

[Hier eingeben]

Gewidmet/ A szentel:
meinem Sohn Bálint,
meinen Großeltern Elfriede und Manfred,
nagyszüleimnek Anna és András.

[Hier eingeben]

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Die Rolle der eukaryotischen Initiationsfaktoren im Barrett Adenokarzinom und
gastroösophagealen Entzündungen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. Med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Stephanie Csiki

aus Merseburg

Magdeburg 2023

[Hier eingeben]

Bibliographische Beschreibung:

Csiki, Stephanie:

Die Rolle der eukaryotischen Initiationsfaktoren im Barrett Adenokarzinom und gastroösophagealen Entzündungen. - 2023. - 100 Bl., 22 Abb., 9 Tab.

Kurzreferat

Fragestellung dieser Arbeit war, ob die eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs) eine Rolle in der Karzinogenese des Barrett-Adenokarzinoms und der vorherigen Entzündungsstadien spielen. Hierfür wurde die Forschungsarbeit unterteilt in immunhistochemische und zellkulturelle Experimente. Ausgewählt wurden für die in vitro-Experimente 7 eukaryotische Initiationsfaktoren und auf ihre Expression anhand von Western Blot-Analysen in ösophagealen Zelllinien verschiedener Erkrankungsstadien der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz und zu verschiedenen zeitlichen Checkpoints untersucht. Im in Vivo-Teil wurden immunhistochemische Färbungen an ösophagealen Gewebeschnitten vorgenommen und anhand der Anfärbeintensität (Grade) und Anfärbarkeit (Score) beurteilt. Die Ergebnisse wurden anschließend anhand von ANOVA-Analysen mit Bonferroni-Post-Hoc-Test ausgewertet. Es zeigten sich sowohl in den immunhistochemischen als auch den zellexperimentellen Untersuchungen Hinweise für eine veränderte Expression der eukaryotischen Initiationsfaktoren im Karzinom in Vergleich zu den entzündlich veränderten Vorstufen, was für eine Beeinflussung der Karzinogenese durch die untersuchten eIFs sprechen könnte.

Schlüsselwörter

Eukaryotische Initiationsfaktoren, Barrett-Adenokarzinom, gastroösophageale Refluxerkrankung

[Hier eingeben]

1	Abkürzungsverzeichnis	6
2	Einleitung	7
2.1	Zur Epidemiologie des Barrett-Adenokarzinoms	7
2.2	Entzündungs- und Karzinogenese im Barrett-Ösophagus	8
2.3	Allgemeine Entzündungspathologie und Karzinogenese	9
2.4	Die Rolle der Eukaryotischen Initiationsfaktoren in der Entzündung und Karzinogenese	11
2.4.1	eIF1	13
2.4.2	eIF2 α	14
2.4.3	eIF3	14
2.4.4	eIF4E	15
2.4.5	eIF5	16
2.4.6	eIF6	16
1.5.	Zielstellungen	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Material	18
3.1.1	Verwendete Zelllinien	18
3.1.2.	Untersuchungskollektiv zum Barrett-Ösophagus	18
3.2	Methoden	20
3.2.1	Zellbiologische Experimente	20
3.2.2	Histologische und Immunhistochemische Experimente	25
4	Ergebnisse	28
4.1	Ergebnisse der Zellkulturstudien	28
4.1.1	Analyse der Expression von eIF1	29
4.1.2	Analyse der Expression von eIF2 α	30
4.1.3	Analyse der Expression von p-eIF2 α	31
4.1.4	Analyse der Expression von eIF3a	32
4.1.5	Analyse der Expression von eIF4E	33
4.1.6	Analyse der Expression von eIF5	34
4.1.7	Analyse der Expression von eIF5B	36
4.1.8	Analyse der Expression von eIF6	37
4.2	Ergebnisse der immunhistologischen Expressionsanalyse	39
4.2.1	Expressionsanalyse der eukaryotischen Initiationsfaktoren	39
4.2.2	eIF1	42
4.2.3	eIF2alpha	46
4.2.4	eIF3a und eIF4E	49
4.2.5	eIF5B	56
4.2.6	eIF6	60
5	Diskussion	63
5.1	Rolle der einzelnen eIFs im Barrett-Adenokarzinom	63
5.1.1	eIF1	63
5.1.2	eIF2 α und p-eIF2 α	65
5.1.3	eIF3a	67
5.1.4	eIF4E	67
5.1.5	eIF5 und eIF5B	68
5.1.6	eIF6	70

[Hier eingeben]

5.2	Limitationen.....	71
6	Zusammenfassung.....	72
7	Literaturverzeichnis	73
8	Abbildungsverzeichnis.....	83
9	Tabellenverzeichnis.....	84
10	Anhang.....	85
	Anhang 1.....	185
	Anhang 2.....	88
	Anhang 3.....	90
	Anhang 4.....	93
	Anhang 5.....	96
	Anhang 6.....	99
11	Danksagungen	102
12	Ehrenerklärung.....	103
13	Darstellung des Bildungsweges	104

[Hier eingeben]

1 Abkürzungsverzeichnis

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	Eukaryotischer Initiationsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS/FCS	Fetal bovine serum
GERD	Gastroösophageale Refluxkrankheit
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GTPase	Guanosintriphosphatase
HD	High grade intraepitheliale Dysplasie
HE	Hämatoxylin – Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IM	Intestinale Metaplasie
LD	Low grade intraepitheliale Dysplasie
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
PIC	43S-Vorinitiationskomplexes
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Serum
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TNF- α	Tumornekrosefaktor-Alpha
Tu	Tumor
UÖS	Unterer Ösophagussphinkter
ZM	Zylinderzellmetaplasie
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

[Hier eingeben]

2 Einleitung

2.1 Zur Epidemiologie des Barrett-Adenokarzinoms

Die gastroösophageale Refluxkrankheit ist eine Erkrankung des Gastrointestinaltraktes mit zunehmender Inzidenz in der westlichen Hemisphäre (45; 82) und einer Prävalenz von bis zu 15% mit auftretenden Symptomen wie Sodbrennen, saurer Regurgitation, Dysphagie oder Odynophagie(45). Zu den Risikofaktoren für das Entstehen eines Barrett-Ösophagus zählen Übergewicht, Tabakkonsum, männliches Geschlecht sowie die gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD) (75). Das typische Symptom des Sodbrennens, welches im Rahmen der GERD auftritt, zeigt sich bei 10 bis 30% der Patienten laut diverser Studien (77). Die Angaben speziell zur Prävalenz des Barrett-Ösophagus schwanken zwischen 1,6% bis 6,8% in der westlichen Gesellschaft (52).

Die Refluxösophagitis ist hierbei eine bezeichnete Unterform der GERD (17), welche aufgrund von histologischen und endoskopischen Diagnosen gesichert wird. Pathophysiologisch basiert die Erkrankung auf der vermehrten Exposition der Speiseröhre gegenüber saurem Mageninhalt und Gallensalzen und -säuren (26).

Das Übertreten der Magensäure in den Ösophagus kann verschiedene Ursachen haben:

1. Unzureichende Magenentleerung
2. mechanische Insuffizienz des unteren Ösophagus sphinkters
3. unzureichende ösophageale Clearance des Refluats

Der untere Ösophagus sphinkter (UÖS) fungiert als entscheidende Barriere gegen den Reflux aus dem Magen. Beim Gesunden folgt auf die Relaxation des UÖS eine peristaltische Kontraktion der Speiseröhre, was das Rücklaufen der Magensäure verhindert. Bei Patienten mit GERD ist der UÖS insuffizient und daher ein wichtiger pathogener Faktor der Refluxerkrankung. Ursachen für die unzureichende Schließung des Sphinkters können ein zu niedriger Ruhedruck, eine zu kurze Gesamtlänge des UÖS oder eine zu geringe, intraabdominale Länge sein (88). Ein bis zwei dieser Funktionsstörungen können bei funktionierender Ösophagusperistaltik kompensiert werden. Tritt jedoch eine Kombination aus allen drei Pathophysiologien auf, kommt es zum pathologischen Reflux in der gastroösophagealen Übergangszone. Eine Insuffizienz der Clearance der Speiseröhre führt selbst bei physiologischem Reflux und funktionierendem UÖS zu einer abnormen Säureexposition der Schleimhaut. Entscheidend für die Clearance sind Speichelfluss, muskuläre Peristaltik des tubulären Ösophagus, die Verankerung des distalen Ösophagus im Abdomen (pathologisch wäre hier die sog. Hiatushernie, eine Verlagerung des Ösophagus in den Thoraxraum) und die Schwerkraft (33).

[Hier eingeben]

Gelistet als Komplikationen bei Patienten mit gastroösophagealen Reflux sind peptische Stenosen, erosive Ösophagitis und der Barrett-Ösophagus (45).

2.2 Entzündungs- und Karzinogenese im Barrett-Ösophagus

Der Barrett-Ösophagus, benannt nach dem britischen Chirurgen Norman Rupert Barrett, der 1957 das Krankheitsbild als Erster beschrieb, ist eine Komplikation der GERD und stellt sich als chronisch - entzündliche Veränderung des distalen Ösophagus, die auf Grundlage der Refluxerkrankung entsteht, dar. Durch den chronischen Reflux von Magensäure kommt es im gastroösophagealen Übergang zur histologisch fassbaren und klassifizierbaren Schleimhautveränderung des hier auskleidenden Plattenepithels (38) und zur Ausbildung von Ulzerationen. Die metaplastische Umwandlung von mehrreihigem unverhorntem Plattenepithel zu spezialisiertem, hochprismatischem Zylinderepithel mit Becherzellen wird als Barrett-Mukosa bezeichnet.

Eine der schwerwiegenderen Komplikationen des Barrett-Ösophagus, die Adenokarzinome im gastroösophagealen Übergang, entwickeln sich häufig aufgrund eben dieser neoplastischen, intestinalisierten Mukosa (27). Die Ursache der intestinalen Metaplasie ist eine Fehlregulation bei der Regeneration der Schleimhaut nach erosiver Speiseröhrentzündung. Wie bereits tierexperimentell durch Gillen et al. 1988 nachgewiesen, sind Stammzellen in der Ösophaguskukosa im Stande, nach chronischem Einfluss einer Noxe zylinderzellige Schleimhaut zu differenzieren (19). Das gegenüber der Säure- und Pepsinbelastung widerstandsfähigere Zylinderepithel birgt allerdings das Risiko weiterer Entartungen, u.a. von Dysplasien oder Adenokarzinomen. Die Schleimhautveränderung sollte jedoch nicht als präkanzeröses Stadium per se angesehen werden (27). Bei Nachweis von gastralem Epithel (nach Montreal-Klassifikation auch als Barrett mit Zusatz gastrointestinaler Metaplasie) sollte allerdings innerhalb eines Jahres eine Kontroll-ÖGD erfolgen (45). Im Vergleich zu Patienten, die GERD-typische Symptome für weniger als ein Jahr aufweisen, ist das Risiko eines Barrett-Ösophagus bei einer Symptombdauer von 1 – 5 Jahren um das Dreifache erhöht, bei einer Symptombdauer von 5 – 10 Jahren sogar um das 6,4-fache (45).

In den Industrienationen der westlichen Hemisphäre schätzt man die Prävalenz der gastroösophagealen Refluxkrankheit auf bis zu 15%, ebenso zeigt sich eine steigende Inzidenz (57). Durch die steigende Anzahl betroffener Patienten kommt es zur verstärkten Nutzung von diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen. Damit verbunden entstehen vermehrte Kosten im Gesundheitswesen. Das klinische Spektrum der Refluxkrankheit hat sich in den letzten Jahren signifikant erweitert und extraösophageale Manifestationen werden intensiv – wenn auch kontrovers – diskutiert (45).

[Hier eingeben]

Die Therapie des Barrett-Ösophagus entspricht derjenigen der Refluxkrankheit, jedoch führen weder die intensive antisekretorische Therapie mit PPI noch Anti-Reflux-Chirurgie zu einer Regression des Barrett-Epithels. Therapeutisch wird ein normalisierter Reflux und ein physiologisches pH-Profil angestrebt, um eine weitere Progression der Schleimhautveränderung zu verhindern. Eine direkte, nicht-invasive Therapiemöglichkeit für das Barrett-Syndrom ist jedoch leider noch nicht vorhanden (83).

2.3 Allgemeine Entzündungspathologie und Karzinogenese

Definitionsgemäß ist eine Entzündung die Reaktion des Körpers auf Noxen, welche zu einer Schädigung des Gewebes führen. Die Funktionen der Entzündung sind zunächst die Beseitigung der Noxe und anschließend die Wiederherstellung des ursprünglichen Gewebezustandes über zelluläre als auch humorale Mechanismen.

Zu den Auslösern der Entzündungsreaktion zählen mikrobielle Erreger (Bakterien, Viren oder Pilze), chemische Substanzen (Säuren, Laugen), mechanische Beanspruchung sowie körpereigene Immunreaktionen.

Entzündungsmediatoren werden durch diese Noxen freigesetzt, woraufhin kaskadenartig zelluläre und vaskuläre Mechanismen ablaufen. Nach Ablauf einer Entzündung kommt es entweder zum *restitutio ad integrum* (Heilung des Gewebes) oder zur Narbenbildung, insbesondere nach schwererer Gewebsschädigung.

Zum Beginn einer Entzündungsreaktion schütten Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten Chemokine aus. Diese Botenstoffe sind zuständig für die Migration der Leukozyten zum Ort der Entzündung und zur Einwanderung der Lymphozyten in sekundäre lymphatische Gewebe (60). Neben diversen Chemokinfamilien (CXC oder CC) gibt es weitere Proteine mit chemotaktischen Eigenschaften. Beispiele hierfür sind die Komplementfaktoren C3a, C4a und C5a) (54).

Weitere Entzündungsmediatoren sind Interferone, welche in zwei Gruppen unterteilt sind: Typ I – Interferone mit vorwiegend antiviraler Wirkung und Typ II – Interferone als Mediatoren der allgemeinen Entzündungsreaktion. Interferon- γ , zählend zur Typ II-Familie, stimuliert und aktiviert die Zielzellen während einer Entzündung und verschiebt die CD4+-Zell-Differenzierung zugunsten proinflammatorischer TH1-Zellen (40). Unmittelbar verbunden mit der Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine (IL-1, IL-6 und TNF- α), ist die Abgabe ihrer direkten Gegenspieler, der anti-inflammatorischen Zytokine (14). Dadurch kommt es im gesunden Gewebe zur Selbstlimitation einer Entzündung. Bei chronischen Entzündungen liegt jedoch eine Fehlregulation der Zytokine vor, was zur Persistenz der Entzündung führt. Damit entfällt der protektive Effekt der Entzündung und es kommt stattdessen zur Schädigung des Gewebes. Wie bereits durch weitreichende Studien aufgezeigt, besteht eine direkte

[Hier eingeben]

Korrelation zwischen chronischen Entzündungen und Karzinomen (14). Dies zeigt sich bei typischen Beispielen, wie dem kolorektalen Karzinom bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, dem hepatozellulären Karzinom bei chronischer Hepatitis oder bei Karzinomen des gastroösophagealen Übergangs beim Barrett-Syndrom. Durch Mutation von Protoonkogenen zu Onkogenen, zum Beispiel die intrazellulären Proteine der RAS-Familie, wird ein inflammatorisches Mikromilieu geschaffen, was einerseits zur Initiation des Tumors führt, andererseits auch für die Promotion und Progression, als auch die Metastasierung ideale Bedingungen schafft. Es wird vermutet, dass Tumorzellen die gleichen Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren zur Migration nutzen, wie Leukozyten, was eine Metastasierung begünstigen kann (14).

Makrophagen, Zellen der granulozytären Entwicklungsreihe und Lymphozyten setzen Wachstums- und anti-apoptotische Faktoren, u.a. IL-4 und GM-CSF, sowie Zytokine, beispielhaft TNF- α , frei, welche eine Angio- und Lymphangiogenese (59) und die Zellzyklus-Progression verursachen und somit präkanzeröse Stadien der Zellen begünstigen.

Der pro-karzinogene Effekt wird bei wiederholter Schädigung und damit verbundener Entzündung verstärkt, beispielhaft hierfür wieder das Barrett-Adenokarzinom in Verbindung mit GERD (14; 42).

[Hier eingeben]

2.4 Die Rolle der Eukaryotischen Initiationsfaktoren in der Entzündung und Karzinogenese

In einigen Ländern haben sich die Überlebensraten bei Erkrankten mit Barrett-Adenokarzinom in den letzten Jahren verbessert, was auf eine frühe endoskopische Behandlung zurückzuführen ist, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt allerdings in den meisten westlichen Populationen immer noch unter 10 % (73).

eIFs sind Proteine, die an der Initiationsphase der eukaryotischen Translation und der Regulierung der Proteinsynthese beteiligt sind. Dreizehn Initiationsfaktoren sind derzeit bekannt und jedes von ihnen hat unterschiedliche Funktionen, u.a. die Bindung an die 40S-Untereinheit des Ribosoms, wodurch die ribosomale Rekrutierung vermittelt wird (67) oder sie sind für die Bildung und Stabilisierung des funktionellen Ribosoms um das Startcodon zuständig.

Die Translation wird in drei Phasen unterteilt: Initiation, Translation und Elongation.

Zu Beginn der Initiation benötigt die Zelle sowohl die ribosomalen Untereinheiten, die Initiator-tRNA und mRNA. Die 40S-Untereinheit des Ribosoms dockt am 5'-Ende-Cap-Struktur an der mRNA an und liest diese vom 5'Ende zum 3'Ende bis zum Basentriplett AUG, den Startcodon, ab. Den Komplex aus kleiner ribosomaler Untereinheit, der Initiator-tRNA und ausgewählten eukaryotischen Initiationsfaktoren, wie beispielsweise eIF2, bezeichnet man als Präinitiationskomplex. Nun bindet die mit Aminosäure beladene Initiator-Met-tRNA am Startcodon (AUG) an die mRNA. Nach Bindung der größeren ribosomalen Untereinheit (60S) beginnt der eigentliche Translationsvorgang.

Das Ribosom liest mRNA-Strang ab und koppelt eine beladenen tRNA so, dass die Basentriplets des Codons auf der mRNA mit dem Anticodon der tRNA korrespondieren und sich zusammenlagern können. Nun setzt sich eine zweite, mit Aminosäure beladene tRNA, deren Codon zum folgenden Anti-Codon passt, neben der ersten tRNA an die mRNA. Zwischen den Aminosäuren werden Peptidbindungen verknüpft und Initiator-tRNA verlässt ohne Aminosäure das Ribosom. Im Folgenden lagern sich nun weitere beladene, korrespondierende tRNA an, deren Aminosäuren wieder über Peptidbindung mit der vorherigen Aminosäure verknüpft werden. So verlängert sich die Kette Stück für Stück. Das Ribosom wandert auf der mRNA je Basentriplett einen Schritt weiter, solange bis das Leseraster auf das Stopcodon (z.B. UGA) trifft, an welches keine der vorliegenden tRNA-Molekülarten binden kann.

