assoziation zwischen ERCC2-751 und dem Ansprechen des Magenkarzinoms auf eine platinhaltige Chemotherapie kann anhand dieser Datenlage nicht beantwortet werden. Die klinische Relevanz scheint jedoch gering zu sein.

5.5.2 ERCC2-751 und Prognose

In Bezug auf das rezidivfreie Überleben zeigte sich beim Vergleich des Genotyps AC mit den beiden homozygoten Genotypen eine signifikante Korrelation des heterozygoten ERCC2-751-Genotyps ($p = 0,024$; Patienten ab 1999: $p = 0,043$). In der univariaten Coxregression lag das relative Rezidivrisiko im Gesamtkollektiv bei 2,39 (1,13 – 5,05) ($p = 0,054$). In der konsekutiv ab 1999 erfassten Patientengruppe war diese Tendenz nicht mehr signifikant (rel. Risiko 1,66; 0,73 – 3,76; $p = 0,129$).

Auch die Prognose bezüglich des tumorabhängigen Überlebens ist bei den Patienten mit dem Genotyp AC am ungünstigsten. Die Unterschiede sind hier allerdings nicht signifikant.

Mindestens acht Studien untersuchten die Assoziation zwischen dem Polymorphismus ERCC2-751 und der Prognose nach einer platinhaltigen Chemotherapie (siehe Tabelle 11). De las Penas fand bei 135 Patienten mit nicht kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) und dem homozygoten CC-Genotyp ein erhöhtes Risiko zu versterben (OR = 2,02; CI95% = 0,99–4,09).

Drei kleinere ähnliche Studien konnten bei NSCLC-Patienten jedoch keine signifikante Korrelation mit dem Überleben feststellen (Camps et al., 2003; Isla et al., 2004; Ryu et al., 2004). Auch Sakano und Liu konnten bei Blasenkarzinom- bzw. Magenkarzinompatienten

keinen Einfluss des ERCC2-751-Genotyps auf das Überleben erkennen (Liu et al., 2007; Sakano et al., 2006).

Zwei weitere Studien untersuchten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom den Zusammenhang zwischen ERCC2-751 und Ansprechen und Überleben nach Therapie mit Oxaliplatin und 5-Fluorouracil (5-FU) (Park et al., 2001; Stoehlmacher et al., 2004). Bei Park stellte sich der homozygote AA-Genotyp als besonders günstig sowohl für die Response als auch für das Überleben heraus (Park et al., 2001). Im Einklang dazu hatten in der Studie von Stoehlmacher Patienten mit dem CC-Genotyp ein erhöhtes Sterberisiko (OR CC vs. AA = 3,33; CI = 1,39-7,99) (Stoehlmacher et al., 2004).

Ob ERCC2-751 eine durch den Aminosäureaustausch bedingte funktionelle Bedeutung hat ist nicht klar. Zumindest liegt der Polymorphismus nicht in einer der sieben DNA-Helikase-Domänen (Shen et al., 1998) und die betroffene Aminosäure ist evolutionär sehr variabel, was eher auf eine niedrige funktionelle Relevanz hindeutet (Clarkson and Wood, 2005). Da ERCC2-751 in der carboxyterminalen Domäne und damit in der p53-Bindungsregion des Gens liegt, könnte er einen modulierenden Effekt beispielsweise auf die Regulation der Apoptose oder Seneszenz und somit auf das Ansprechen auf die Chemotherapie haben (Roninson, 2002; Seker et al., 2001). Seker et al. konnten allerdings zumindest keinen Einfluss des SNP auf die Bindungskapazität feststellen.

Eine Reihe von Studien hat die Assoziation zwischen dem Polymorphismus ERCC2-751 und der DNA-Reparaturkapazität (DRC) untersucht und kam zu unterschiedlichen Ergebnissen (Tabelle 10).

Zwei Studien fanden einen Zusammenhang zwischen dem C-Allel (Gln) bzw. den homozygoten CC-Genotyp und einer erhöhten DRC (Lunn et al., 2000; Moller et al., 2000).

Demgegenüber stehen elf Autoren, welche umgekehrt signifikante Assoziationen der Genotypen AA und AC mit einer besseren Reparatur beobachteten. In sieben dieser Studien zeigte sich eine derartige Korrelation allerdings nur in Untergruppen des gesamten Patientenkollektivs. In sechs Studien wurden keine signifikanten Korrelationen zwischen ERCC2-751 und der DNA-Reparaturkapazität beobachtet. Huang et al. untersuchten den Einfluss des Polymorphismus auf das Magenkrebsrisiko in einer polnischen Fall-Kontroll-Studie, konnten diesen jedoch nicht feststellen (Huang et al., 2005).

Wie auch bei den anderen in dieser Studie untersuchten Polymorphismen scheint ein Einfluss durch die Assoziation mit weiteren Polymorphismen bzw. Haplotypen wahrscheinlicher. Wie oben dargestellt, spricht die Mehrzahl der Studien für eine

Assoziation des AA-Genotyps bzw. des A-Allels mit einer besseren DNA-Reparaturkapazität. Daraus lässt sich jedoch nicht zwangsläufig ableiten, dass die Patienten mit diesem Genotyp schlechter auf eine Chemotherapie ansprechen und somit eine schlechtere Prognose aufweisen. Die erhöhte DNA-Reparaturkapazität könnte auch zu einem weniger aggressiven Tumor führen, der sich wiederum besser behandeln lässt bzw. therapieunabhängig eine bessere Prognose aufweist. Zudem muss man bedenken, dass die oben erwähnten funktionellen Studien sehr unterschiedliche Methoden verwendeten und unterschiedlichste Patientenkollektive untersuchten, wodurch sie schwer vergleichbar sind. So wurde z. B. in keiner Studie eine platinhaltige Chemotherapie als DNA-Schädigungsmechanismus verwendet.

Die vorliegende Studie konnte eine prognostische Bedeutung des Polymorphismus ERCC2-751 bei neoadjuvant platinbasiert therapierten Magenkarzinompatienten nicht zeigen.

5.5.3 ERCC2-751 und klinische und histopathologische Parameter

Zwischen ERCC2-751 und den klinischen und histopathologischen Parametern ergab sich keine signifikante Korrelation.

5.6 ypM-Kategorie und Residualtumorstatus

Erwartungsgemäß korrelierten die ypTNM-Kategorien und der Residualtumorstatus univariat hochsignifikant mit dem tumorabhängigen und dem rezidivfreien Überleben (siehe Tabelle 46). Multivariat erwies sich in drei von vier Analysen die ypM-Kategorie als der prognostisch wichtigste Faktor. Der Residualtumorstatus hingegen wurde nur in der Analyse des tumorabhängigen Überlebens in der konsekutiv erfassten Patientengruppe in das Cox-Modell aufgenommen. Dass dieser von der Methode „schrittweise-vorwärts“ nach Wald in den drei anderen Fällen nicht in das multivariate Cox-Modell aufgenommen wurde, liegt wahrscheinlich darin begründet, dass beide Parameter stark interkorreliert sind und in diesem Fall nur die signifikantere von beiden ausgewählt wird.

Bei festgelegter ypM-Kategorie (ypM0 oder ypM1) beeinflusste die R0-Resektion zwar das tumorabhängige Überleben positiv, allerdings nur relativ schwach ($p = 0,286$ bzw. $p = 0,036$)(siehe Abbildung 39 und Abbildung 40). Das Vorliegen von Fernmetastasen (ypM1) war jedoch sowohl bei den R0- als auch bei den R1-Patienten hochsignifikant mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert ($<0,001$ bzw. $0,003$). Insgesamt erwies sich in dieser Studie also die ypM-Kategorie für die Prognose als bedeutender als der Residualtumorstatus.

In der 10-Jahresanalyse der deutschen Magenkarzinomstudie wurden bei 1654 primär chirurgisch behandelten Patienten multivariat folgende Parameter als stärkste prognostische Faktoren identifiziert: die Lymphknotenratio (in dieser Studie nicht erfasst), der Residualtumorstatus, die pT-Kategorie, postoperative Komplikationen (in dieser Studie nicht erfasst). Erst an fünfter Stelle folgte die pM-Kategorie (Siewert et al., 1998). Allerdings ist zu beachten, dass diese Patienten nicht neoadjuvant therapiert wurden und somit nicht direkt vergleichbar sind.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob drei Polymorphismen der Nukleotidexzisionsreparatur-Gene ERCC1-118, ERCC1-8092 und ERCC2-751 mit der Prognose und dem Therapieansprechen auf eine platinbasierte neoadjuvante Chemotherapie von 181 Magenkarzinompatienten korrelieren. Frühere Studien konnten diesen Zusammenhang bereits bei verschiedenen Karzinomen zeigen.

In dem Patientenkollektiv dieser Studie zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Polymorphismen und dem Ansprechen auf die platinbasierte Chemotherapie. Zwischen der Prognose und dem Polymorphismus ERCC1-118 konnte jedoch eine statistische Korrelation gezeigt werden. Während in der univariaten Analyse kein eindeutiger Zusammenhang zu sehen war, konnte in der multivariaten Analyse ein signifikant längeres rezidivfreies und tumorabhängiges Überleben der Patienten mit dem heterozygoten Genotyp ERCC1-118-CT festgestellt werden.

Ob sich ERCC1-118 als Prognosemarker eignet, kann aufgrund der aktuellen Datenlage nicht beantwortet werden. Denn zum einen sind die vorliegende wie auch sämtliche anderen Studien, die diesen Zusammenhang untersuchten, retrospektiv. Zum anderen sind die Ergebnisse der verschiedenen Studien heterogen und teils widersprüchlich. Dies ist außerdem die erste Studie, in der eine Korrelation des heterozygoten ERCC1-118-Genotyps mit der Prognose gezeigt wurde. Über eine kausale Erklärung hierfür kann derzeit nur spekuliert werden.

Ein Vergleich mit einem nicht chemotherapierten Patientenkollektiv könnte die Frage klären, ob ERCC1-118 einen mit der Chemotherapie gekoppelten oder von ihr unabhängigen prognostischen Faktor darstellt. Zur Etablierung von ERCC1-118 als Prognosemarker bei neoadjuvant chemotherapierten Magenkarzinompatienten bedarf es jedoch weiterer unabhängiger Studien.