[Hier eingeben]

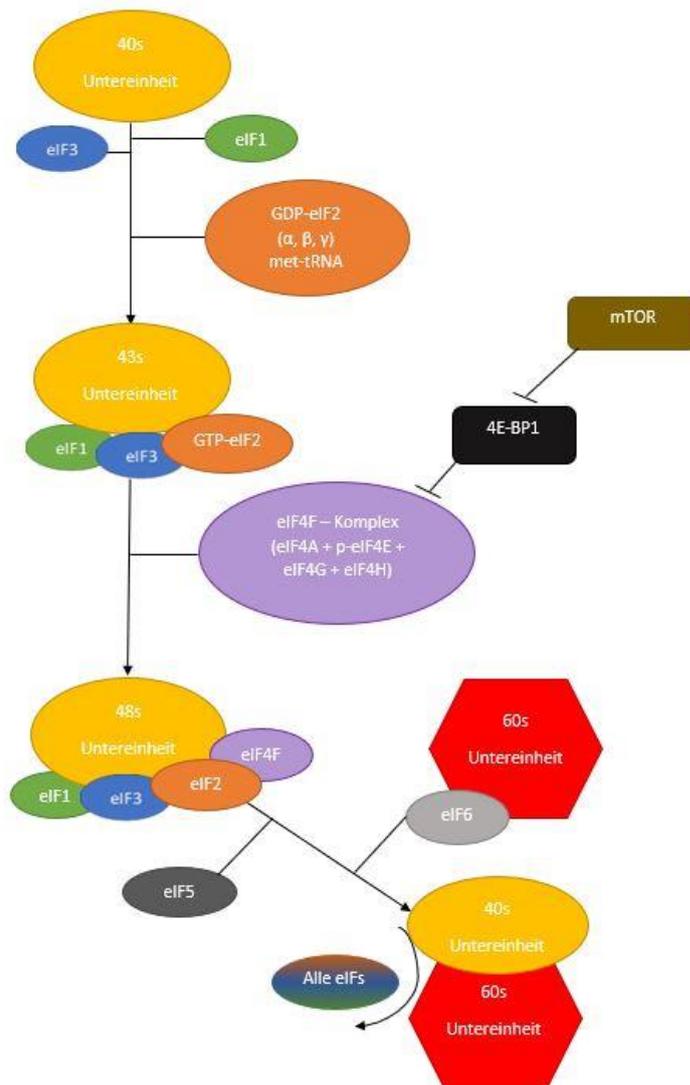


Abbildung 1: Die Rolle der eIFs in der Protein Translation. eIF1, eIF3 und GTP-gebundenes eIF2 docken an 40s Untereinheit des Ribosomen zur Bildung eines ternären Komplex (TC). eIF2-GDP liegt als inaktive Form vor, nach Austausch mit GTP und Bindung der met-tRNA kommt es zur Aktivierung. An den TC bindet der eIF4F-Komplex, bestehend aus eIF4A, p-eIF4E, eIF4G und eIF4H. Nachdem alle eIFs an die kleine ribosomale Untereinheit gebunden sind, bildet sich die 48s – Untereinheit, an diese fügt sich eIF5. eIF6 liegt gebunden an die 60s-Untereinheit vor, um eine zu frühe Bindung der beiden Untereinheiten zu verhindern. Nach Ablösen aller gebundenen eIFs Docken die ribosomalen Untereinheiten aneinander an und bilden eine Funktionseinheit. Quelle: Eigene Darstellung

[Hier eingeben]

2.4.1 eIF1

eIF1 interagiert mit der eukaryotischen kleinen (40S) ribosomalen Untereinheit und eIF3 (Abbildung 1) und ist Bestandteil des 43S-Vorinitiationskomplexes (PIC). eIF1 und eIF1A binden kooperativ an die 40S-Untereinheit, um eine "offene" Konformation des PIC während der Initiierung der eukaryotischen Translation zu stabilisieren (29).

In allen eukaryotischen Zellen beginnt die Initiierung der mRNA-Translation jedoch mit dem Scannen über ribosomale 43S-Vorinitiationskomplexe ab dem 5'-Ende der mRNA. Als nächstes ist eine Induktion über eIF1 und eIF1A erforderlich (81), um die Konformation der 40S-Untereinheit zu offenbaren, um die DEAD-Box-RNA-Helikase eIF4A, ihren Cofaktor eIF4B und die eIF4G-Aktivität zu induzieren.

Des Weiteren stellt eIF1 die Genauigkeit der Startcodon-Auswahl sicher (61). Es bindet zusammen mit eIF1A an den 40S-Untereinheit-mRNA-Komplex (Abbildung 1), was zu einer offenen Struktur des mRNA-Bindungskanal führt, der für die Startcodon-Identifizierung, den tRNA-Transport und das mRNA-Scanning entscheidend ist (66).

Die Deregulierung der Proteinsynthese, auch im Zusammenhang mit eIFs, hat bei verschiedenen Karzinomen in den letzten Jahren wachsende Aufmerksamkeit erweckt (82). In diversen Malignomen zeigte sich eine gesteigerte oder verminderte Expression von eukaryotischen Initiationsfaktoren (1). eIFs scheinen daher ein wichtiger Kontrollmechanismus während der Translation zu sein.

[Hier eingeben]

2.4.2 eIF2 α

Der eukaryotische Initiationsfaktor 2 (eIF2) reguliert die Initiation der Proteintranslation, indem er an Met-tRNA und das 40S-Ribosom bindet, um den Prä-Initiationskomplex zu bilden (3). eIF2 α ist hierbei lediglich eine der 3 Untereinheiten von eIF2.

Gallensäuren sind Bestandteile des Magen- und Zwölffingerdarm-Reflux und sind eine der Ursachen der Ösophagitis (55), die genaueren Mechanismen sind jedoch nach wie vor unbekannt. Nachweislich beeinflusst eine Untergruppe von physiologischen Gallensäuren den Protein-Sekretionsweg, indem durch Anhäufung fehlgefalteter Proteine ER-Stress induziert wird, die Unfolded Protein Response (UPR) aktiviert und der Zerfall des Golgi-Apparats in Ösophaguszellen verursacht wird (78).

Sobald der ER-Stress gelindert ist, wird eIF2 α dephosphoryliert und die Proteintranslation fortgesetzt. Salubrinal, ein Inhibitor der eIF2 α -Dephosphorylierung (7), hält diese Blockade in der Proteintranslation aufrecht.

Es konnte keine Wirkung auf die Struktur des Golgi-Apparates nachgewiesen werden, wenn die Epithelzellen des Ösophagus vorher mit Salubrinal behandelt wurden, es verringerte jedoch die durch Gallensäure-induzierte Golgi-Fragmentierung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Abschwächung der Dephosphorylierung von eIF2 α die Gallensäuren-vermittelte Fragmentierung des Golgi-Apparats inhibiert (7; 78).

2.4.3 eIF3

Ein weiterer eukaryotischer Initiationsfaktor, der für die meisten cap-abhängigen Translationen essentiell (31) ist, ist eIF3. Der größte eukaryotische Initiationsfaktor besteht aus 13 divergierenden Untereinheiten (a bis m) (10). Es bindet an die 40S-Untereinheit und andere eIFs (siehe Abb. 1), wie eIF1 oder eIF4g, und ist an fast allen Schritten der Translationsinitiation beteiligt (46), u.a. der Dissoziation des Ribosoms oder der Inhibition der Verbindung von 60S und 40S Untereinheiten(44). Wie eIF6 hemmt eIF3 die Akkumulation von Untereinheiten, allerdings nur die der 60S - Untereinheit.

Des weiteren interagiert eIF3 nachweislich mit eIF4E und S6K1 und stellt damit einen Bestandteil der mTOR-Kaskade dar (68). eIF3 bildet eine Art Grundgerüst mit mTOR und S6K1 (32), welches Rapamycin- und Growth Factor – sensibel reagiert. Während sich S6K1 hormonell beeinflusst vom Komplex löst, kommt es zur Assoziation zwischen mTOR und eIF3. In Folge der Kaskade kommt es zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von S6K1, sowie zur Phosphorylierung vom 40S Ribosom Protein S6 und eIF4B (32). Dies zeigt eine Interaktion zwischen mTOR, S6K1 und eIF3 (68; 86). Die Aktivierung von mTOR fördert Zellteilung- und Wachstum sowie die Proteinsynthese, eine Hyperaktivierung ist mit der Entstehung von Karzinomen assoziiert (28).

[Hier eingeben]

Für die Karzinogenese nachweislich relevante Untereinheiten sind eIF3h und eIF3c, welche im Endometriumskarzinom überexprimiert oder signifikant reduziert exprimiert sind (80) und p150, eine weitere Untereinheit, die auch in den Mamma-, Hals- und Kolonkarzinomen (30) überexprimiert wird. Erhöhte Bildung von p150 wurde auch im Adenokarzinom der Speiseröhre nachgewiesen (13).

2.4.4 eIF4E

Alle eukaryotischen mRNAs sind durch die 7-Methyl-Guanosin-Five-Prime-Cap-Struktur (m7GpppG'5) blockiert. Diese Struktur ist sowohl am Spleißen, RNA-Kerntransport, als auch der Stabilisierung von RNA beteiligt (71). eIF4E bindet an die m7GpppG'5-Struktur der mRNA und lenkt das Ribosom an die Cap-Struktur (6). Fast alle zellulären mRNAs erfordern, dass eIF4E in Protein übersetzt und synthetisiert wird, was bedeutet, dass eIF4E als einer der Schlüsselfiguren der Proteinsynthese fungiert.

eIF4E ist eng mit der Tumorbildung in der Weichteilregion des Gebärmutterhalses assoziiert (62). Die Überexpression von eIF4E führt zur onkologischen Transformation der beobachteten Säugetierzellen. Eine der Aufgaben von eIF4E ist die Synthese von VEGF und FGF, die für die Vaskulogenese und Angiogenese in Tumoren mitverantwortlich sind (93).

eIF4E ist Bestandteil der Downstream-Kaskade des mTOR-Signalweges. Die Serin / Threonin-Kinase mTOR, verantwortlich für die Phosphorylierung verschiedener Signalproteine, beeinflusst die Differenzierung, das Zellwachstum und die Zellproliferation. In der klinischen Praxis und *in vitro* ist mTOR ein Ziel von Rapamycin, einem Arzneimittel aus der Gruppe der Immunsuppressiva (37). Rapamycin führt über Komplexbildung mit mTOR zur Cytokin-vermittelten Hemmung zweier mTOR-Funktionen: Synthese des S6-Proteins und Bildung des Komplexes aus Cyclin E und p34. Dadurch verhindert Rapamycin (37) die Proliferation von T-Lymphozyten über mTOR und wirkt somit immunsuppressiv. Die Serin / Threonin-Kinase wirkt stimulierend auf das Wachstum von Krebszellen. Wie in klinischen Studien gezeigt wurde, zeigt Temsirolimus, ein anderer mTOR-Inhibitor, eine gute Wirksamkeit bei fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen. Eine durchschnittliche Überlebenszeit von ca. 10,9 Monaten versus 7,3 Monate (35) konnte nachgewiesen werden. Eine weitere Rolle spielt der mTOR-Weg bei gastrointestinalen Krebserkrankungen, beispielsweise dem Adenokarzinom des Ösophagus (49), die durch Übergewicht begünstigt werden und somit auch einen möglichen Ursprungspunkt in der Therapie darstellen (53).

In der Upstream-Kaskade von mTOR kommt es bei Überexpression von AKT, eIF4E und PI3K III zur vermehrten Bildung von Lymphknotenmetastasen (53).

Die mTOR-Kaskade und die damit verknüpften eukaryotischen Initiationsfaktoren beeinflussen entzündliche Prozesse. Bei einer durch Sepsis verursachten Muskelatrophie ist die

[Hier eingeben]

Proteinsynthese aufgrund der Hemmung von mTOR reduziert. Sepsis führt zu einer verminderten Phosphorylierung des Bindungsproteins für eIF4E (eIF4E-BP), was wiederum zu einer verstärkten Hemmung von eIF4E und mTOR führt (41). Die Hemmung von eIF4E führt zu einer verminderten Proteinsynthese im sarkoplasmatischen Retikulum und verursacht somit die durch Entzündung induzierte Muskelatrophie (4).

2.4.5 eIF5

Neben der Rolle als GTPase aktivierendes Protein für eIF2, hat eIF5 eine Scan-Funktion für Startcodons, aufgrund der selektiven AUG-Bindungsstelle (50). Des Weiteren wirkt eIF5 unterstützend bei der Rekrutierung des Präinitiationskomplexes für eIF5B (48). Damit hat eIF5 Relevanz für die Startcodon-Selektion und die Bindung der beiden ribosomalen Untereinheiten.

In einer vorangegangenen Studie wurde aufgezeigt, dass eIF5 gemeinsam mit eIF4E signifikant überexprimiert war in Mamma-Karzinomen von männlichen Patienten (36). Auch in immunhistochemischen Färbungen von hepatozellulären Karzinomen stellte sich eine verstärkte Anfärbung gegenüber nicht-neoplastischen Gewebe dar (20). Aus diesem Grund selektierten wir eIF5 als potenziell relevantes Markerprotein für das Barrett-Adenokarzinom.

2.4.6 eIF6

Das eIF6-Protein findet sich sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma und hat als wichtige Funktion die Verhinderung des verfrühten Aneinanderlagern der Ribosomuntereinheiten und ist Bestandteil der Biogenese der 60s-Untereinheit des Ribosomen (18). Aufgrund dessen erklärt sich, dass eIF6 als Regulator für die Proteintranslation fungiert und ein limitierender Faktor der Proteinsynthese ist (9). Der Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich gehen meist chronische Entzündungen mit kohärenten histologischen Veränderungen im Sinne von Meta- und Dysplasie voraus, die dem Barrett-Ösophagus ähnlich sind (5). Die anfängliche chronische Reizung führt zu einer anhaltenden Entzündung und einer damit verbundenen Veränderung des Epithels. eIFs spielen eine Rolle in der Regulation von Entzündungen und beeinflussen das Immunsystem. Die Expression von eIF6 ist u.a. stärker in Mastzellen, die dann zunehmend Immunmediatoren, wie Histamin und IL-2, emittieren, was möglicherweise zu allergischen Reaktionen führt. Beispielhaft wurde dies in Lungenzellen von Asthmapatienten nachgewiesen (65).

Zusammenfassend zeigt sich in Entzündungen und verschiedenen Krebsarten eine gesteigerte oder verminderte Expression von eukaryotischen Initiationsfaktoren (1). eIFs sind ein wichtiger Kontrollmechanismus in der Translation, unser Wissen über die Expression und Aktivität von eIFs in der Barrett-Karzinogenese ist jedoch aktuell noch begrenzt.

[Hier eingeben]

1.5. Zielstellungen

Alles in Allem fehlen noch Daten zur Rolle der Hoch- oder Herunterregulation von eIFs beim Barrett-Ösophagus, Metaplasie, Dysplasie oder Adenokarzinom. Die Studie konzentriert sich auf 8 ausgewählte eIFs mit Fokus auf eIF4E und eIF3a, da diese wahrscheinlich eine entscheidende Verbindung zwischen Entzündung und Tumoren darstellen. Anhand von Western Blots wird die Expression der eIFs in kommerziell erhältlichen humanen Zelllinien aus dem Barrett-Adenokarzinom (OE33), der Metastasen eines Lungenherdes (OACM5.1.C), der gesunden immortalisierten humanen Zelllinie aus der Schleimhaut der Speiseröhre (HEEC) und nicht-dysplastischer Metaplasie (CT-A) aus einem Ösophagus mit Barrett-Erkrankung untersucht. Die HEEC-Zellen dienen als Kontrollgruppe. Um zu überprüfen, ob die eIF eine Relevanz für humanes Gewebe haben, als Marker beispielsweise, wurde die immunhistochemische Färbung der ausgewählten eIFs an insgesamt 25 Proben von Patienten durchgeführt, die sich einer operativen Behandlung des Barrett-Ösophagus an der Abteilung Gastroenterologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zwischen 2003 und 2020 unterzogen haben. IHC-Färbungsexperimente für die ausgewählten eIFs ermöglichen es uns zu bestimmen, welche der ausgewählten Proteine im Barrett-Ösophagus (Metaplasie, Dysplasie und Karzinom) im humanen Gewebe dysreguliert sind. Die Auswertung der IHC-gefärbten Proben liefert auch Daten über ihre Verteilung in Ösophaguszellen. Die Informationen, die durch die IHC erhalten werden, können mit relevanten pathologischen und klinischen Merkmalen wie Tumorgrade oder Gesamtüberleben korreliert werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit Barrett-Adenokarzinom liegt bei weniger als 10%. Bei palliativen Maßnahmen überschreitet die Überlebenszeit selten mehr als ein halbes Jahr. Deswegen ist es wichtig, den Ansatz zu überprüfen, ob mittels eukaryotischen Initiationsfaktoren ein neuer Therapieansatz oder ein Screeningverfahren entwickelt werden könnte.

[Hier eingeben]

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Zelllinien

Als gesunde Kontrolle für die Zellkultur wurde die Zellreihe HEEC, die uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Alexander Link, Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R. für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie bereitgestellt wurde, verwendet.

Die Zelllinie OE33, auch bekannt als JROECL33, sowie die Zelllinie OACM5.1.C stammen aus der ECACC General Cell Collection von Public Heath England. Die OE33-Zellen wurde aus einem Adenokarzinom des unteren Ösophagus bei einer 73-jährigen Patientin mit Barrett-Metaplasie gewonnen. Die OACM5.1.C Zellen stammen aus einer Lymphknoten-Metastase eines primären Barrett-Adenokarzinom des distalen Ösophagus. Bei der CP-A Zelllinie, auch KR-42421 (ATCC CRL-4027), handelt es sich um Zellen der ösophagealen Schleimhaut mit nicht-dysplastischer Metaplasie. Sie wurden über LGC Standards GmbH erworben.