7 Literaturverzeichnis

- Affatato, A. A., Wolfe, K. J., Lopez, M. S., Hallberg, C., Ammenheuser, M. M., and Abdel-Rahman, S. Z. (2004). Effect of XPD/ERCC2 polymorphisms on chromosome aberration frequencies in smokers and on sensitivity to the mutagenic tobacco-specific nitrosamine NNK. *Environ Mol Mutagen* **44**, 65-73.
- Altaha, R., Liang, X., Yu, J. J., and Reed, E. (2004). Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance. *Int J Mol Med* **14**, 959-70.
- Au, W. W., Salama, S. A., and Sierra-Torres, C. H. (2003). Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Perspect* **111**, 1843-50.
- Becker, K., Mueller, J. D., Schulmacher, C., Ott, K., Fink, U., Busch, R., Bottcher, K., Siewert, J. R., and Hofler, H. (2003). Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* **98**, 1521-30.
- Bertz, J., Giersiepen, K., Haberland, J., Hentschel, S., Kaatsch, P., Katalinic, A., Stabenow, R., Stegmaier, C., and Ziegler, H. (2006). "Krebs in Deutschland," 5/Ed. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut, Saarbrücken.
- Broker, L. E., Kruyt, F. A., and Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* **11**, 3155-62.
- Camps, C., Sarries, C., Roig, B., Sanchez, J. J., Queralt, C., Sancho, E., Martinez, N., Taron, M., and Rosell, R. (2003). Assessment of nucleotide excision repair XPD polymorphisms in the peripheral blood of gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. *Clin Lung Cancer* **4**, 237-41.
- Chen, P., Wiencke, J., Aldape, K., Kesler-Diaz, A., Miike, R., Kelsey, K., Lee, M., Liu, J., and Wrensch, M. (2000). Association of an ERCC1 polymorphism with adult-onset glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**, 843-7.
- Clarkson, S. G., and Wood, R. D. (2005). Polymorphisms in the human XPD (ERCC2) gene, DNA repair capacity and cancer susceptibility: an appraisal. *DNA Repair (Amst)* **4**, 1068-74.
- Cobo, M., Isla, D., Massuti, B., Montes, A., Sanchez, J. M., Provencio, M., Vinolas, N., Paz-Ares, L., Lopez-Vivanco, G., Munoz, M. A., Felip, E., Alberola, V., Camps, C., Domine, M., Sanchez, J. J., Sanchez-Ronco, M., Danenberg, K., Taron, M., Gandara, D., and Rosell, R. (2007). Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **25**, 2747-54.
- Cunningham, D., Allum, W. H., Stenning, S. P., Thompson, J. N., Van de Velde, C. J., Nicolson, M., Scarffe, J. H., Lofts, F. J., Falk, S. J., Iveson, T. J., Smith, D. B., Langley, R. E., Verma, M., Weeden, S., Chua, Y. J., and Participants, M. T. (2006). Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* **355**, 11-20.
- Dabholkar, M., Thornton, K., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J. J., and Reed, E. (2000). Increased mRNA levels of xeroderma pigmentosum complementation group B (XPB) and Cockayne's syndrome complementation group B (CSB) without increased mRNA levels of multidrug-resistance gene (MDR1) or metallothionein-II (MT-II) in platinum-resistant human ovarian cancer tissues. *Biochem Pharmacol* **60**, 1611-9.
- Dabholkar, M., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J. J., and Reed, E. (1994). Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest* **94**, 703-8.

- Damia, G., Guidi, G., and D'Incalci, M. (1998). Expression of genes involved in nucleotide excision repair and sensitivity to cisplatin and melphalan in human cancer cell lines. *Eur J Cancer* **34**, 1783-8.
- de Las Penas, R., Sanchez-Ronco, M., Alberola, V., Taron, M., Camps, C., Garcia-Carbonero, R., Massuti, B., Queralt, C., Botia, M., Garcia-Gomez, R., Isla, D., Cobo, M., Santarpia, M., Cecere, F., Mendez, P., Sanchez, J. J., and Rosell, R. (2006). Polymorphisms in DNA repair genes modulate survival in cisplatin/gemcitabine-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* **17**, 668-75.
- Duell, E. J., Wiencke, J. K., Cheng, T. J., Varkonyi, A., Zuo, Z. F., Ashok, T. D., Mark, E. J., Wain, J. C., Christiani, D. C., and Kelsey, K. T. (2000). Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* **21**, 965-71.
- Dybdahl, M., Vogel, U., Frentz, G., Wallin, H., and Nexø, B. A. (1999). Polymorphisms in the DNA repair gene XPD: correlations with risk and age at onset of basal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**, 77-81.
- Ferry, K. V., Hamilton, T. C., and Johnson, S. W. (2000). Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. *Biochem Pharmacol* **60**, 1305-13.
- Fink, U., Schuhmacher, C., Stein, H. J., Busch, R., Feussner, H., Dittler, H. J., Helmberger, A., Bottcher, K., and Siewert, J. R. (1995). Preoperative chemotherapy for stage III-IV gastric carcinoma: feasibility, response and outcome after complete resection. *Br J Surg* **82**, 1248-52.
- Frei, E., Holland, J., and Kufe, D. W. (2003). Chemotherapeutic Agents. In "Cancer Medicine" (E. Frei, J. Holland and D. W. Kufe, eds.). BC Decker Inc., Hamilton.
- Goode, E. L., Ulrich, C. M., and Potter, J. D. (2002). Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 1513-30.
- Hamilton, S. (2000). "Tumours of the Digestive System."
- Harms, C., Salama, S. A., Sierra-Torres, C. H., Cajas-Salazar, N., and Au, W. W. (2004). Polymorphisms in DNA repair genes, chromosome aberrations, and lung cancer. *Environ Mol Mutagen* **44**, 74-82.
- Hemminki, K., Xu, G., Angelini, S., Snellman, E., Jansen, C. T., Lambert, B., and Hou, S. M. (2001). XPD exon 10 and 23 polymorphisms and DNA repair in human skin in situ. *Carcinogenesis* **22**, 1185-8.
- Hou, S. M., Falt, S., Angelini, S., Yang, K., Nyberg, F., Lambert, B., and Hemminki, K. (2002). The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk. *Carcinogenesis* **23**, 599-603.
- Hou, S. M., Ryk, C., Kannio, A., Angelini, S., Falt, S., Nyberg, F., and Husgafvel-Pursiainen, K. (2003). Influence of common XPD and XRCC1 variant alleles on p53 mutations in lung tumors. *Environ Mol Mutagen* **41**, 37-42.
- Huang, W. Y., Chow, W. H., Rothman, N., Lissowska, J., Llaca, V., Yeager, M., Zatonski, W., and Hayes, R. B. (2005). Selected DNA repair polymorphisms and gastric cancer in Poland. *Carcinogenesis* **26**, 1354-9.
- Isla, D., Sarries, C., Rosell, R., Alonso, G., Domine, M., Taron, M., Lopez-Vivanco, G., Camps, C., Botia, M., Nunez, L., Sanchez-Ronco, M., Sanchez, J. J., Lopez-Brea, M., Barneto, I., Paredes, A., Medina, B., Artal, A., and Lianes, P. (2004). Single nucleotide polymorphisms and outcome in docetaxel-cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* **15**, 1194-203.
- Joshi, M. B., Shirota, Y., Danenberg, K. D., Conlon, D. H., Salonga, D. S., Herndon, J. E., 2nd, Danenberg, P. V., and Harpole, D. H., Jr. (2005). High gene expression of