2.1.2. Untersuchungskollektiv zum Barrett-Ösophagus

Bei den 25 ausgewählten Barrett-Fällen handelt es sich um Patienten aus dem Kollektiv von Herrn Prof. Roessner und Frau Dr. med. Isabell Walter (Der Barrett-Ösophagus : eine immunhistochemische Untersuchung zum Expressionsverhalten der Marker CDX-2, Mucin 2, Mucin 5aC, Ki-67, Villin, Das-1 im Verlauf der Karzinogenese und Vergleich der intestinalen Metaplasien von Ösophagus und Kardia) bei denen im Zeitraum von 2005 bis 2013 eine mit dem Barrett-Syndrom assoziierte Metaplasie, Dysplasie oder Tumorerkrankung des Ösophagus diagnostiziert wurde, davon 4 mit Zylinderzellmetaplasie, je 5 mit intestinaler Metaplasie, low grade intraepitheliale Dysplasie oder high grade intraepitheliale Dysplasie und 6 Tumoranschnitte von Barrett-Karzinomen. Das Kollektiv stammte aus dem nicht selektierten fortlaufenden Eingangsgut des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg. Für die Barrett-assoziierten Kollektive wurde eine zugrundeliegende Entzündung anhand klinischer Angaben, vorrausgegangener bioptischer Befunde und aktueller histomorphologischer Veränderungen sichergestellt. Das endoskopisch gewonnene Material stammte aus dem Universitätsklinikum Magdeburg. Die Entnahme, Asservierung und Verwendung von Gewebe für unsere wissenschaftliche Studie wurde im Rahmen der Studien von Frau Walter von der Ethikkommission der Universität Magdeburg stattgegeben (Ethikvotum Nr. 33/2001). Bei der Kohorte erfolgte die makroskopische Begutachtung der Präparate und die Entnahme repräsentativer Proben aus dem Gewebe sowie von makroskopisch unauffälliger Schleimhaut entsprechend der interdisziplinären S2-Leitlinien für gastroösophagealer Karzinome. Fälle mit einem vererbaren Tumor-Syndrom, einer malignen Zweiterkrankung und einer präoperativ durchgeführten Radio- und/oder Chemotherapie wurden nicht in die Studie aufgenommen. Das für die Studie verwendete

[Hier eingeben]

Kollektiv der Barrett-assoziierte Dysplasien umfasste 10 Fälle aus dem Diagnosezeitraum 2008 bis 2013. Dabei handelte es sich um Schleimhautbiopsien mit jeweils 5 low-grade und 5 high-grade Dysplasien aus dem Universitätsklinikum Magdeburg. Es handelt sich hierbei um 2 weibliche Patientinnen im Alter von 78 und 86 Jahren und 8 männliche Patienten mit einer Altersspanne von 58 bis 91 Jahren. Das Kollektiv der Zylinderzellmetaplasie setzte sich aus von 4 Patienten (3 männlich, Alter: 69 bis 78 Jahre, 1 weiblich, Alter: 59 Jahre) in dem Zeitraum von 2009 bis 2012 am Universitätsklinikum Magdeburg endoskopisch gewonnenen Schleimhautbiopsien mit Zylinderzellmetaplasie zusammen. Die Kollektive der intestinalen Metaplasien umfassten ebenfalls 5 Fälle (eine weibliche Patientin mit drei Biopaten zu drei verschiedenen Zeitpunkten; zuletzt im Alter von 78 Jahren; zwei männliche Patienten im Alter von 59 und 71), die zwischen 2007 und 2012 untersucht wurden. Zusätzliches Kriterium zur Differenzierung zur Zylinderzellmetaplasie waren die hier vorkommenden Becherzellen in der Schleimhaut. Das Tumor-Kollektiv bestand aus 6 ausgewählten Fällen mit der Diagnose Barrett-Adenokarzinom. Alle Patienten waren männlich und in einem Alter zwischen 45 und 75 und wurden zwischen 2005 und 2013 diagnostiziert.

[Hier eingeben]

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Experimente

Die OE33-Zellen wurden in Zellkulturflaschen (ATCC 30-2001 500ml) mit sterilfiltriertem RPMI-1640 Medium mit L-Glutamin, HEPES und High Glucose, zugesetzt mit 10% fetalem Kälberserum (PAN P30-1502) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAN P06-07100), gezüchtet. Die OACM5.1.C-Zellen wurden in Zellkulturflaschen (ATCC 30-2001 500 ml) mit sterilfiltriertem RPMI-1640 Medium mit L-Glutamin, HEPES und High Glucose, ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum (PAN P30-1502) kultiviert. Die CP-A-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit MCDB-153 Medium (SIGMA M7402-L), ergänzt mit 0,4 ug/ml Hydrokortison, 20 ng/ml Recombinant Human Epidermal Growth Factor, 8,4 ug/L Cholera Toxin, 20 mg/L Adenin, 140 ug/ml Bovine Pituitary extract, 1x ITS Supplement und 4mM Glutamin, je zu einem Liter Medium. Die HEEC-Zellen wurden in CELLCOAT Collagen Typ I Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One 658950) mit Epithelial Cell Medium-2 (ScienCell #4121), ergänzt mit 1% Epithelial Cell Growth Supplement-2 (ScienCell #4162) und 1% Penicillin/Streptomycin (ScienCell #0503). Die Kulturflaschen für HEEC wurden vorher mit Collagen Typ I und PBS-Lösung beschichtet. Die Zellen aller genannten Zelllinien wurden bei einer Temperatur von 37 ° C, relative Luftfeuchtigkeit von 95% und einer Atmosphäre von 5% CO₂ in einem SCHRANK kultiviert. Zur Kryokonservierung wurden die Zellreihen nach passendem Protokoll geerntet und mit folgendem Frost-Medium-Ansatz in 1 ml Kryo-Röhrchen im - 150 C° Schrank bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt:

HEEC	Epithelial Cell Medium-2 15% DMSO 10% FBS 1 M HEPES
CP-A	RPMI-1640 mit Zusätzen (Gibco A10491-01) 10% DMSO 10% FCS
OE33	RPMI-1640 mit Zusätzen (Gibco A10491-01) 10% DMSO
OACM 5.1.C	RPMI-1640 mit Zusätzen 10% DMSO

[Hier eingeben]

Zur Kultivierung von HEEC, OACM, OE33 und CP-A-Zellen und etwaiger Z-Zellkulturen wurden die eingefrorenen Zellen je in einer 75 cm² Kulturflasche erneut ausgesät und wie im oben beschriebenen Medium kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage abhängig vom Wachstum der Zellen.

3.2.1.1 Zellkultur und Behandlungen

Der folgende Ablauf gilt für alle der verwendeten Zelllinien: HEEC, CP-A, OE33 und OACM5.1.C. Zur Subkultivierung wurde, nach Entfernen des Mediums und Waschen mit 1 x PBS, standardisiert 1,5 ml einer Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung in die 75cm²-Zellkulturflasche gegeben und 10 Sekunden bis zu 1 Minute inkubiert. Nach Entfernen der Trypsin/EDTA-Lösung wurde die Zellkulturflasche für 5 bis 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Aufnahme in 5 ml bis 10 ml des jeweiligen Mediums vorsichtig re-suspendiert und die Zellzahl wurde mithilfe des Countess 2 FL von Invitrogen 2-fach bestimmt. Zur weiteren Kultivierung in 75 cm² - Kulturflaschen wurden üblicherweise zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Zellen ausgesät und das Medium alle 2 bis 3 Tage, abhängig vom Wachstum, gewechselt. Die nächste Subkultivierung erfolgte nach 7 bis 9 Tage.

[Hier eingeben]

3.2.1.2 Zellpellets zur Gewinnung von DNA, RNA und Proteinen

3.2.1.2.1 Proteinisolierung

Die Proteinisolierung erfolgte nach dem Protokoll der Neuropathologie und wurde teilweise durch die AG Haybäck/Garbers angepasst. Zur Proteinextraktion wurden die Zellen auf Petrischalen (100 mm x 20 mm) (Corning #430167) kultiviert. Für die Zellernte wurde das alte Medium verworfen und die Zellen mit sterilen 1 x PBS (DPBS PAN P04-36500) zweimal gewaschen. Das PBS muss komplett abpipettiert und verworfen werden. Daraufhin wurde der Lysis-Puffer*, je nach Zelldichte, zugegeben und 10 bis 20 Minuten auf Eis inkubiert. Mit einem Zellschaber (Sarstedt 83.1830) wurden die Zellen manuell abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer Pipette abgenommen und in ein 2ml-Tube (Eppendorf 30120094) überführt. Die Zellsuspension ist mit 3 mal 10 Stößen mittels Ultraschalles denaturiert worden. Die Suspension wurde im Anschluss bei 10000 Umdrehungen pro Minute und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5403 von Eppendorf). Der Überstand wurde in ein 2ml-Tube überführt und entweder direkt zur Proteinbestimmung genutzt oder bei -80 ° C (PROFILINE ECU 5085-5) bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Zellernte erfolgte nach 24, 48 und 72 Stunden.

Lysispuffer	4M Harnstoff (Urea)	12,00	g
	0,5% SDS	0,25	g
	62,4mM Tris pH6,8	0,40	g
	ad 50 ml Aqua dest.		

Der Puffer wird auf pH 6,8 mit verdünnter HCL eingestellt und bei 4°C gelagert.

[Hier eingeben]

3.2.1.2.2 Proteinbestimmung

Die Standardreihe ist mit BSA (Bio-Rad ProteinAssay Standard II #5000007) und Aqua dest. aufgebaut.

Tabelle 1 - Standardreihe Konzentration

Konzentration	BSA (10 mg/ml)	Wasser
0	0	100
0,1	1	99
0,25	2,5	97,5
0,5	5	95
1	10	90
1,5	15	85
2	20	80
3	30	70

Die Standardreihe und die Proben-Lysate wurden nach dem Auftauen mit dem Vortex verwirbelt und kurz, mittels Micro Centrifuge (Roth), zentrifugiert. Beides wurde anschließend auf Eis gelagert. Auf eine 96-well Platte (Greiner 655180) wurde ein 25µl-Gemisch aus Reagenz A und S vorgelegt (BIO-RAD Protein Assay Reagent A #500-0113, Reagent S #500-0115). Aus dem Standard und den Lysat-Proben wurden je 5 µl in Doppelbestimmung einpipetiert. Nachfolgend 200 µl Reagenz B (BIO-RAD Protein Assay Reagent B #500-0114) pro Well hinzugefügt. Die 96-Well-Platte wurde bei 300 rpm für 15 Minuten auf dem Schüttler (IKA Schüttler MTS 4) inkubiert und daraufhin gemessen (Microplate Reader MRXTC DYNEX).

[Hier eingeben]

3.2.1.3 Western-Blot-Analysen

Zur Übertragung und Fixierung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membran als Trägermaterial dient der Western Blot. Anschließend wird eine Immundetektion durchgeführt. Die Proteinproben wurden gemäß ihrer molekularen Masse durch SDS-PAGE und zur Immunodetektion auf eine Membran (0,2µm Nitrocellulose Blotting Membran Amersham Protran 10600006 (200mmx4mm)) übertragen. Für die SDS-PAGE wurden 12,5% ige Gele im Bezug der molekularen Masse des Proteins gegossen. Die Proteinlysate wurden *mit*→ 2x LP und 5xLP versetzt und 5 Minuten lang bei 95°C denaturiert. Eine Gesamtproteinmenge von 25 µg wurde auf das Gel geladen. Die Elektrophorese wurde bei 30 mA für 15 Minuten und bei 30 mA für 45-60 min in 1x SDS-Laufpuffer (aus 10x Tris/Glycine/SDS 1610772 Bio-Rad) mit der Mini-Vertikal-Elektrophorese-Einheit (BioRad) durchgeführt. Als Molekulargewichtsmarker ist die Biotinylated Protein Ladder (Cell Signaling 81851) (8 µl) verwendet wurden. Als nächstes wurden die getrennten Proteine auf eine Nitrocellulose Blotting Membran (Amersham Protran 10600006) für bis zu 12 Stunden, unter Verwendung einer halbtrockenen Blotting-Einheit (BioRad) bei 30 V transferiert. Vor dem Elektrotransfer wurde die Membran in Transfer Puffer inkubiert. Der erfolgreiche Transfer wurde durch Ponceau Red-Färbung überprüft. Danach wurde die Membran mit 1x TBST gewaschen, bis die Färbung nicht mehr sichtbar war. Zur Immunodetektion wurde die Membran in 5% fettfreiem Trockenmilchpulver (Roth T145.2) mit TBS-Tween (0,1%, Applied Chemie) für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Dann wurde die Membran 3-mal für 5 Minuten mit 1x TBST gewaschen und im Anschluss mit dem jeweiligen primären Antikörper (siehe *Tabelle 2*) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut 3-mal mit TBS-Tween (0,1%) für 5 Minuten gewaschen und mit der sekundären Antikörperlösung Anti-biotin (Cell Signaling 7075P5) mit Anti-Rabbit (Cell Signaling 7074) (Verdünnung je nach Sekundär- Antikörper Angabe) 1h inkubiert. Die Entwicklung wurde unter Verwendung des Chemiluminescent HRP Substrates (Immobilon Western Millipore WBKLS0500) durchgeführt und kam zur Exposition gegenüber GeneGnome. Zusammenfassend: Anhand der eIF-Antikörper wurde in Vitro die Quantität der Proteine pro Zeitwert und Entzündungsstadium untersucht. Mittels SDS-Page wurden die Proteinprodukte aufgetrennt und daraufhin im Western Blot mit Antikörpern gegen die verschiedenen eIFs untersucht. Zeitabhängig stellte sich eine unterschiedlich starke Expression dar. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Anhand des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ wurde die Schwarz-Weiß-Farbtiefe der Proteinbande gegen verschiedene Hintergrundinformationen gemessen.

[Hier eingeben]

3.2.1.4 Verwendete Antikörper

Tabelle 2 - Verwendete Antikörper für die Western Blot Analysen

Antikörper	Firma	Best.-Nr.	Etablierte Verdünnung	Org.
eIF-1	Cell Signaling	#12496S	1:1000	Rabbit
eIF2 α	Cell Signaling	#5324S	1:1000	Rabbit
p-eIF2 α	Cell Signaling	#3398S	1:1000	Rabbit
eIF3A	Cell Signaling	#2538S	1:1000	Rabbit
eIF4E	Cell Signaling	#9742L	1:1000	Rabbit
eIF5	GeneTex	GTX114923	1:1000	Human
eIF5B	ThermoFisher	PA5-76006	1:1000	Rabbit
eIF6	Biomol	A303-030A-M	1:1000	Rabbit
β -Actin	ThermoFisher		1:10.000	Rabbit

3.2.2 Histologische und Immunhistochemische Experimente

3.2.2.1 Materialgewinnung, Fixierung, Einbettung

Die Gewebeproben wurden in 4%iger Formalinlösung fixiert und mittels Äthylalkohols und Xylols in aufsteigender Konzentration automatisiert entwässert (ASP 300S, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland), und in Paraffin eingebettet. Für die histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden Schnitte von 2-3 μ m Dicke angefertigt (Mikrotom RM 2155, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland). Als Übersichtsfärbung diente für alle Schnitte die standardisierte Hämatoxylin-Eosin-(H&E) -Färbung.

3.2.2.2 Immunhistochemische und histochemische Fixierung

Die immunhistochemische Detektion der Expression von eIF1, 2 α , eIF3a, eIF4E, eIF5B sowie eIF6 erfolgte an 2 μ m -dicken Paraffinschnitten. Das darauffolgende Procedere erfolgte unter standardisierten Automatenbedingungen im BenchMark® Ultra-Färbeautomaten (Ventana, Tucson, USA). Die Schnitte wurden zur Antigendemaskierung mit Cell Conditioning Solution® (CC1 Ventana) behandelt. Abhängig vom Antikörper wurden zur Hitzevorbehandlung die Methoden CC1 standard oder CC1 mild (eIF6) verwendet. Die Inkubationszeit mit dem jeweiligen Primäantikörper betrug für alle Antikörper 32 Minuten (Handauftrag). Die detaillierten Angaben zu den verwendeten Primäantikörpern sind *Tabelle 3* zu entnehmen. Das verwendete System UltraView DAB beinhaltet zur Detektion sowohl den HRP-markierten (Meerrettich-Peroxidase) Sekundäantikörper als auch das 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-haltige Chromogen und führt zu einem braunen

[Hier eingeben]

Präzipitat. Als Positiv- und Negativkontrolle der Antikörper wurde, soweit angegeben, dass von den Herstellern empfohlene Gewebe verwendet.

Tabelle 3 - Verwendete Antikörper für die immunhistochemische Färbung der ausgewählten Schnitte

Antikörper	Firma	Best.Nr.	etablierte Verdünnung	Methode	Färbeautomat
eIF1 Monoclonal (2B9)	Thermo Fischer	MA1-077	IHC-P: 1:3000 CC1mild	DAB	Benchmark Ultra
eIF2 α (D7D3) XP	Cell Signalling	#5324P	IHC-P: 1:2000 CC1mild	DAB	Benchmark Ultra
eIF3a	Thermo Fischer (Invitrogen)	PA5-31296	IHC-P: 1:100 CC1mild	DAB	Benchmark Ultra
eIF4E	Cell Signalling	#9742	IHC-P: 1:100 CC1mild	DAB	Benchmark Ultra
eIF5B	Thermo Fischer (Invitrogen)	PA5-36456	IHC-P: 1:50 CC1mild	DAB	Benchmark Ultra
eIF6	biomol/ BETHYL	A303-030A/M	IHC-P: 1:100 CC1mild	DAB	Benchmark Ultra

3.2.2.3 Beurteilung der immunhistochemische Reaktion

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbereaktion gegen die eIF-Antikörper erfolgte lichtmikroskopisch bei 200- und 400-facher Vergrößerung am Nikon, Eclipse NI (Nikon Germany) mit freundlicher Unterstützung von Kai Ina Eger, Universitätsklinikum Magdeburg. Es wurde jeweils die Verteilung und Intensität der Zellkerne und des Zytoplasmas der positiven Epithelzellen in der Ösophagusschleimhaut erfasst. Die Einteilung erfolgte für das Scoring anhand von 10er Schritten in Prozent (0-100%), das Grading von 0 bis 3, wobei „0“ für negatives Staining steht und 3 die stärkste Expression. Für die Färbungen gegen die eIFs wurde entsprechend der Literatur eine zytoplasmatische und nukleäre Expression der angegebenen Proteine als positiv gewertet.

3.2.2.4 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung wurde mit freundlicher Unterstützung von Frau Prof. Dr. Yvonne Garbers durchgeführt. Anhand der funktionalen univariaten Varianzanalyse (ANOVA) mit Post hoc-Vergleichen wurde die statistische Evaluation der verschiedenen Untersuchungsgruppen vorgenommen, um die Proteinexpression in den immunhistochemischen Begutachtungen zu beurteilen. Die Auswertung der Western Blot – Analysen erfolgte anhand densitometrischer

[Hier eingeben]

Messung mittels ImageJ und Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichung. Die Einteilung der Gruppen erfolgte anhand klinisch-pathologischer Diagnosen. Durch die Statistiksoftware IBM® SPSS® Statistics Version 22 wurden alle Daten analysiert. p-Werte <0.05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Aufgrund der Datenmenge wurden zur besseren Übersichtlichkeit jeweils nur die signifikanten Ergebnisse im Fließtext dargestellt.

[Hier eingeben]

4 Ergebnisse

Die Fragestellung meiner Doktorarbeit lautet, ob die Expression ausgewählter eukaryotischer Initiationsfaktoren im Barrett-Adenokarzinom samt vorheriger Entzündungsstufen verändert ist. Um dieses zu analysieren, wurden sowohl zellbiologische als auch immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. In den zellbiologischen Experimenten der Arbeit wurden Western Blots zu ausgewählten eIFs an etablierten Zelllinien durchgeführt, die verschiedenen Stadien des Barrett-Adenokarzinoms entsprechen: CP-A als nicht-dysplastische Metaplasie, OE33 als Zelllinie des Primums und OACM5.1.C als Zelllinie einer lymphnodalen Metastase. Als Kontrolle fungierte die Zelllinie HECC, bei der es sich um Zellen aus gesundem Ösophagusgewebe handelt. Im Rahmen der immunhistochemischen Arbeiten wurde Barrett-Gewebe (Metaplasie, Dysplasie sowie Karzinom) mittels eIF-Antikörper gefärbt, gescort und im Anschluss die Scoring-Ergebnisse statistisch ausgewertet und verglichen, um eine eventuelle signifikante Veränderung zu beweisen. Auch eine gesunde Kontrollgruppe bestehend aus Ösophagusgewebe, zusammengestellt aus Fällen des Eingangsguts des Instituts für Pathologie der Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R., wurde ursprünglich in die Studie mit aufgenommen, jedoch nicht mehr immunhistochemisch angefärbt und ausgewertet.

4.1 Ergebnisse der Zellkulturstudien

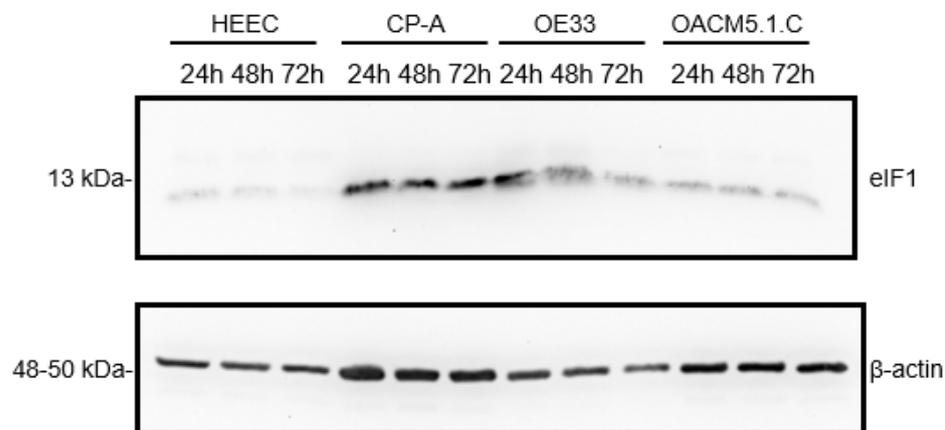
Nach Anzucht und Aussaat zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Zellen (gesunde Kontrolle, Metaplasie, Karzinom, Metastase) wurden diese nach 24h, 48h und 72h geerntet. Daraufgehend wurden Zelllysate hergestellt und diese dann in Bezug auf ihre steigende Malignität sowie Zeitwerte auf den Western Blot aufgetragen: HECC als gesunde Kontrolle, CP-A als nicht-dysplastische Metaplasie, OE33 als Zelllinie des Primums und OACM5.1.C als Zelllinie einer lymphnodalen Metastase.

Anhand der Zellkulturstudien sollte nachvollzogen werden, ob sich der Proteingehalt der ausgewählten eIFs während der Karzinogenese des Barrett-Adenokarzinoms verändert. Aufgrund dessen wurden die verschiedenen Zeitpunkte zur Zellernte gewählt, um festzustellen, ob es eine Veränderung der eIF-Expression nach den jeweiligen Stundenzeiten gibt.

[Hier eingeben]

4.1.1 Analyse der Expression von eIF1

A



B

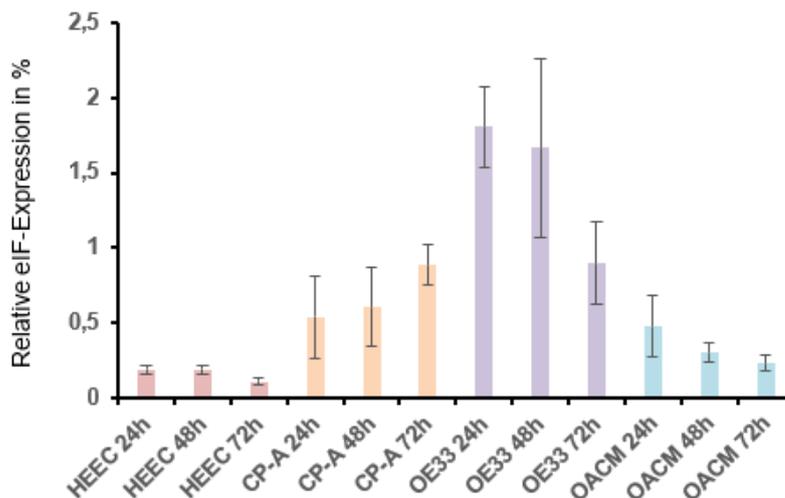


Abbildung 2: Analyse der Expression von eIF1 mittels Western Blot. (A) Analyse der Expression von eIF1 in HECC, CP-A, OE33 und OACM5.1.C Zellen. Die Zelllinien wurden jeweils 24h, 48h und 72h lang kultiviert und dann lysiert. Die Menge an β -Aktin wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung auf der gleichen Membran wie eIF1 detektiert. Gezeigt ist ein beispielhafter Western blot von drei durchgeführten. **(B)** Densitometrische Quantifizierung der eIF1-Menge in Relation zur Menge an β -Aktin der drei durchgeführten Western blots. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung.

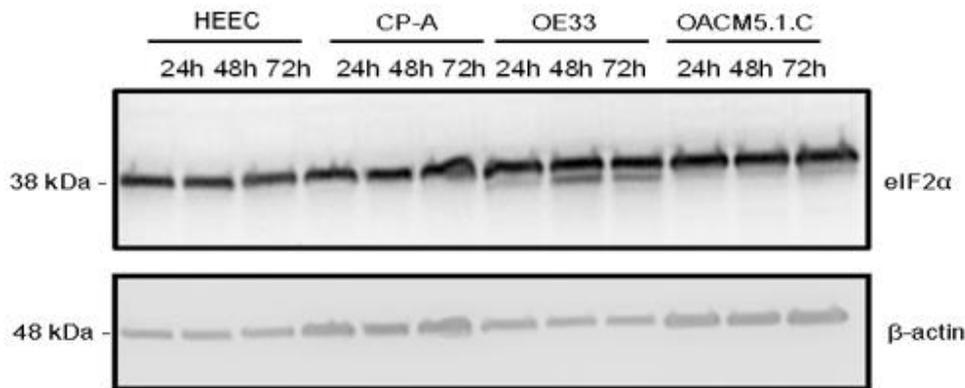
Der eIF1-Proteingehalt ist in der gesunden Kontrollzelllinie (HEEC) für alle drei gewählten Zeitpunkte (24h, 48h und 72h) gleich niedrig. Im Vergleich zur gesunden Kontrolle (HEEC) zeigt sich für alle Stundenwerte eine vermehrte Proteinexpression für die entzündliche Zelllinie (CP-A). Eine wiederum dazu erhöhte Proteinmenge an eIF1 lässt sich für die Karzinomzelllinie OE33 darstellen. Im Gegensatz dazu ist die Expression bei der Zelllinie OACM5.1.C (Metastase) wieder niedriger. In der Gesamtschau fällt auf, dass die Menge an eIF1 unabhängig von der Dauer der Kultivierung der Zelllinien ist. Interessanterweise weisen alle

[Hier eingeben]

drei Barrett-Zelllinien eine erhöhte Menge an eIF1 im Vergleich zur Kontrolle auf, was auf eine erhöhte Translation in den Tumorzelllinien hindeutet. Die Menge an eIF1 korreliert jedoch offenbar nicht mit den ansteigenden Stadien des Barrett-Adenokarzinoms

4.1.2 Analyse der Expression von eIF2 α

A



B

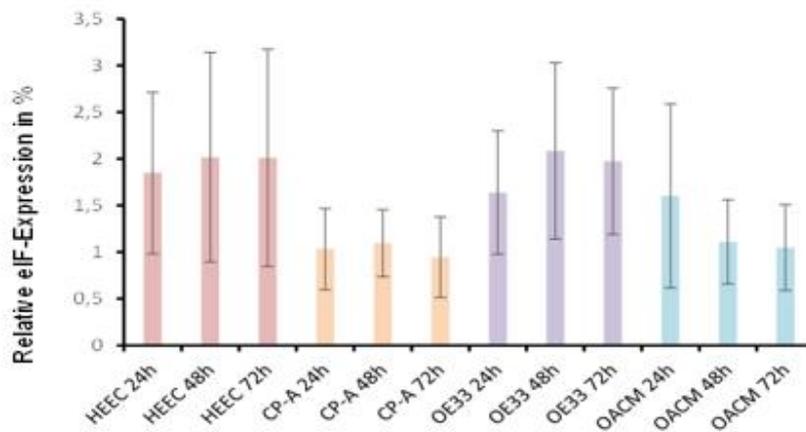


Abbildung 3: Analyse der Expression von eIF2 α mittels Western Blot. (A) –Analyse der Expression von eIF2 α in HECC, CP-A, OE33 und OACM5.1.C Zellen. Die Zelllinien wurden jeweils 24h, 48h und 72h lang kultiviert und dann lysiert. Die Menge an β -Aktin wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung auf der gleichen Membran wie eIF2 α detektiert. Gezeigt ist ein beispielhafter Western blot von drei durchgeführten. **(B)** Densitometrische Quantifizierung der eIF2 α -Menge in Relation zur Menge an β -Aktin der drei durchgeführten Western blots. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung.

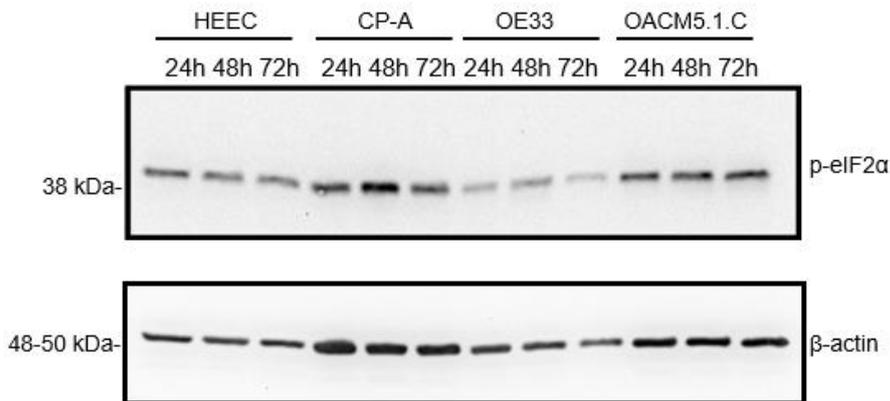
Die Auftragung der Western Blots für eIF2 α erfolgte analog zu eIF1. Nach Kontrastauswertung von eIF2 α / β -Aktin stellt sich folgendes Expressionsmuster dar (vgl. Abbildung 3). Die gesunde Kontrolle (HECC) hat zu allen drei Zeitpunkten eine annähernd gleiche Proteinmenge an eIF2 α . Im Entzündungsstadium (CP-A) nimmt der Gehalt an Protein ab und ist gleichbleibend. Nach Entartung der Zellen zu einem Malignom (OE33) steigt die Proteinmenge erneut auf ein ähnlich hohes Level wie in den gesunden Zellen wieder an. Das Maximum wird nach 48h

[Hier eingeben]

erreicht. In der Metastase (OACM5.1.C) sinkt der Gehalt an eIF2 α erneut, erreicht ein Minimum nach 48 Stunden. Nach 72 Stunden ist die Proteinmenge konstant geblieben.

4.1.3 Analyse der Expression von p-eIF2 α

A



B

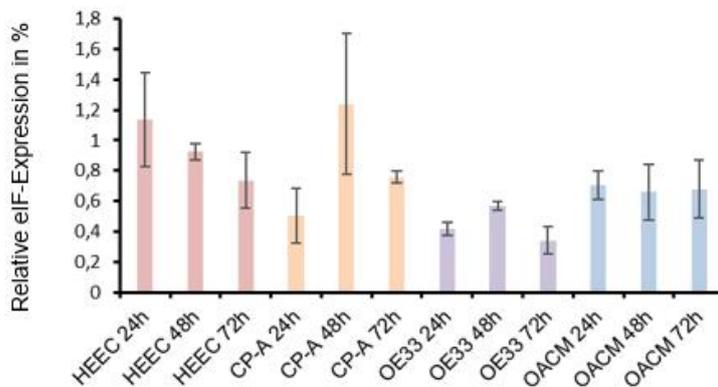


Abbildung 4: Analyse der Expression von p-eIF2 α mittels Western Blot. (A) –Analyse der Expression von p-eIF2 α in HECC, CP-A, OE33 und OACM5.1.C Zellen. Die Zelllinien wurden jeweils 24h, 48h und 72h lang kultiviert und dann lysiert. Die Menge an β -Aktin wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung auf der gleichen Membran wie p-eIF2 α detektiert. Gezeigt ist ein beispielhafter Western blot von drei durchgeführten. **(B)** Densitometrische Quantifizierung der p-eIF2 α -Menge in Relation zur Menge an β -Aktin der drei durchgeführten Western blots. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung.

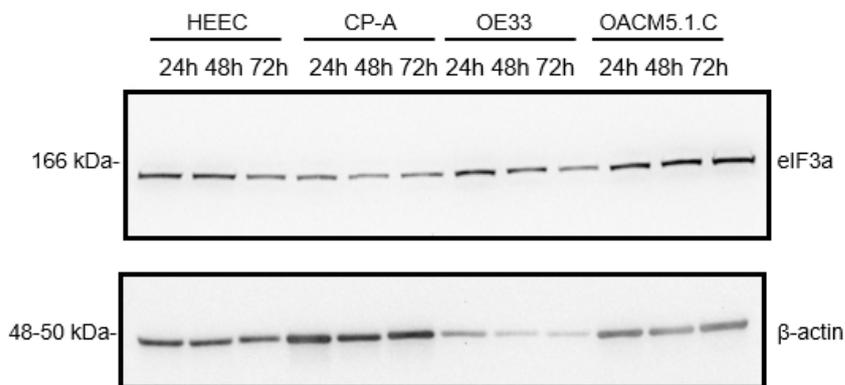
Die Schwarz-Weiß-Dichtemessung zeigt bei allen Stundenwerte und Zelllinien für p-eIF2 α ein inhomogenes Expressionsmuster. Die im Durchschnitt höchste Proteinexpression stellt sich in den entzündlich veränderten Ösophaguszellen (CP-A) nach 24 Stunden dar, ein annähernd ähnlich hoher Wert präsentiert sich für den 24-Stunden-Checkpoint in der gesunden Kontrolle (HEEC). Die niedrigste Proteinmenge an phosphorylierten eIF2 α findet sich in den Barrett-

[Hier eingeben]

Karzinomzellen nach 72 Stunden. Ein annähernd gleichbleibendes Level an eIF-Protein-Gehalt wurde in der Metastasen-Zelllinie (OACM5.1.C) gemessen. Zusammenfassend zeigt sich eine Verminderung der ermittelten p-eIF2 α -Menge in den OE33-Zellen im Vergleich zur Kontrolle, was auf eine verminderte Phosphorylierung von eIF2 α durch die Kinase in Karzinomzellen deuten kann. Es gibt keinen Zusammenhang zwischen den gemessenen Zeitpunkt und steigenden Malignitätsgrades.

4.1.4 Analyse der Expression von eIF3a

A



B

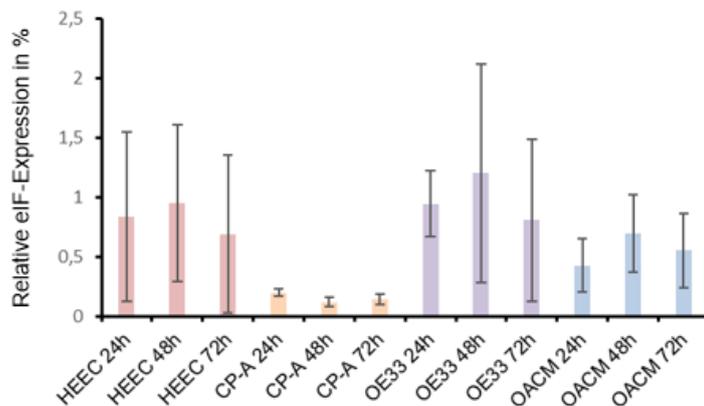


Abbildung 5: Analyse der Expression von eIF3a mittels Western Blot. (A) –Analyse der Expression von eIF3a in HECC, CP-A, OE33 und OACM5.1.C Zellen. Die Zelllinien wurden jeweils 24h, 48h und 72h lang kultiviert und dann lysiert. Die Menge an β -Aktin wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung auf der gleichen Membran wie eIF3a detektiert. Gezeigt ist ein beispielhafter Western blot von drei durchgeführten. **(B)** Densitometrische Quantifizierung der eIF3a-Menge in Relation zur Menge an β -Aktin der drei durchgeführten Western blots. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung.