- TS1, GSTP1, and ERCC1 are risk factors for survival in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 2215-21.
- Keller, G. (2005). Molecular medicine of gastric adenocarcinomas.
- King, C. R., Yu, J., Freimuth, R. R., McLeod, H. L., and Marsh, S. (2005). Interethnic variability of ERCC2 polymorphisms. *Pharmacogenomics J* **5**, 54-9.
- Kumar, V., Abbas, A. K., and Fausto, N. (2005). The Gastrointestinal Tract. In "Pathologic Basis of Disease" (E. Inc., ed.), Philadelphia.
- La Vecchia, C., Negri, E., Franceschi, S., and Gentile, A. (1992). Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer* **70**, 50-5.
- Langer, R., Specht, K., Becker, K., Ewald, P., Bekesch, M., Sarbia, M., Busch, R., Feith, M., Stein, H. J., Siewert, J. R., and Hofler, H. (2005). Association of pretherapeutic expression of chemotherapy-related genes with response to neoadjuvant chemotherapy in Barrett carcinoma. *Clin Cancer Res* **11**, 7462-9.
- Lauren, P. (1965). The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* **64**, 31-49.
- Lawrence, W., Jr. (1973). Carcinoma of the stomach. *CA Cancer J Clin* **23**, 286-304.
- Li, Q., Yu, J. J., Mu, C., Yunbam, M. K., Slavsky, D., Cross, C. L., Bostick-Bruton, F., and Reed, E. (2000). Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* **20**, 645-52.
- Liu, B., Wei, J., Zou, Z., Qian, X., Nakamura, T., Zhang, W., Ding, Y., Feng, J., and Yu, L. (2007). Polymorphism of XRCC1 predicts overall survival of gastric cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy in Chinese population. *Eur J Hum Genet* **15**, 1049-53.
- Liu, D., O'Day, S. J., Yang, D., Boasberg, P., Milford, R., Kristedja, T., Groshen, S., and Weber, J. (2005). Impact of gene polymorphisms on clinical outcome for stage IV melanoma patients treated with biochemotherapy: an exploratory study. *Clin Cancer Res* **11**, 1237-46.
- Lord, R. V., Brabender, J., Gandara, D., Alberola, V., Camps, C., Domine, M., Cardenal, F., Sanchez, J. M., Gumerlock, P. H., Taron, M., Sanchez, J. J., Danenberg, K. D., Danenberg, P. V., and Rosell, R. (2002). Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **8**, 2286-91.
- Lordick, F., and Siewert, J. R. (2005). Recent advances in multimodal treatment for gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* **8**, 78-85.
- Lowy, A. M., Mansfield, P. F., Leach, S. D., Pazdur, R., Dumas, P., and Ajani, J. A. (1999). Response to neoadjuvant chemotherapy best predicts survival after curative resection of gastric cancer. *Ann Surg* **229**, 303-8.
- Lunn, R. M., Helzlsouer, K. J., Parshad, R., Umbach, D. M., Harris, E. L., Sanford, K. K., and Bell, D. A. (2000). XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* **21**, 551-5.
- Madhusudan, S., and Middleton, M. R. (2005). The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev* **31**, 603-17.
- Matsumura, Y., and Ananthaswamy, H. N. (2002). Proposed model for mammalian nucleotide excision repair (NER).
- Matullo, G., Guarrera, S., Sacerdote, C., Polidoro, S., Davico, L., Gamberini, S., Karagas, M., Casetta, G., Rolle, L., Piazza, A., and Vineis, P. (2005). Polymorphisms/haplotypes in DNA repair genes and smoking: a bladder cancer case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 2569-78.

- Matullo, G., Palli, D., Peluso, M., Guarrera, S., Carturan, S., Celentano, E., Krogh, V., Munnia, A., Tumino, R., Polidoro, S., Piazza, A., and Vineis, P. (2001). XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis* **22**, 1437-45.
- Metzger, R., Leichman, C. G., Danenberg, K. D., Danenberg, P. V., Lenz, H. J., Hayashi, K., Groshen, S., Salonga, D., Cohen, H., Laine, L., Crookes, P., Silberman, H., Baranda, J., Konda, B., and Leichman, L. (1998). ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* **16**, 309-16.
- Michaelis, L. C., and Ratain, M. J. (2006). Measuring response in a post-RECIST world: from black and white to shades of grey. *Nat Rev Cancer* **6**, 409-14.
- Moller, P., Wallin, H., Dybdahl, M., Frenzt, G., and Nexø, B. A. (2000). Psoriasis patients with basal cell carcinoma have more repair-mediated DNA strand-breaks after UVC damage in lymphocytes than psoriasis patients without basal cell carcinoma. *Cancer Lett* **151**, 187-92.
- Napieralski, R., Ott, K., Kremer, M., Specht, K., Vogelsang, H., Becker, K., Müller, M., Lordick, F., Fink, U., Rudiger Siewert, J., Hofler, H., and Keller, G. (2005). Combined GADD45A and thymidine phosphorylase expression levels predict response and survival of neoadjuvant-treated gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* **11**, 3025-31.
- Ott, K. (2004). Bedeutung konstitutioneller enzymatischer Polymorphismen und der FDG-PET beim neoadjuvant therapierten lokal fortgeschrittenen Magenkarzinom. Habilitationsschrift, Technische Universität München, München.
- Ott, K., Sandler, A., Becker, K., Dittler, H. J., Helmberger, H., Busch, R., Kollmannsberger, C., Siewert, J. R., and Fink, U. (2003). Neoadjuvant chemotherapy with cisplatin, 5-FU, and leucovorin (PLF) in locally advanced gastric cancer: a prospective phase II study. *Gastric Cancer* **6**, 159-67.
- Palli, D., Russo, A., Masala, G., Saieva, C., Guarrera, S., Carturan, S., Munnia, A., Matullo, G., and Peluso, M. (2001). DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample. *Int J Cancer* **94**, 121-7.
- Panov, K. I., Panova, T. B., Gadai, O., Nishiyama, K., Saito, T., Russell, J., and Zomerdijs, J. C. (2006). RNA polymerase I-specific subunit CAST/hPAF49 has a role in the activation of transcription by upstream binding factor. *Mol Cell Biol* **26**, 5436-48.
- Park, D. J., Stoehlmacher, J., Zhang, W., Tsao-Wei, D., Groshen, S., Zahedy, S., Gil, J., Mallik, N., and Lenz, H. J. (2002). ERCC1 polymorphism is associated with differential ERCC1 mRNA levels. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **43**, 321.
- Park, D. J., Stoehlmacher, J., Zhang, W., Tsao-Wei, D. D., Groshen, S., and Lenz, H. J. (2001). A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* **61**, 8654-8.
- Park, D. J., Zhang, W., Stoehlmacher, J., Tsao-Wei, D., Groshen, S., Gil, J., Yun, J., Sones, E., Mallik, N., and Lenz, H. J. (2003). ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* **1**, 162-6.
- Pastorelli, R., Cerri, A., Mezzetti, M., Consonni, E., and Airoldi, L. (2002). Effect of DNA repair gene polymorphisms on BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Int J Cancer* **100**, 9-13.