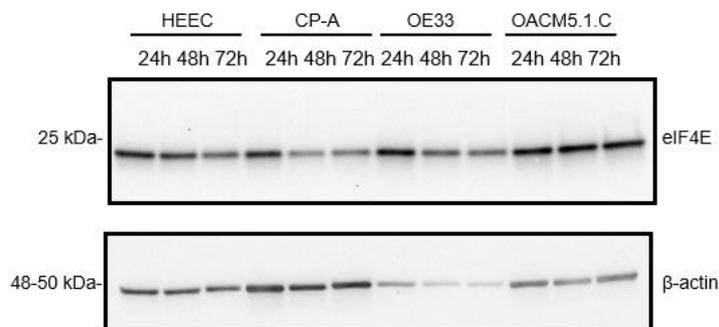
Nach analoger Auftragung der Zelllinien und anschließender Dichteanalyse der Western Blots zu eIF3a stellt sich folgendes Expressionsmuster dar (siehe Abbildung 5). Die CP-A Zellen

[Hier eingeben]

(nicht-dysplastische Metaplasie) exprimieren den insgesamt niedrigsten Proteingehalt für eIF3a. Für die Kontrollzelllinie, die Zellen der Metastasen (OACM5.1.C) und die Karzinomzellen zeigen sich im Durchschnitt ähnlich hohe Werte für alle Zeitpunkte. In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich darauf schließen, dass eIF3a während der ablaufenden Entzündung (Metaplasie – CP-A) niedriger exprimiert wird, als in anderen Krankheitsstadien. Im Gegensatz zu vorherigen Studien (23) zeigt sich für Barrett-Karzinomzellen offensichtlich keine erhöhte Expression der Untereinheit eIF3a, was wiederum gegen eine vermehrte Bildung von eIF3 und somit eine verstärkte Translationsinitiationsrate spricht. Fraglich bleibt, ob die verminderte Proteinmenge an eIF3a tatsächlich in Assoziation mit der ablaufenden Entzündung in den CP-A-Zellen steht.

4.1.5 Analyse der Expression von eIF4E

A



B

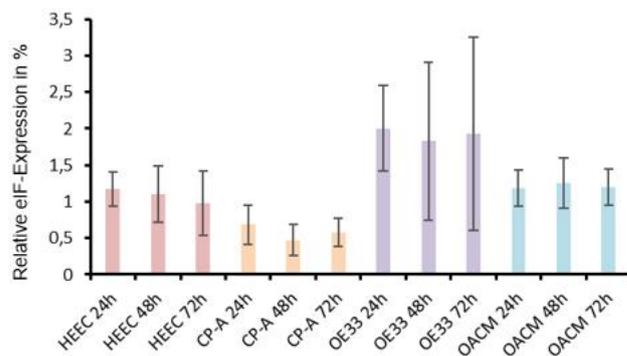


Abbildung 6: Analyse der Expression von eIF4E mittels Western Blot. (A) –Analyse der Expression von eIF4E in HECC, CP-A, OE33 und OACM5.1.C Zellen. Die Zelllinien wurden jeweils 24h, 48h und 72h lang kultiviert und dann lysiert. Die Menge an β -Aktin wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung auf der gleichen Membran wie eIF4E detektiert. Gezeigt ist ein beispielhafter Western blot von drei durchgeführten. **(B)** Densitometrische Quantifizierung der eIF4E-Menge in Relation zur Menge an β -Aktin der drei durchgeführten Western blots. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung.

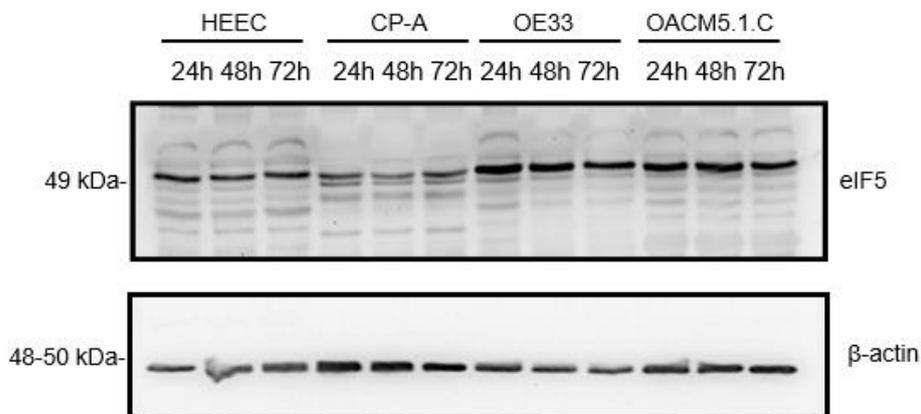
eIF4E wird im Vergleich zur gesunden Kontrolle (HECC) deutlich vermehrt in den Karzinom-Zellen (OE33) zu allen Stundenzeiten gebildet. In den entzündlich veränderten Zellen (CP-A)

[Hier eingeben]

scheint die eIF4E- Proteinmenge am geringsten im Vergleich aller Stundenwerte und Zelllinien, ähnlich den Western blots von eIF3a. Der Gehalt an eIF4E nimmt in der Metastase (OACM5.1.C) wieder leicht ab, ähnlich der Menge der gesunden Kontrolle. Zusammenfassend zeigt sich eine erhöhte Menge von eIF4E in Malignomzellen des Primums im Vergleich zur Kontrolle, was für eine verstärkte Transkription von eIF4E spricht. Dies führt wiederum zu einer selektiv vermehrten Translation von mRNAs, welche eine eIF4E-sensible Struktur tragen und in die Tumorgenese involviert sind (39). Analog zu eIF3a scheint es zu einer verminderten Bildung von eIF4E-Protein in entzündlich veränderten Zellen zu kommen.

4.1.6 Analyse der Expression von eIF5

A



B

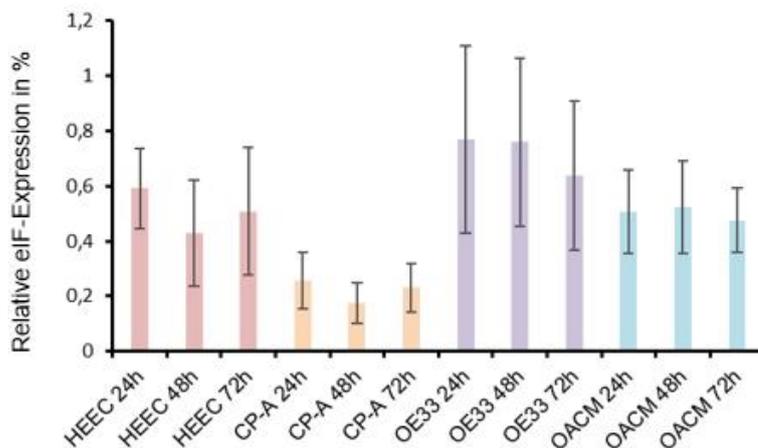


Abbildung 7: Analyse der Expression von eIF5 mittels Western Blot. (A) –Analyse der Expression von eIF5 in HECC, CP-A, OE33 und OACM5.1.C Zellen. Die Zelllinien wurden jeweils 24h, 48h und 72h lang kultiviert und dann lysiert. Die Menge an β -Aktin wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung auf der gleichen Membran wie eIF5 detektiert. Gezeigt ist ein beispielhafter Western blot von drei durchgeführten. **(B)** Densitometrische Quantifizierung der eIF5-Menge in Relation zur Menge an β -Aktin der drei durchgeführten Western blots. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung.

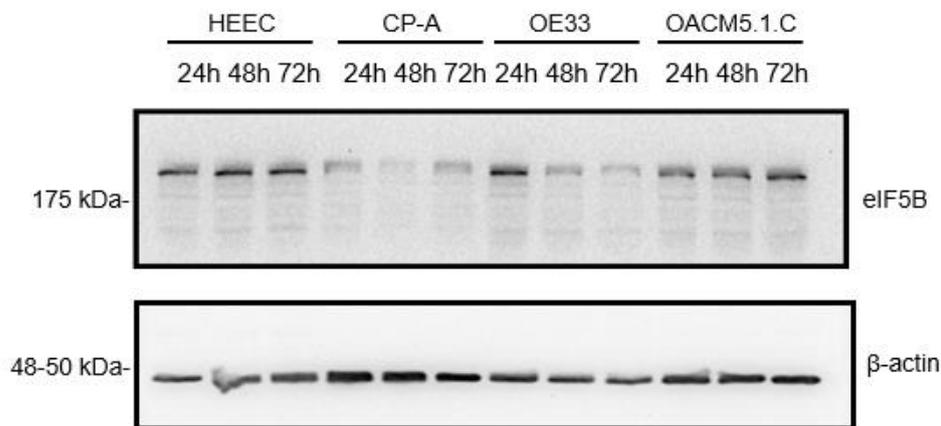
[Hier eingeben]

Auch die gemessenen Proteinwerte der Lysate für eIF5 zeigen ein vergleichbares Bild wie eIF4E (siehe Abbildung 6 und 7). Zunächst bleibt die Menge an eIF5 in der gesunden Kontrolle für alle Zeitpunkte auf einem konstanten Level, um dann im Prozess der Entzündung (CP-A) auf ein erneut beständiges Level abzunehmen. Der Proteingehalt steigt dann in den Karzinomzellen (OE33) an, um in den Zellen der Metastase (OACM5.1.C) wieder auf Niveau der gesunden Kontrolle abzusinken. Im Vergleich der einzelnen Stundenwerte zeigt sich innerhalb der Zelllinien kein signifikanter Unterschied, die Menge an eIF5 ist während der drei Stunden-Checkpoints annähernd gleichbleibend. Auffallend auch hier in der Zusammenschau der Ergebnisse die merklich erhöhte Menge an eIF5 in der OE33-Zelllinie im Vergleich zu den HEEC-Zellen, was erneut für eine vermehrte Transkription in den Zellen des Primums spricht.

[Hier eingeben]

4.1.7 Analyse der Expression von eIF5B

A



B

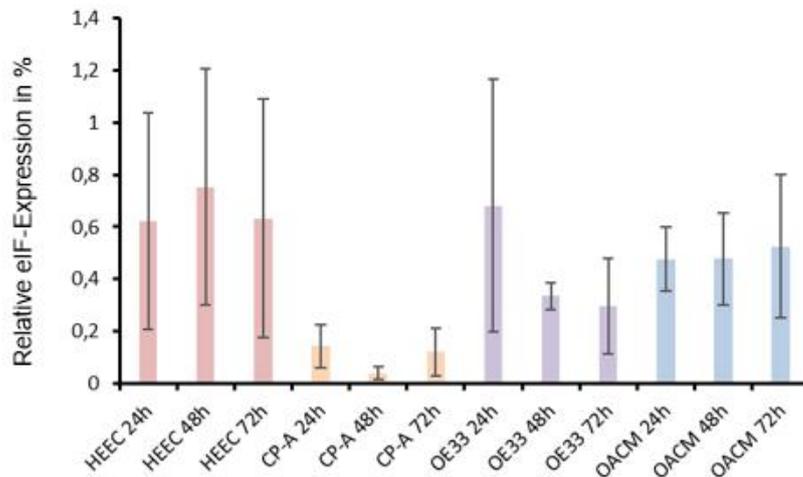


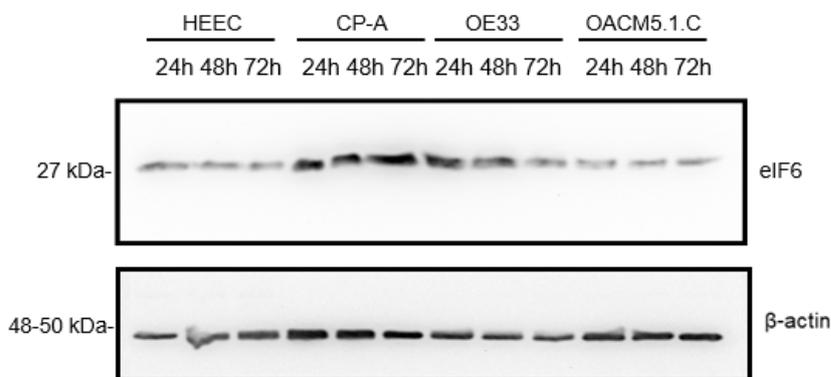
Abbildung 8: Analyse der Expression von eIF5B mittels Western Blot. (A) –Analyse der Expression von eIF5B in HECC, CP-A, OE33 und OACM5.1.C Zellen. Die Zelllinien wurden jeweils 24h, 48h und 72h lang kultiviert und dann lysiert. Die Menge an β -Aktin wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung auf der gleichen Membran wie eIF5B detektiert. Gezeigt ist ein beispielhafter Western blot von drei durchgeführten. **(B)** Densitometrische Quantifizierung der eIF5B-Menge in Relation zur Menge an β -Aktin der drei durchgeführten Western blots. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung.

[Hier eingeben]

Nach Analyse der Expression von eIF5B präsentiert sich folgendes Bild (siehe Abbildung 8). Die Menge von eIF5B ist gleichbleibend über 72 Stunden innerhalb der Zelllinien HEEC, CP-A und OACM5.1.C. Lediglich in den Karzinomzellen (OE33) zeigt sich nach 48 Stunden eine kontinuierliche Abnahme von eIF5B. Der insgesamt niedrigste eIF5B-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle findet sich in den Lysaten der Metaplasie-Zellen (CP-A). Abermals scheint es zur verminderten Transkription der eIF5B-Gene und anschließenden Translation während der ablaufenden Entzündung zu kommen. Des Weiteren präsentiert sich keine signifikante Erhöhung des eIF5B-Gehaltes in den Karzinom- oder Metastasenzellen im Vergleich zu Kontrolle, somit korreliert dieser nicht mit fortschreitendem Krankheitsstadium.

4.1.8 Analyse der Expression von eIF6

A



B

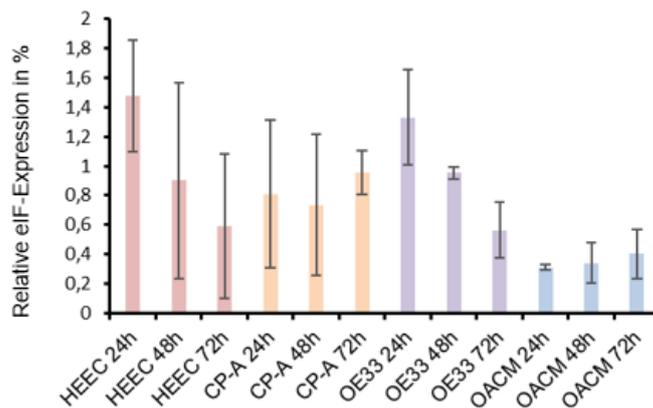


Abbildung 9: Analyse der Expression von eIF6 mittels Western Blot. (A) –Analyse der Expression von eIF6 in HECC, CP-A, OE33 und OACM5.1.C Zellen. Die Zelllinien wurden jeweils 24h, 48h und 72h lang kultiviert und dann lysiert. Die Menge an β -Aktin wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung auf der gleichen Membran wie eIF6 detektiert. Gezeigt ist ein beispielhafter Western blot von drei durchgeführten. **(B)** Densitometrische Quantifizierung der eIF6-Menge in Relation zur Menge an β -Aktin der drei durchgeführten Western blots. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung.

[Hier eingeben]

Die Western Blot - Auftragung für eIF6 erfolgte analog zu den vorherig untersuchten eIFs. Es präsentierte sich eine Tendenz zur Abnahme der Proteindichtewerte der Zelllinien HEEC (Kontrolle) und OE33 (Karzinom) nach jeweils 24-Stunden-Intervallen in der Zellkultur. Die Proteinexpression in den Entzündungszellen (CP-A) ist annähernd gleichbleibend, ähnlich der in den Zellen der OACM-Linie (Metastase), wobei hier die Proteindichte jedoch generell vermindert ist im Vergleich zur Kontrolle (HEEC) für alle Stundenwerte. Es zeigt sich kein Zusammenhang zwischen eIF6-Gehalt in den Zellen und den steigenden Malignitätsgrad.

Zusammenfassend gibt es keine direkten Hinweise für einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen den zeitlichen Ablauf der Karzinogenese und der Expression der eIFs. Bei einzelnen eIFs scheint es eine erhöhte Expression von Proteinen in Malignomzellen im Vergleich zur gesunden Kontrolle geben, beispielsweise im Kolorektal- (22), Lungen- (34) Ovarialkarzinomen (69) oder Melanomen (90). Es gibt jedoch keine offensichtliche zunehmende Tendenz während der Karzinogenese von der gesunden Kontrolle über die Entzündung bis zur Metastase in jeweils 24-Stunden-Intervallen. Bei allen Western Blot versuchen zeigte die Zelllinie CP-A eine im Vergleich generell niedrige Expression über alle eIFs. Dieses kann mit der Entzündung zusammenhängen, aber auch ein Spezifikum dieser metaplastischen CP-A-Zelllinie sein. Möglich wäre auch, dass CP-A unüblich viel β -Actin im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien exprimiert, was zu diesem Effekt führt. Allerdings wurde in allen Lysaten die Proteinmenge bestimmt und immer gleiche Mengen aufgetragen, was dieses Problem ausschließen sollte. Hieraus ergibt sich auch eine Limitation der Studie. Es wurde lediglich einer Zelllinie pro Erkrankungsstufe untersucht; für Ergebnisse, die wirklich repräsentativ für die einzelnen Krankheitsstufen sind müssen in der Folge noch weitere geeignete Zelllinien untersucht werden.

Eine andere Herangehensweise hätte die Kultivierung von Zelllinien derselben Bedingung und die darauffolgende Bestimmung der Proteinmengen der einzelnen eIFs sein können. Somit wäre ein direkter Vergleich von verschiedenen ösophagealen Metaplasie- oder Malignomzellen möglich gewesen. Überlegt wurde im Rahmen der Studie auch, ob es eine unterschiedliche Expression der Proteine in verschiedenen Malignomarten des Ösophagus gibt (Plattenepithelkarzinom versus Adenokarzinom). Aus fehlenden zeitlichen Ressourcen wurde jedoch davon abgesehen, weitere Zellexperimente vorzunehmen.

[Hier eingeben]

4.2 Ergebnisse der immunhistologischen Expressionsanalyse

In allen Kollektiven wurde die Expression der eIFs durch zwei unabhängige Untersucher ausgewertet, sowohl nuklear als auch zytoplasmatisch. Es zeigte sich Positivität in beiden Zellkompartimenten durch braune Präzipitate. Ausschließlich die Expression im Ösophagus-Epithel floss in die Wertung ein. Nach immunhistochemischer Färbung zeigten sich Expressionsmuster im Gewebe, die im folgenden Kapitel repräsentativ gezeigt werden.

Als wichtige Limitation der Untersuchungen ist anzumerken, dass die Stichprobenzahl von 4 bis 6 Fällen pro Kollektiv sehr gering ist und damit die Repräsentativität deutlich eingeschränkt ist. Gründe hierfür waren unter anderem das begrenzte Material an Gewebe, welches zur Verfügung stand als auch der zeitliche Faktor im Rahmen des Schneide- und Färbeprozesses.

4.2.1 Expressionsanalyse der eukaryotischen Initiationsfaktoren

Im folgenden Kapitel werden repräsentativ HE- und IHC-Schnitte der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz dargestellt, um zu verdeutlichen, auf welche Merkmale bei der Auswertung geachtet wurde.