- Pavanello, S., Pulliero, A., Siwinska, E., Mielzynska, D., and Clonfero, E. (2005). Reduced nucleotide excision repair and GSTM1-null genotypes influence anti-B[a]PDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of highly PAH-exposed coke oven workers. *Carcinogenesis* **26**, 169-75.
- Pschyrembel (2004). "Klinisches Wörterbuch," 260/Ed.
- Qiao, Y., Spitz, M. R., Shen, H., Guo, Z., Shete, S., Hedayati, M., Grossman, L., Mohrenweiser, H., and Wei, Q. (2002). Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes. *Carcinogenesis* **23**, 295-9.
- Reed, E. (2005). ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin Cancer Res* **11**, 6100-2.
- Reed, E., Dabholkar, M., Thornton, K., Thompson, C., Yu, J. J., and Bostick-Bruton, F. (2000). Evidence for in the appearance of mRNAs of nucleotide excision repair genes, in human ovarian cancer tissues. *Oncol Rep* **7**, 1123-8.
- Roberts-Thomson, I. C., and Butler, W. J. (2005). Polymorphism and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* **20**, 793-4.
- Roninson, I. B. (2002). Tumor senescence as a determinant of drug response in vivo. *Drug Resist Updat* **5**, 204-8.
- Ruzzo, A., Graziano, F., Kawakami, K., Watanabe, G., Santini, D., Catalano, V., Bisonni, R., Canestrari, E., Ficarelli, R., Menichetti, E. T., Mari, D., Testa, E., Silva, R., Vincenzi, B., Giordani, P., Cascinu, S., Giustini, L., Tonini, G., and Magnani, M. (2006). Pharmacogenetic profiling and clinical outcome of patients with advanced gastric cancer treated with palliative chemotherapy. *J Clin Oncol* **24**, 1883-91.
- Ryk, C., Kumar, R., Sanyal, S., Verdier, P. J., Hemminki, K., Larsson, P., Steineck, G., and Hou, S. M. (2005). Influence of polymorphism in DNA repair and defence genes on p53 mutations in bladder tumours. *Cancer Lett.*
- Ryu, J. S., Hong, Y. C., Han, H. S., Lee, J. E., Kim, S., Park, Y. M., Kim, Y. C., and Hwang, T. S. (2004). Association between polymorphisms of ERCC1 and XPD and survival in non-small-cell lung cancer patients treated with cisplatin combination chemotherapy. *Lung Cancer* **44**, 311-6.
- Sakano, S., Wada, T., Matsumoto, H., Sugiyama, S., Inoue, R., Eguchi, S., Ito, H., Ohmi, C., Matsuyama, H., and Naito, K. (2006). Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes might be prognostic factors in muscle-invasive bladder cancer patients treated with chemoradiotherapy. *Br J Cancer* **95**, 561-70.
- Sanger, F., and Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* **94**, 441-8.
- Seker, H., Butkiewicz, D., Bowman, E. D., Rusin, M., Hedayati, M., Grossman, L., and Harris, C. C. (2001). Functional significance of XPD polymorphic variants: attenuated apoptosis in human lymphoblastoid cells with the XPD 312 Asp/Asp genotype. *Cancer Res* **61**, 7430-4.
- Selvakumar, M., Pisarcik, D. A., Bao, R., Yeung, A. T., and Hamilton, T. C. (2003). Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* **63**, 1311-6.
- Seyffert, W. (2003). DNA-Reparatur-Mechanismen. In "Lehrbuch der Genetik" (W. Seyffert, ed.), pp. 561-570. Spektrum, Heidelberg, Berlin.
- Shen, M. R., Jones, I. M., and Mohrenweiser, H. (1998). Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* **58**, 604-8.
- Shi, Q., Wang, L. E., Bondy, M. L., Brewster, A., Singletary, S. E., and Wei, Q. (2004). Reduced DNA repair of benzo[a]pyrene diol epoxide-induced adducts and common XPD polymorphisms in breast cancer patients. *Carcinogenesis* **25**, 1695-700.

- Shirota, Y., Stoehlmacher, J., Brabender, J., Xiong, Y. P., Uetake, H., Danenberg, K. D., Groshen, S., Tsao-Wei, D. D., Danenberg, P. V., and Lenz, H. J. (2001). ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* **19**, 4298-304.
- Siewert, J. R., Bottcher, K., Stein, H. J., and Roder, J. D. (1998). Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg* **228**, 449-61.
- Siewert, J. R., Sendler, A., and Fink, U. (2001a). Magenkarzinom. In "Praxis der Viszeralchirurgie" (J. R. Siewert, F. Harder and M. Rothmund, eds.), pp. 447-488. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Siewert, J. R., Stein, H. J., and Feith, M. (2001b). Besonderheiten des Kardiakarzinoms. In "Praxis der Viszeralchirurgie" (J. R. Siewert, F. Harder and M. Rothmund, eds.), pp. 439-445. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Spitz, M. R., Wu, X., Wang, Y., Wang, L. E., Shete, S., Amos, C. I., Guo, Z., Lei, L., Mohrenweiser, H., and Wei, Q. (2001). Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* **61**, 1354-7.
- Steffensen, K. D., Waldstrom, M., Jeppesen, U., Brandslund, I., and Jakobsen, A. (2007). Prediction of response to chemotherapy by ERCC1 immunohistochemistry and ERCC1 polymorphism in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*.
- Stoehlmacher, J., Park, D. J., Zhang, W., Yang, D., Groshen, S., Zahedy, S., and Lenz, H. J. (2004). A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* **91**, 344-54.
- Su, D., Ma, S., Liu, P., Jiang, Z., Lv, W., Zhang, Y., Deng, Q., Smith, S., and Yu, H. (2007). Genetic polymorphisms and treatment response in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **56**, 281-8.
- Suk, R., Gurubhagavatula, S., Park, S., Zhou, W., Su, L., Lynch, T. J., Wain, J. C., Neuberg, D., Liu, G., and Christiani, D. C. (2005). Polymorphisms in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* **11**, 1534-8.
- Tang, D., Cho, S., Rundle, A., Chen, S., Phillips, D., Zhou, J., Hsu, Y., Schnabel, F., Estabrook, A., and Perera, F. P. (2002). Polymorphisms in the DNA repair enzyme XPD are associated with increased levels of PAH-DNA adducts in a case-control study of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **75**, 159-66.
- Tsodikov, O. V., Enzlin, J. H., Scharer, O. D., and Ellenberger, T. (2005). Crystal structure and DNA binding functions of ERCC1, a subunit of the DNA structure-specific endonuclease XPF-ERCC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11236-41.
- Viguiier, J., Boige, V., Miquel, C., Pocard, M., Giraudeau, B., Sabourin, J. C., Ducreux, M., Sarasin, A., and Praz, F. (2005). ERCC1 codon 118 polymorphism is a predictive factor for the tumor response to oxaliplatin/5-fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 6212-7.
- Warnecke-Eberz, U., Metzger, R., Miyazono, F., Baldus, S. E., Neiss, S., Brabender, J., Schaefer, H., Doerfler, W., Bollschweiler, E., Dienes, H. P., Mueller, R. P., Danenberg, P. V., Hoelscher, A. H., and Schneider, P. M. (2004). High specificity of quantitative excision repair cross-complementing 1 messenger RNA expression for prediction of minor histopathological response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 3794-9.
- Weiß, C. (2002). Statistische Tests. In "Basiswissen Medizinische Statistik", pp. 204 - 261. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

- Whitehead, C. M., Winkfein, R. J., Fritzler, M. J., and Rattner, J. B. (1997). ASE-1: a novel protein of the fibrillar centres of the nucleolus and nucleolus organizer region of mitotic chromosomes. *Chromosoma* **106**, 493-502.
- Wittekind, C., Klimpfnger, M., and Sobin, L. (2005). Magen. In "TNM-Atlas" (C. Wittekind, M. Klimpfnger and L. Sobin, eds.), pp. 84-95. Springer Verlag, Heidelberg.
- Wrensch, M., Kelsey, K. T., Liu, M., Miike, R., Moghadassi, M., Sison, J. D., Aldape, K., McMillan, A., Wiemels, J., and Wiencke, J. K. (2005). ERCC1 and ERCC2 polymorphisms and adult glioma. *Neuro-oncol* **7**, 495-507.
- Yamamoto, K., Yamamoto, M., Hanada, K., Nogi, Y., Matsuyama, T., and Muramatsu, M. (2004). Multiple protein-protein interactions by RNA polymerase I-associated factor PAF49 and role of PAF49 in rRNA transcription. *Mol Cell Biol* **24**, 6338-49.
- Yang, P., Kollmeyer, T. M., Buckner, K., Bamlet, W., Ballman, K. V., and Jenkins, R. B. (2005). Polymorphisms in GLTSCR1 and ERCC2 are associated with the development of oligodendrogliomas. *Cancer* **103**, 2363-72.
- Yu, J. J., Lee, K. B., Mu, C., Li, Q., Abernathy, T. V., Bostick-Bruton, F., and Reed, E. (2000). Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int J Oncol* **16**, 555-60.
- Zhou, W., Gurubhagavatula, S., Liu, G., Park, S., Neuberg, D. S., Wain, J. C., Lynch, T. J., Su, L., and Christiani, D. C. (2004). Excision repair cross-complementation group 1 polymorphism predicts overall survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* **10**, 4939-43.
- Zhou, W., Liu, G., Park, S., Wang, Z., Wain, J. C., Lynch, T. J., Su, L., and Christiani, D. C. (2005). Gene-smoking interaction associations for the ERCC1 polymorphisms in the risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 491-6.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Histologisches Bild des Magenkarzinoms	7
Abbildung 2: Platinderivate (Frei, et al., 2003).....	12
Abbildung 3: Cisplatin-DNA-Adducts (Frei, et al., 2003).....	12
Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) (Matsumura and Ananthaswamy, 2002)	15
Abbildung 5: Bildung von Homo- und Heteroduplizies bei der DHPLC	41
Abbildung 6: DHPLC: links: Binden der DNA-Duplizies an die Säule; rechts: Lösen der vier Fraktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten	42
Abbildung 7: Schmelzkurvenberechnung durch Software WAVEMAKER und	43
Abbildung 8: Histopathologisches Ansprechen und rezidivfreies Überleben ($p = 4e-5$) ...	52
Abbildung 9: Histopathologische Response und tumorabh. Überleben ($p = 9e-7$)	52
Abbildung 10: Klinische Response und rezidivfreies Überleben ($p = 0,003$)	53
Abbildung 11: Klinische Response und tumorabhängiges Überleben ($p = 1e-5$).....	53
Abbildung 12: Tumorlokalisierung und histopathologische Response ($p = 0,048$).....	54
Abbildung 13: Laurenklassifikation und histopathologische Response ($p = 0,006$).....	55
Abbildung 14: Grading und histopathologische Response ($p = 0,003$)	55
Abbildung 15: Geschlecht und tumorabhängiges Überleben ($p = 0,067$)	56
Abbildung 16: Tumorlokalisierung und tumorabhängiges Überleben ($p < 0,001$).....	57
Abbildung 17: Laurenklassifikation und tumorabhängiges Überleben ($p = 0,023$).....	58
Abbildung 18: Laurenklassifikation und rezidivfreies Überleben ($p = 0,613$)	58
Abbildung 19: Grading und tumorabhängiges Überleben ($p = 0,011$)	59
Abbildung 20: RFLP-Analyse des Polymorphismus ERCC1-118	59
Abbildung 21: DHPLC des Polymorphismus ERCC1-8092: homozygote und	60
Abbildung 22: Sequenzierung des Polymorphismus ERCC2-751 (homozygot AA)	60
Abbildung 23: Sequenzierung des Polymorphismus ERCC2-751 (heterozygot AC).....	61
Abbildung 24: Sequenzierung des Polymorphismus ERCC2-751 (homozygot CC).....	61
Abbildung 25: Korrelation zwischen ERCC1-118 (CC vs. CT+TT) und Alter ($p = 0,014$).....	62
Abbildung 26: ERCC1-118 und histopathologische Response ($p = 0,731$).....	64
Abbildung 27: ERCC1-118 und tumorabhängiges Überleben ($p = 0,212$).....	65
Abbildung 28: ERCC1-118 und rezidivfreies Überleben ($p = 0,127$)	66
Abbildung 29: ERCC1-8092 und Histopathologische Response ($p = 0,875$).....	68
Abbildung 30: ERCC1-8092 und tumorabhängiges Überleben ($p = 0,240$).....	69
Abbildung 31: ERCC1-8092 und rezidivfreies Überleben ($p = 0,015$)	70
Abbildung 32: ERCC2-751 und histopathologische Response ($p = 0,197$).....	72
Abbildung 33: ERCC2-751 und tumorabhängiges Überleben ($p = 0,642$).....	73
Abbildung 34: ERCC2-751 und rezidivfreies Überleben ($p = 0,048$)	74
Abbildung 35: ERCC1-118 und tumorabhängiges Überleben bei Patienten ohne Fernmetastasen zum Zeitpunkt der OP ($p = 0,028$).....	78
Abbildung 36: ERCC1-118 und rezidivfreies Überleben bei R0-Patienten ohne Fernmetastasen zum Zeitpunkt der OP ($p = 0,041$).....	79
Abbildung 37: R0-Patienten: ypM-Kategorie und tumorabh. Überleben ($p < 0,001$)	79
Abbildung 38: R1-Patienten: ypM-Kategorie und tumorabh. Überleben ($p = 0,003$)	80
Abbildung 39: ypM0-Patienten: R-Kategorie und tumorabh. Überleben ($p = 0,286$)	80
Abbildung 40: ypM1-Patienten: R-Kategorie und tumorabh. Überleben ($p = 0,036$)	81