Die Krankheitsstadien wurden für jeden eIF nach immunhistochemischer Färbung durch zwei unabhängige Untersucher mikroskopisch ausgewertet. Anschließend wurden die ausgewählten Subkategorien „Nuklearer Score“, „Nuklearer Grade“, „Zytoplasmatischer Score“ und „Zytoplasmatischer Grade“ untereinander verglichen und die Abweichungen der Stadien zueinander auf Signifikanz geprüft.

[Hier eingeben]

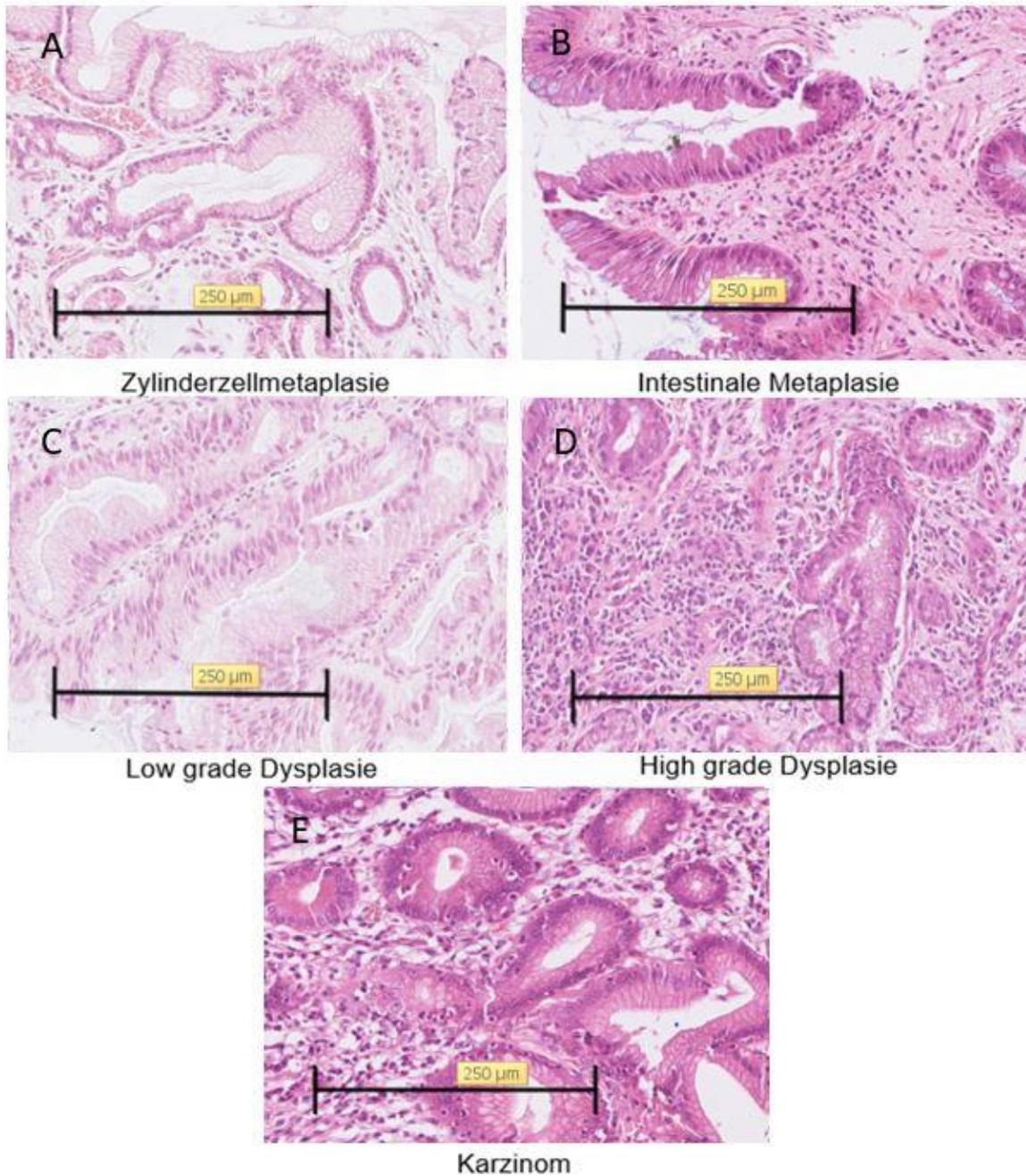


Abbildung 10 A-E: Exemplarische HE-Schnitte in 8,5-fachen Zoom (NDP.View 2) mit der Kennzeichnung des Maßstabes 250 μm aus dem Kollektiv der Barrett - Karzinom - Sequenz mit ansteigender Malignität aus dem Eingangsgut des Institutes für Pathologie Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R. Abbildung A – Zylinderzellmetaplasie (HE); Abbildung B – Intestinale Metaplasie (HE); Abbildung C – Low grade Dysplasie (HE); Abbildung D – High grade Dysplasie (HE) und Abbildung E – Barrett-Karzinom (HE).

Die exemplarischen Patientenproben aus Abbildung 10 A-E wurden mit Hämatoxylin-Eosin im Immunhistochemischen Labor des Institutes für Pathologie Universitätsklinikum Magdeburg gefärbt. Hierbei handelt es sich um Gewebe, welches den verschiedenen Stadien des Barrett-Ösophagus zugeordnet wurde. Anschließend wurden die Schnitte mit eIF-Antikörper angefärbt und die Intensität der immunhistochemischen Färbung beurteilt. Die Zylinderzellmetaplasie (Abbildung 10 A) zeigt neben dem organotypischen Plattenepithel, Epithelzellen mit einer

[Hier eingeben]

zylinderartigen Morphologie ohne Becherzellen. Es finden sich basal nur wenige Entzündungszellen. Die intestinale Metaplasie (Abbildung 10 B) zeichnet sich durch das Vorhandensein von Zylinderepithel vom intestinalen Typ mit Becherzellen aus, welche sich in der Abbildung durch das teils helle Zytoplasma erkennen lassen.

Die low grade intraepitheliale Dysplasie (Abbildung 10 C) zeigt mehrreihiges Zylinderepithel mit basophilem Zytoplasma und nur leichten Kernatypien.

Abgrenzend dazu stellt sich in Gewebe mit high grade intraepitheliale Dysplasie (Abbildung 10 D) deutlich dysplastischen Drüsen dar, welche eine unregelmäßige Architektur und hyperchromatischen, vergrößerten Zellkerne mit prominenten Nukleolen präsentieren. In der basalen Struma findet sich dichtes Infiltrat aus Entzündungszellen.

Im Adenokarzinom des Ösophagus (Abbildung E) präsentieren sich Tumorzellen die Tumordrüsen polymorph und die Kern-Zytoplasma Relation ist deutlich zu Gunsten des hypochromen Kerns verschoben. Das eosinophile Tumorstruma ist mit reichlich Entzündungszellen durchzogen. Im Gegensatz zur intraepithelialen Dysplasie kommt es beim Karzinom zur Invasion in die Muscularis mucosae beziehungsweise zumindest in die Submukosa.

Die folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der einfaktoriellen ANOVA mit anschließendem Post-Hoc-Test nach Bonferroni je untersuchten eIF; die Tabellen zu den multiplen Vergleichen finden sich für alle eukaryotischen Initiationsfaktoren im Anhang. Ebenso finden sich im folgenden Kapitel repräsentativ IHC-Schnitte der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz um zu verdeutlichen, auf welche Merkmale bei der Auswertung geachtet wurde.

Die Krankheitsstadien wurden jeweils pro eIF untereinander verglichen für die jeweiligen Subkategorien „Nukleärer Score“, „Nukleärer Grade“, „Zytoplasmatischer Score“ und „Zytoplasmatischer Grade“ und die Abweichungen auf Signifikanz geprüft.

[Hier eingeben]

4.2.2 eIF1

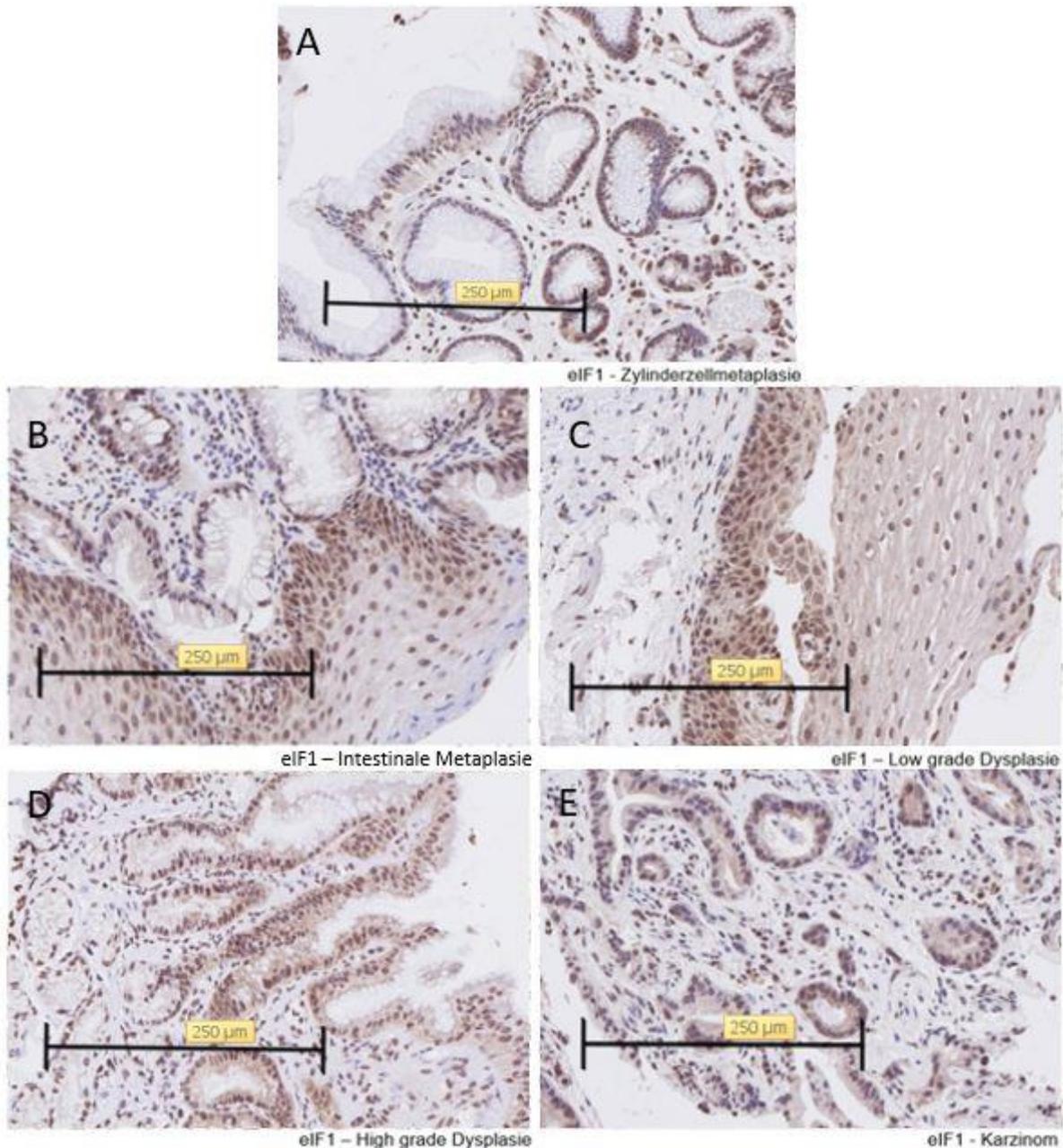


Abbildung 11 A-E: Immunhistochemische Schnitte mit eIF1 – Färbung in 8,5-fachen Zoom (NDP.View 2) mit der Kennzeichnung des Maßstabes 250 µm aus dem Kollektiv der Barrett - Karzinom - Sequenz mit ansteigender Malignität aus dem Eingangsgut des Institutes für Pathologie Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R. Abbildung A – Zylinderzellmetaplasie; Abbildung B – Intestinale Metaplasie; Abbildung C – Low grade intraepitheliale Dysplasie; Abbildung D – High grade intraepitheliale Dysplasie und Abbildung E – Barrett-Karzinom. Zu sehen sowohl die zytoplasmatische als auch nukleäre Färbung gegen eIF1 anhand brauner Präzipitate. Die Intensität wurde von 0 (negativ), 1 (schwache Expression), 2 (mittlere Expression) zu 3 (starke Expression) vorgenommen.

In Abbildung 11 A – E sind die verschiedenen Erkrankungsstadien der Barrett-Sequenz mit eIF1-Färbung dargestellt. Man sieht deutlich die braune Anfärbung sowohl zytoplasmatisch als auch im Zellkern. Dazwischenliegend im Struma blau-angefärbte Zellen (negativ). Abbildung 11 A zeigt die Zylinderzellmetaplasie im Ösophagusgewebe. Die Zellen präsentieren eine längliche Form und im Gewebe sind keine Becherzellen ausgebildet. Man

[Hier eingeben]

sieht sowohl positiv angefärbte Zellkerne als auch Zytoplasma mittels brauner Färbung. Dazwischenliegend immer wieder basophile (blaue) Bereiche, welche als negativ zu werten sind. Zu sehen in Abbildung 11 B ist eine intestinale Metaplasie. Hierbei abzugrenzen von der Zylinderzellmetaplasie durch das Vorhandensein von Becherzellen, den im Epithel vorhanden Zellen mit schleimgefüllten und geweitetem Zellkörper. Auch hier immer wieder dazwischenliegend negative („blaue“) Bereiche im Stroma aber auch epithelial im Plattenepithel, abwechselnd mit Bereichen durchzogen von braunen Präzipitaten, welche als positiv gewertet wurden. Abbildung 11 C präsentiert eine low grade intraepitheliale Dysplasie mit leichten Kernveränderungen vor allem im basalen Bereich des Plattenepithels, welches durch den eIF1-Marker positiv angefärbt wurde. Subepithelial zu sehen das nicht angefärbte Struma. In Abbildung 11 D eine high grade intraepitheliale Dysplasie mit starken Zellkernveränderungen und unregelmäßiger Architektur. Im Vergleich zu Abbildung 11 C sieht man eine minimal schwächere Anfärbung durch eIF1, sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär. In dem exemplarischen Tumoranschnitt in Abbildung 11 E erkennt man das Adenokarzinom anhand der ausgeprägt veränderten Drüsenarchitektur und den hyperchromatischen, polyformen Zellkernen. Das Zytoplasma der Tumorzellen ist mit braunen Präzipitaten durchzogen, wohingegen die Nuklei immer wieder als nicht angefärbt zu erkennen sind. Daher werteten wir diese überwiegend als negativ im Vergleich zu den anderen Gewebsanschnitten.

[Hier eingeben]

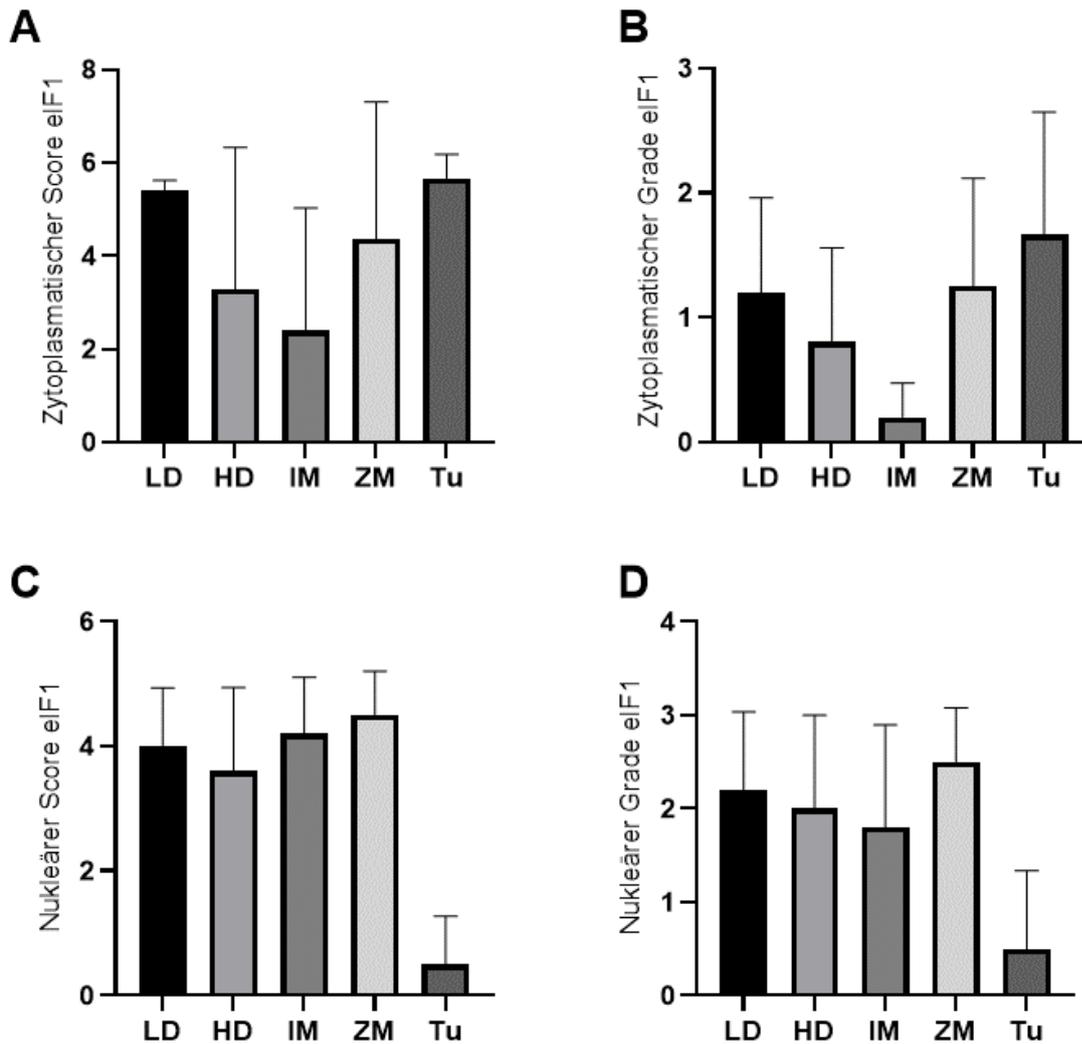


Abbildung 12 A-D: Säulendiagramm zur Anfärbung von eIF1. Dargestellt sind die der Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Untersuchungsergebnisse beider Rater für nukleären und zytoplasmatischen Score und Grade. Die Unterteilung wurde an der x-Achse anhand der Diagnose/Erkrankungsstadien (LD = low grade intraepitheliale Dysplasie, high grade intraepitheliale Dysplasie, IM = Intestinale Metaplasie, ZM = Zylindermetaplasie, Tu = Tumor) vorgenommen. Die y-Achse zeigt in den Abbildungen A und C den Score (0-100%) und in den Abbildungen B und D den Grade 0-3, wobei 0 = negativ, 1 = schwache Anfärbung, 2 = mittlere Anfärbung und 3 = starke Anfärbung. Abbildung A stellt den zytoplasmatischen Score der Erkrankungsstadien dar, Abbildung B den zytoplasmatischen Grade, in Abbildung C sieht man den nukleären Score der Erkrankungsstadien, in Abbildung D den nukleären Grade.

In Abbildung 12 A – D sind die Ergebnisse der Auswertung der IHC-Schnitte für eIF1 graphisch als Säulendiagramme dargestellt. Es wurden die Mittelwerte und dazugehörige Standardabweichungen der Werte beider Untersucher gebildet und für die jeweiligen Morphologien als Säulen gezeigt. In Abbildung 12 A die graphische Darstellung der Ergebnisse für das zytoplasmatische Scoring, dazugehörige in Abbildung 12 B die Ergebnisse des zytoplasmatischen Gradings. Die Gruppe der intestinalen Metaplasie (IM) präsentiert graphisch eine insgesamt niedrigere Anfärbung des Zytoplasmas für eIF1 im Vergleich zu den anderen Subgruppen (Abbildung 12 A und B). Die Zylinderzellmetaplasie (ZM) scheint in der Wertung insgesamt eine stärkere Expression von eIF1 im Zytoplasma durch die Untersucher

[Hier eingeben]

erhalten zu haben als die beiden Gruppen intestinale Metaplasie (IM) und high grade intraepitheliale Dysplasie (HD). Sowohl die Tumor- als auch die low grade Dysplasie-Anschnitte zeigten eine ähnliche Wertung für das Zytoplasma-Scoring und Grading. In Abbildung 12 C und D dargestellt, ist das Scoring und Grading der Zellkerne der verschiedenen Gruppen. Im Diagramm zeigen die Gruppen der Zylinderzellmetaplasie (ZM), intestinalen Metaplasie (IM), low grade intraepithelialen Dysplasie (LD) und der high grade intraepithelialen Dysplasie ähnliche hohe Ergebnisse für den nukleären Score und Grade. In der Übersicht gut zu erkennen die im Vergleich verminderte Anfärbung von eIF1 in den Zellkernen der Tumorzellen (Abbildung 12 C und D). Die weitere statistische Auswertung erfolgte mithilfe des ANOVA-Tests (Tabelle 4) mit anschließendem Bonferroni-Test (Anhang 1).

Tabelle 4 - Einfaktorielle ANOVA-Analyse für die IHC-Auswertung der eIF1-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien mit Vergleich zwischen und innerhalb der jeweiligen Gruppen „zytoplasmatischer Score“, „zytoplasmatischer Grade“, „nukleärer Score“ und „nukleärer Grade“.

eIF1		Quadratsumme	Freiheitsgrade	Quad. Mittelwert	F-Wert	Signifikanz
Zytoplasmatischer Score	Zwischen den Gruppen	160,155	4	40,039	3,003	0,028
	Innerhalb der Gruppen	599,925	45	13,332		
	Total	760,08	49			
Zytoplasmatisches Grading	Zwischen den Gruppen	9,38	4	2,345	3,35	0,017
	Innerhalb der Gruppen	31,5	45	0,7		
	Total	40,88	49			
Nukleärer Score	Zwischen den Gruppen	8,663	4	2,166	0,128	0,971
	Innerhalb der Gruppen	760,717	45	16,905		
	Total	769,38	49			
Nukleäres Grading	Zwischen den Gruppen	2,263	4	0,566	0,373	0,827
	Innerhalb der Gruppen	68,317	45	1,518		
	Total	70,58	49			

Es zeigten sich signifikante Unterschiede beim zytoplasmatischen Score ($p = 0,028$) und dem zytoplasmatischen Grading ($p = 0,017$) zwischen den Gruppen in der einfaktoriellen ANOVA-Analyse. Im anschließendem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Anhang 1) präsentierte sich der Vergleich der Kollektive Tumor und intestinale Metaplasie bei „zytoplasmatischen Score“ und „zytoplasmatischen Grade“ signifikant unterschiedlich. Für die anderen Subgruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Expression von eIF1, sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern.

[Hier eingeben]

4.2.3 eIF2alpha

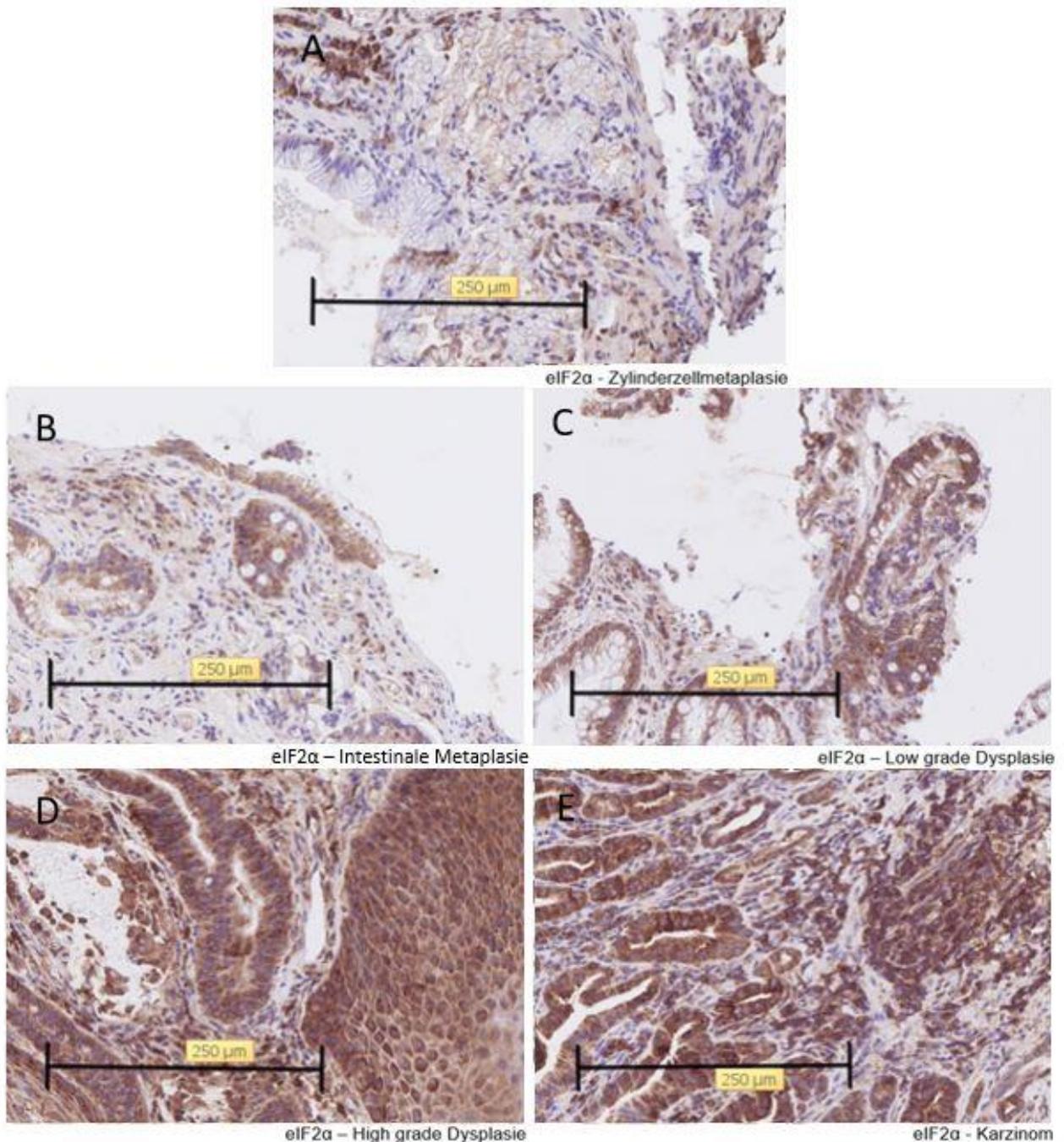


Abbildung 13 A-E: Immunhistochemische Schnitte mit eIF2α – Färbung in 8,5-fachen Zoom (NDP.View 2) mit der Kennzeichnung des Maßstabes 250 µm aus dem Kollektiv der Barrett - Karzinom - Sequenz mit ansteigender Malignität aus dem Eingangsgut des Institutes für Pathologie Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R. Abbildung A – Zylinderzellmetaplasie; Abbildung B – Intestinale Metaplasie; Abbildung C – Low grade intraepitheliale Dysplasie; Abbildung D – High grade intraepitheliale Dysplasie und Abbildung E – Barrett-Karzinom. Zu sehen sowohl die zytoplasmatische als auch nukleäre Färbung gegen eIF2α anhand brauner Präzipitate. Die Intensität wurde von 0 (negativ), 1 (schwache Expression), 2 (mittlere Expression) zu 3 (starke Expression) vorgenommen.

Ebenso wie bei eIF1 erfolgte die Beurteilung des immunhistochemischen Schnitte anhand zweier unabhängiger Untersucher. In Abbildung 13 A-E sind beispielhaft immunhistochemische Schnitte mit eIF2α-Antikörperfärbung dargestellt. Man erkennt erneut die teils deutlich braune Färbung des Zytoplasmas mit dazwischenliegenden blau-gefärbten

[Hier eingeben]

Zellkernen, welche somit als negativ gewertet wurden. Abbildung 13 A zeigt beispielhaft Anschnitte der Zylinderzellmetaplasie, welche phänotypisch der Kardiaschleimhaut gleichen, mit hier deutlich braungefärbtem Zytoplasma und negativen Zellkernen. In Abbildung 13 B erneut die intestinale Metaplasie mit gut sichtbaren Becherzellen im mittleren Bildanteil. Die zytoplasmatische Anfärbung ist hier im Vergleich zu Abbildung 13 A blasser und es gibt dazwischen liegende Bereiche, auch im Epithel, welche durch den eIF2 α -Marker nicht angefärbt wurden. Die low grade intraepitheliale Dysplasie in Abbildung 13 C präsentiert eine stärkere Anfärbung im Zytoplasma als die intestinale Metaplasie oder die in Abbildung 13 D dargestellte high grade intraepitheliale Neoplasie, auch wenn diese ebenfalls eine ausgeprägte Positivität anhand brauner Präzipitate intraepitheliale im Bildausschnitt darstellt. Vor allem in Abbildung 13 E (Barrett-Karzinom) erkennt man die deutliche zytoplasmatische Anfärbung mit eIF2 α in den Drüsenkörpern. Die großen, polymorphen Zellkerne mit teils vergrößerten Nucleoli verblieben negativ. Es wurden die beschriebenen Ergebnisse nach Untersuchung der Schnitte zusammengetragen und ein Mittelwert mit Standardabweichung errechnet.

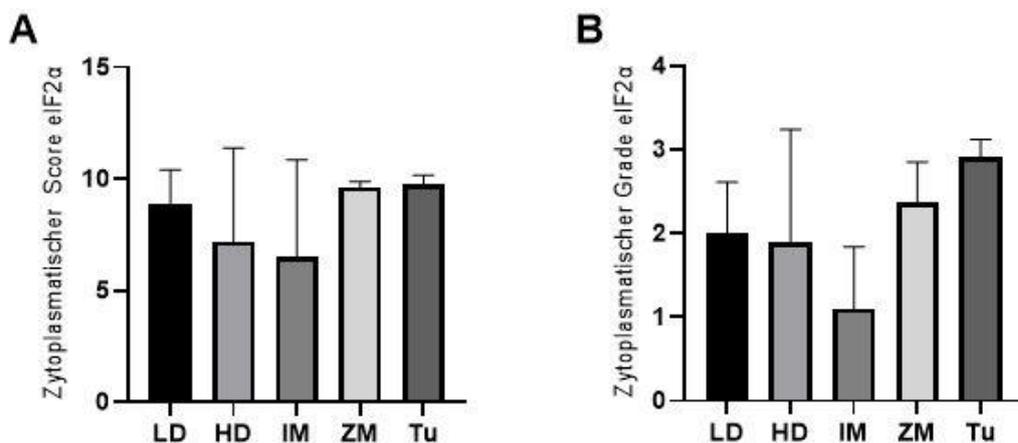


Abbildung 14 A-B: Säulendiagramm zur Anfärbung von eIF2 α . Dargestellt sind die der Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Untersuchungsergebnisse beider Rater für nukleären und zytoplasmatischen Score und Grade. Die Unterteilung wurde an der x-Achse anhand der Diagnose/Erkrankungsstadien (LD = low grade intraepitheliale Dysplasie, high grade intraepitheliale Dysplasie, IM = Intestinale Metaplasie, ZM = Zylindermetaplasie, Tu = Tumor) vorgenommen. Die y-Achse zeigt in den Abbildungen A und C den Score (0-100%) und in den Abbildungen B und D den Grade 0-3, wobei 0 = negativ, 1 = schwache Anfärbung, 2 = mittlere Anfärbung und 3 = starke Anfärbung. Abbildung A stellt den zytoplasmatischen Score der Erkrankungsstadien dar, Abbildung B den zytoplasmatischen Grade, in Abbildung C sieht man den nukleären Score der Erkrankungsstadien, in Abbildung D den nukleären Grade.

Graphisch präsentiert ist die Ergebnisauswertung in Abbildung 14 A und B. Da beide Untersucher die nukleäre Färbung von eIF2 α für alle immunhistochemische Schnitte des Patientengewebes als negativ (Grade und Score 0) werteten, ist in Abbildung 14 A und B aus Übersichtsgründen nur das zytoplasmatische Grading und Scoring als Balkendiagramme dargestellt. Dort zu sehen ist, dass die insgesamt niedrigsten Werte für das zytoplasmatische Scoring und Grading für eIF2 α für die IHC-Schnitte der intestinalen Metaplasie vergeben wurden. Auch die high grade intraepitheliale Dysplasie (HD) zeigt im Vergleich zu den

[Hier eingeben]

Subgruppen low grade Dysplasie (LD), Zylinderzellmetaplasie (ZM) und Tumor (Tu) eine schwächere Anfärbung für eIF2 α im Zytoplasma. Für das Kollektiv Tumor zeigt sich eine insgesamt verstärkte Anfärbeintensität (Grade) im Vergleich zu den anderen Stadien, in der Anfärbarkeit (Score) zeigen sich graphisch ähnliche Werte für die Gruppen ZM (Zylinderzellmetaplasie) und low grade intraepitheliale Dysplasie (LD), zu sehen in Abbildung 14 A. Nach der einfaktoriellen ANOVA-Analyse (Tabelle 5) mit anschließendem Post-Hoc-Test nach Bonferroni (Anhang 2) zum Mehrfachvergleich zeigten sich zwei Untertests signifikant für die Gruppen „Zytoplasmatischer Score“ und „Zytoplasmatischer Grade“.

Tabelle 5 - Einfaktorielle ANOVA-Analyse für die IHC-Auswertung der eIF2 α -Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien mit Vergleich zwischen und innerhalb der jeweiligen Gruppen „zytoplasmatischer Score“, „zytoplasmatischer Grade“, „nukleärer Score“ und „nukleärer Grade“.

eIF2 α		Quadratsumme	Freiheitsgrade	Quad. Mittelwert	F-Wert	Signifikanz
Zytoplasmatischer Score	Zwischen Gruppen	86,875	4	21,719	3,063	0,026
	Innerhalb Gruppen	319,125	45	7,092		
	Total	406	49			
Zytoplasmatischer Grade	Zwischen Gruppen	19,088	4	4,772	8,076	0,000
	Innerhalb Gruppen	26,592	45	0,591		
	Total	45,68	49			
Nukleärer Score	Zwischen Gruppen	0,000	4	0,000		
	Innerhalb Gruppen	0,000	45	0,000		
	Total	0,000	49			
Nukleärer Grade	Zwischen Gruppen	0,000	4	0,000		
	Innerhalb Gruppen	0,000	45	0,000		
	Total	0,000	49			

Es zeigte sich im Post-Hoc-Test eine signifikant stärkere Anfärbung für das Zytoplasma in Kategorie „Score“ und „Grade“ für die Tumoranschnitte im Vergleich zur Zylinderzell- und intestinalen Metaplasie, als auch zur high grade intraepithelialen Dysplasie (siehe Anhang 2). Für die low grade Dysplasie zeigte sich im Vergleich keine Signifikanz. Durch fehlende nukleäre Anfärbung wurde diese für sowohl Grade als auch Score mit „0“ (negativ) gewertet.