Tabelle 1: Magenkarzinome bei hereditären Tumorsyndromen (Keller, 2005).....	4
Tabelle 2: DNA-Polymorphismen und erhöhtes Magenkarzinomrisiko (Roberts-Thomson and Butler, 2005)	4
Tabelle 3: Histologische Klassifikation des Magenkarzinoms nach der WHO (Hamilton, 2000; Siewert, et al., 2001a)	6
Tabelle 4: Tumorlokalisation beim Magenkarzinom (Siewert, et al., 1998).....	7
Tabelle 5: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms (Wittekind et al., 2005).....	8
Tabelle 6: UICC-Stadieneinteilung des Magenkarzinoms nach der TNM-Klassifikation (Siewert, et al., 2001a)	9
Tabelle 7: postoperativer Residualtumorstatus (R-Kategorie)	10
Tabelle 8: Studien ERCC1-118 und platinhaltige Chemotherapie.....	20
Tabelle 9: Studien ERCC1-8092 und platinhaltige Chemotherapie.....	22
Tabelle 10: Assoziationen zwischen ERCC2-751 und DNA-Reparaturkapazität.....	23
Tabelle 11: Studien ERCC2-751 und platinhaltige Chemotherapie.....	24
Tabelle 12: PLF-Schema (130 Patienten).....	28
Tabelle 13: PLF + Docetaxel (16 Patienten)	28
Tabelle 14: PLF + Paclitaxel (14 Patienten).....	28
Tabelle 15: PLF + Epirubicin (10 Patienten)	28
Tabelle 16: OLF-Schema (7 Patienten)	28
Tabelle 17: EAP-Schema (4 Patienten)	28
Tabelle 18: Klinische Response	29
Tabelle 19: Pathologischer Regressionsgrad und pathologische Response (Becker, et al., 2003)	30
Tabelle 20: Geräte	31
Tabelle 21: Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien	32
Tabelle 22: Proteinase K-Puffer	33
Tabelle 23: TE-Puffer	33
Tabelle 24: Herstellung des PCR-Puffer (10fach konzentrierte Stammlösung).....	33
Tabelle 25: TBE-Puffer (10x konzentriert)	34
Tabelle 26: DHPLC-Puffer.....	34
Tabelle 27: Entparaffinierung in absteigender Alkoholreihe	35
Tabelle 28: Hämalaunfärbung	35
Tabelle 29: Verwendete Primer	36
Tabelle 30: PCR-Pipetierschema.....	37
Tabelle 31: PCR-Ansatz	38
Tabelle 32: PCR-Bedingungen.....	38
Tabelle 33: 2%iges Agarosegel	39
Tabelle 34: Restriktionsenzyme zur RFLP-Analyse von ERCC1-118 und ERCC2-751....	40
Tabelle 35: RFLP-Versuchsbedingungen von ERCC1-118 und ERCC2-751	40
Tabelle 36: Verkürzte endgültige DHPLC-Methode (ERCC1-8092)	43
Tabelle 37: Sequenzierungs-PCR (20 µl-Ansatz)	45
Tabelle 38: Faustregel zur Berechnung der Annealing-Temperatur für die Cycle-PCR	45
Tabelle 39: Cycle-PCR-Ablauf	45
Tabelle 40: Endpunkte und intermediäre Endpunkte der Studie	46
Tabelle 41: Ereignisse und Zensierungen für das tumorabhängige und rezidivfreie Überleben.....	46
Tabelle 42: Definitionen und Erläuterungen klinischer und pathologischer Parameter.....	47
Tabelle 43: Patientencharakteristika.....	50
Tabelle 44: Klinisches Ansprechen und histopathologisches Ansprechen (p < 0,001)	51
Tabelle 45: Klinische und histopathologische Parameter und Ansprechen	54

Tabelle 46: Klinische und histopathologische Parameter und Überleben.....	56
Tabelle 47: Genotypenverteilung und Allelfrequenz von ERCC1-118	61
Tabelle 48: ERCC1-118 und Alter (p-Werte bei ANOVA: CC vs. CT vs. TT = 0.037; CC vs. CT+TT = 0,014).....	62
Tabelle 49: ERCC1-118 und Ansprechen (X ² -Test).....	63
Tabelle 50: ERCC1-118 und Histopathologische Responderate.....	63
Tabelle 51: ERCC1-118 und Klinische Responderate	63
Tabelle 52: ERCC1-118 und Überleben (Log-Rank-Test)	64
Tabelle 53: Univariate Coxregression ERCC1-118 und tumorabhängiges Überleben.....	65
Tabelle 54: Univariate Coxregression ERCC1-118 und rezidivfreies Überleben	65
Tabelle 55: Genotypenverteilung und Allelfrequenz bei ERCC1-8092	66
Tabelle 56: ERCC1-8092 und Alter (p = 0,114).....	67
Tabelle 57: ERCC1-8092 und Ansprechen (X ² -Test).....	67
Tabelle 58: ERCC1-8092 und histopathologische Responderate.....	67
Tabelle 59: ERCC1-8092 und klinische Responderate	68
Tabelle 60: ERCC1-8092 und Überleben (Log-Rank-Test)	68
Tabelle 61: Univariate Coxregression ERCC1-8092 und tumorabhängiges Überleben.....	69
Tabelle 62: Univariate Coxregression ERCC1-8092 und rezidivfreies Überleben	69
Tabelle 63: Allelfrequenz und Genotypenverteilung bei ERCC2-751	70
Tabelle 64: ERCC2-751 und Ansprechen (X ² -Test).....	71
Tabelle 65: ERCC2-751 und histopathologische Responderate.....	71
Tabelle 66: ERCC2-751 und Klinische Responderate	71
Tabelle 67: ERCC2-751 und Überleben (Log-Rank-Test)	72
Tabelle 68: Univariate Coxregression ERCC2-751 und tumorabhängiges Überleben.....	73
Tabelle 69: Univariate Coxregression ERCC2-751 und rezidivfreies Überleben	73
Tabelle 70: Assoziationen zwischen den Polymorphismen	74
Tabelle 71: Geschätzte Haplotypfrequenzen.....	75
Tabelle 72: Haplotypen und Ansprechen und Überleben	75
Tabelle 73: Cox-Modell „schrittweise-vorwärts“ nach Wald des tumorabhängigen Überlebens (nur operierte Patienten) (3 Schritte).....	76
Tabelle 74: Cox-Modell „schrittweise-vorwärts“ nach Wald des tumorabhängigen Überlebens (nur operierte Patienten) ab 1999 (4 Schritte)	77
Tabelle 75: Cox-Modell „schrittweise-vorwärts“ nach Wald des rezidivfreien Überlebens (4 Schritte)	77
Tabelle 76: Cox-Modell „schrittweise-vorwärts“ nach Wald des rezidivfreien Überlebens ab 1999 (3 Schritte)	77

9 Danksagung

Die Arbeit an dieser Dissertation hat mir die Möglichkeit gegeben, einen Einblick in wissenschaftliches Arbeiten zu erhalten. Die Erfahrung, sich über relativ lange Zeit intensiv mit einem kleinen Teilaspekt der Medizin auseinander zu setzen, bietet das Studium in aller Regel nicht. Besonders bewusst wurde mir, wie schwierig der Erkenntnisgewinn und die Interpretation wissenschaftlicher Daten sind. Ich denke, dass ich durch diese Doktorarbeit nun in der Lage bin, Studienergebnisse und medizinisches Wissen einerseits kritischer zu hinterfragen und andererseits auch besser zu würdigen. Es gibt einige Menschen, die auf unterschiedliche Weise zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter PD Dr. rer. nat. Gisela Keller für die zuverlässige und ausgezeichnete Betreuung. Sie hat mich während meiner Arbeit außerordentlich kompetent unterstützt und war für alle Fragen und Probleme stets ansprechbar.

Auch bei PD Dr. med. Katja Ott (chirurgische Klinik) möchte ich mich herzlich bedanken. Sie hat mir bei der Beschaffung der klinischen Patientendaten geholfen und ich konnte auf bereits von ihr erhobene Daten aufbauen.

Dank geht auch an Anne-Laure Boulesteix (Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie), mit deren Hilfe ich die statistische Auswertung der erhobenen Daten meistern konnte. Des Weiteren bedanke ich mich bei Susanne Plaschke und Sabine Jung für die Unterstützung bei der praktischen Laborarbeit.

Auch meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle danken. Sie haben mir immer in jeder Hinsicht nicht nur für das Studium und für diese Doktorarbeit den nötigen Rückhalt gegeben und viele Freiheiten gelassen.

Tief empfundener Dank geht nicht zuletzt an Anne-Katrin Zimmermann. Seit vielen Jahren sind wir nun schon zusammen und sie hat mir besonders in schweren Zeiten starken Halt gegeben.