[Hier eingeben]

4.2.4 eIF3a und eIF4E

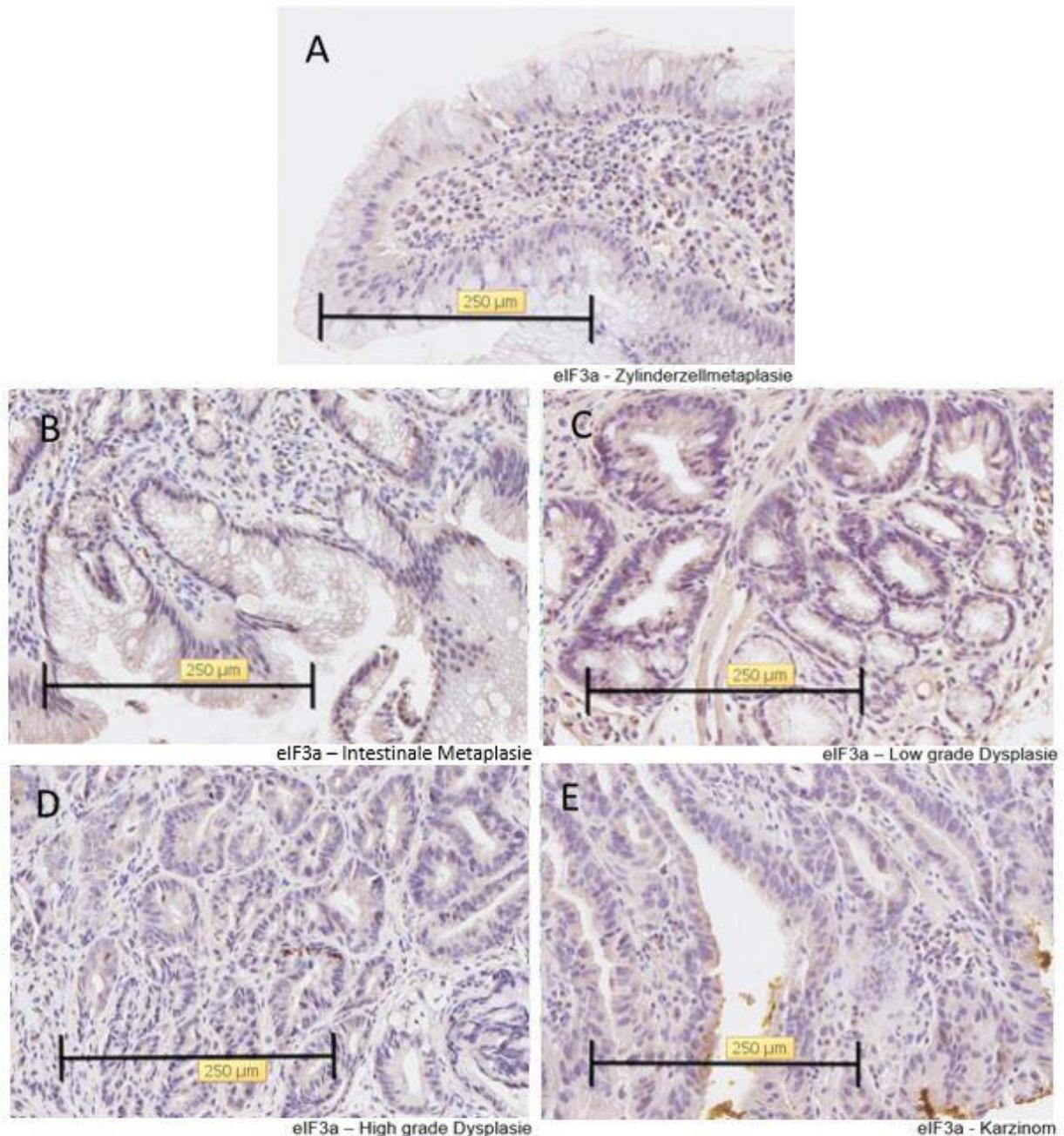


Abbildung 15 A-E: Immunhistochemische Schnitte mit eIF3a – Färbung in 8,5-fachen Zoom (NDP.View 2) mit der Kennzeichnung des Maßstabes 250 µm aus dem Kollektiv der Barrett - Karzinom - Sequenz mit ansteigender Malignität aus dem Eingangsgut des Institutes für Pathologie Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R. Abbildung A – Zylinderzellmetaplasie; Abbildung B – Intestinale Metaplasie; Abbildung C – Low grade intraepitheliale Dysplasie; Abbildung D – High grade intraepitheliale Dysplasie und Abbildung E – Barrett-Karzinom. Zu sehen sowohl die zytoplasmatische als auch nukleäre Färbung gegen eIF3a anhand brauner Präzipitate. Die Intensität wurde von 0 (negativ), 1 (schwache Expression), 2 (mittlere Expression) zu 3 (starke Expression) vorgenommen.

Die Anfärbung für eIF3a ist exemplarisch in Abbildung 15 A bis E gezeigt. Zu sehen sind in allen Abbildungen nur wenige braune Präzipitate, am ehesten als Artefakte durch den Anfärbeprozess zu werten. Man erkennt die überwiegend basophilen Zellverbände über alle Gruppen hinweg in Abbildung 15 A - E. Daher wurde ein Großteil der IHC-Schnitte für eIF3A sowohl für Zellkern als auch im Zytoplasma von den Untersuchern als negativ gewertet.

[Hier eingeben]

Abbildung 15 A (Zylinderzellmetaplasie) zeigt sich sowohl im Zytoplasma der Epithelzellen als auch in deren Zellkernen als negativ. In den Anschnitten der intestinalen Metaplasie, beispielhaft hierfür Abbildung 15 B, präsentiert sich stellenweise eine leichte Anfärbung für eIF3a im Zytoplasma der metaplastischen Zellen, dazwischenliegend immer wieder Bereiche im Zellverband, welche als negativ gewertet wurden. In Abbildung 15 C und D exemplarisch dargestellt die low grade und high grade intraepitheliale Dysplasie, welche in allen immunhistochemischen Schnitte keine zytoplasmatische Anfärbung für eIF3a zeigten. Lediglich in der low grade Dysplasie wurden wenige Zellkerne als schwach positiv gewertet (im Bildausschnitt Abbildung 15 C einzelne braun-gefärbte Nuklei). In Abbildung 15 E zu sehen das Barrett-Adenokarzinom mit hyperchromatischen, polyformen Zellkernen, welche auch hier erneut keine Positivität für eIF3a zeigen.

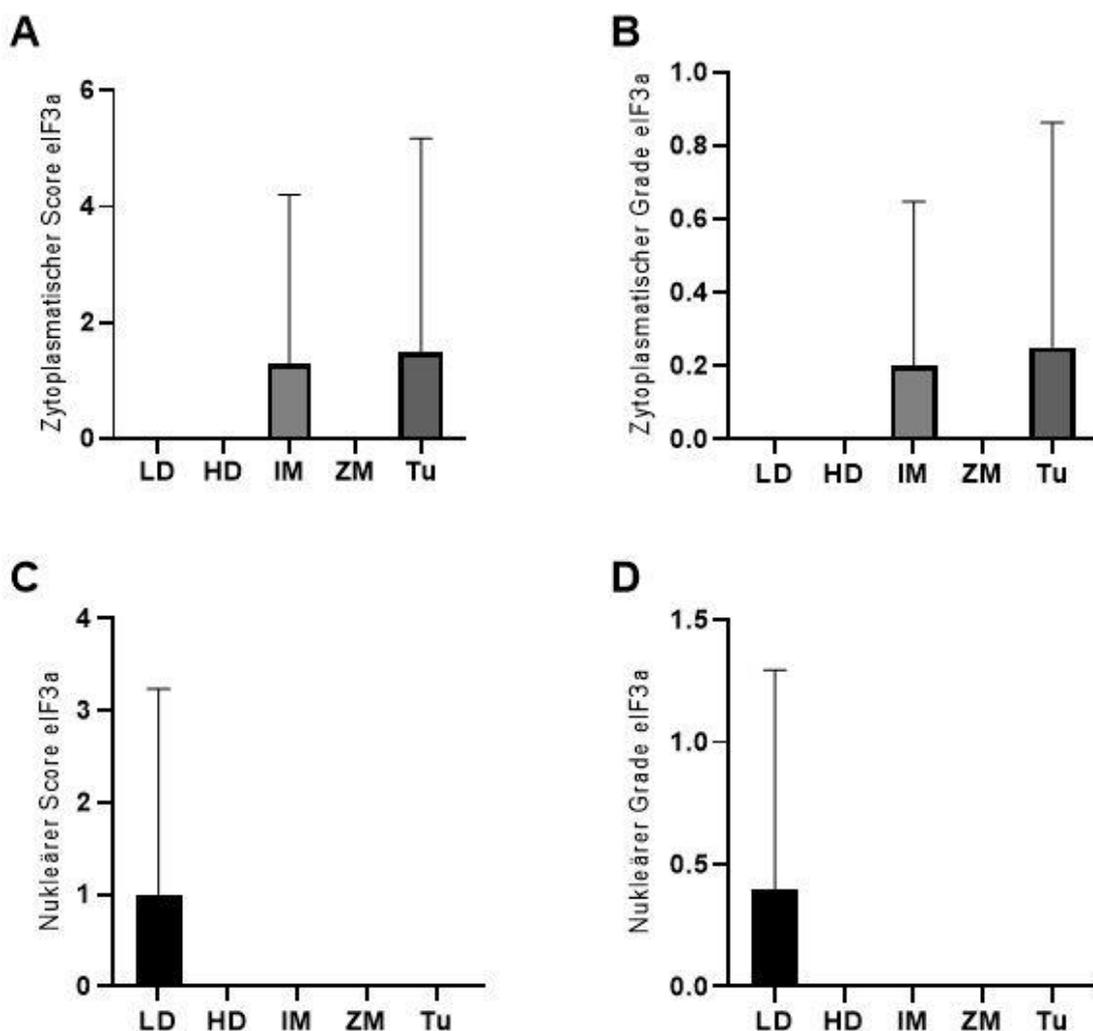


Abbildung 16 A-D: Säulendiagramm zur Anfärbung von eIF3a. Dargestellt sind die der Mittelwerte ± Standardabweichung der jeweiligen Untersuchungsergebnisse beider Rater für nukleären und zytoplasmatischen Score und Grade. Die Unterteilung wurde an der x-Achse anhand der Diagnose/Erkrankungsstadien (LD = low grade intraepitheliale Dysplasie, HD = high grade intraepitheliale Dysplasie, IM = Intestinale Metaplasie, ZM = Zylinderzellmetaplasie, Tu = Tumor) vorgenommen. Die y-Achse zeigt in den Abbildungen A und C den Score (0-100%) und in den Abbildungen B und D den Grade 0-3, wobei 0 = negativ, 1 = schwache Anfärbung, 2 = mittlere Anfärbung, 3 = starke Anfärbung.

[Hier eingeben]

Anfärbung und 3 = starke Anfärbung. Abbildung A stellt den zytoplasmatischen Score der Erkrankungsstadien dar, Abbildung B den zytoplasmatische Grade, in Abbildung C sieht man den nukleären Score der Erkrankungsstadien, in Abbildung D den nukleären Grade.

Erneut gut zu erkennen in der graphischen Darstellung (Abbildung 16 A-D), dass beide Untersucher nur geringe Werte sowohl für die Anfärbarkeit als auch die Anfärbeintensität von eIF3a in allen Gewebegruppen vergaben. Die immunhistochemische Färbung gegen eIF3a war in der Mehrzahl der Fälle negativ. Es wurden die wenigen bis nicht vorhandenen braunen Präzipitate im Ösophagusepithel (siehe Abbildung 15 A - E) dementsprechend gewertet und der „Grade“ zwischen 0 – 1 zytoplasmatisch als auch nukleär vergeben, nur in zwei Fällen vergaben wir Grade 2. Für die Zylinderzellmetaplasie und die high grade intraepitheliale Dysplasie wurde von beiden Untersuchern für alle Schnitte Grade 0 (=negativ) für sowohl die zytoplasmatische als auch die nukleäre Anfärbung vergeben (vergleiche Abbildungen 16 A und B und 16 C und D). Die Gruppen der intestinalen Metaplasie (IM) und der Tumore (Tu) erhielten in der Wertung schwach positive Ergebnisse für die zytoplasmatische Anfärbung, die nukleäre Anfärbung wurde als negativ in allen Schnitten beurteilt (Abbildung 16 C und D). Die Entität der low grade intraepithelialen Dysplasie wurde für die Anfärbung von eIF3a im Zytoplasma als negativ gewertet und als schwach positiv in den Zellkernen. Während der Studie sollte besonderes Augenmerk auf die eIFs 3a und 4E gelegt werden, da vorherige *in vitro* - Studien zum eukaryotischen Initiationsfaktor 3a auf eine veränderte Expression bei Karzinomen des Ösophagus deuteten und 4E als relevant für die Karzinogenese des kolorektalen Adenokarzinoms gilt und es somit Hinweise gibt, dass eIF4E ursächlich für die Malignomentstehung im Gastrointestinaltrakt sein könnte.

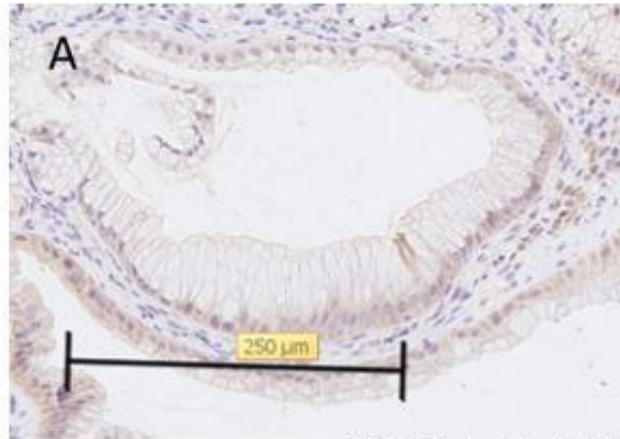
Auch in der anschließenden statistischen Auswertung mittels ANOVA (Tabelle 6) und Bonferroni Post Hoc – Analyse (Anhang 3) zeigte sich in den Gruppenvergleichen für keinen der Untertests eine signifikante Veränderung der Anfärbarkeit oder Anfärbeintensität gegen eIF3a.

Tabelle 6 - Einfaktorielle ANOVA-Analyse für die IHC-Auswertung der eIF3a-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien mit Vergleich zwischen und innerhalb der jeweiligen Gruppen „zytoplasmatischer Score“, „zytoplasmatischer Grade“, „nukleärer Score“ und „nukleärer Grade“.

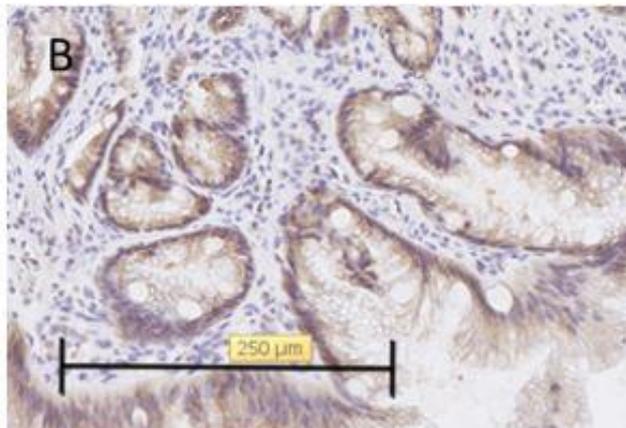
eIF3a		Quadratsumme	Freiheitsgrade	Quad. Mittelwert	F-Wert	Signifikanz
Zytoplasmatischer Score	Zwischen den Gruppen	24,68	4	6,17	1,341	0,27
	Innerhalb der Gruppen	207,1	45	4,602		
	Total	231,78	49			
Zytoplasmatisches Grading	Zwischen den Gruppen	0,65	4	0,163	1,25	0,304
	Innerhalb der Gruppen	5,85	45	0,13		
	Total	6,5	49			
Nukleärer Score	Zwischen den Gruppen	8,000	4	2,000	2,25	0,079

[Hier eingeben]

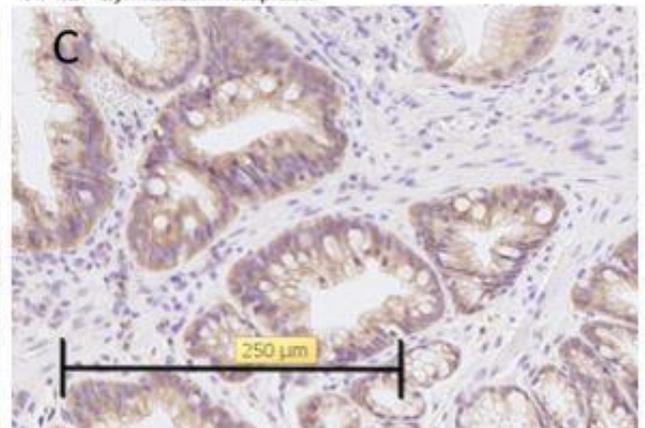
	Innerhalb der Gruppen	40,000	45	0,899		
	Total	48,000	49			
Nukleäres Grading	Zwischen den Gruppen	1,380	4	0,345	1,568	0,199
	Innerhalb der Gruppen	9,900	45	0,220		
	Total	11,280	49			



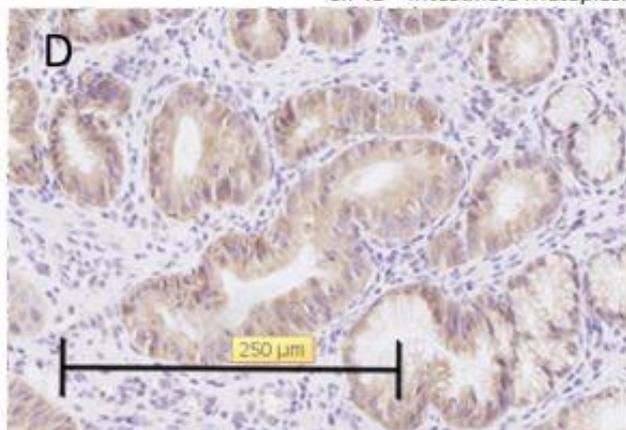
eIF4E - Zylinderzellmetaplasie



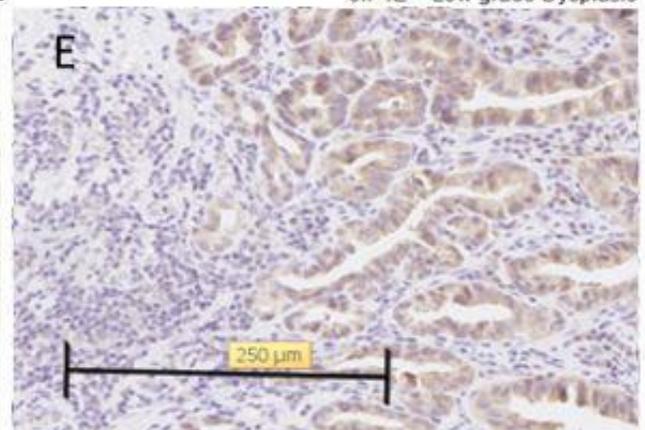
eIF4E – Intestinale Metaplasie



eIF4E – Low grade Dysplasie



eIF4E – High grade Dysplasie



eIF4E - Karzinom

Abbildung 17 A-E: Immunhistochemische Schnitte mit eIF4E – Färbung in 8,5-fachen Zoom (NDP.View 2) mit der Kennzeichnung des Maßstabes 250 µm aus dem Kollektiv der Barrett - Karzinom - Sequenz mit ansteigender

[Hier eingeben]

Malignität aus dem Eingangsgut des Institutes für Pathologie Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R. Abbildung A – Zylinderzellmetaplasie; Abbildung B – Intestinale Metaplasie; Abbildung C – Low grade intraepitheliale Dysplasie; Abbildung D – High grade intraepitheliale Dysplasie und Abbildung E – Barrett-Karzinom. Zu sehen sowohl die zytoplasmatische als auch nukleäre Färbung gegen eIF4E anhand brauner Präzipitate. Die Intensität wurde von 0 (negativ), 1 (schwache Expression), 2 (mittlere Expression) zu 3 (starke Expression) vorgenommen.

In der Immunhistochemie der Schnitte zu eIF4E (Abbildungen 17 A – E) sahen wir eine nur schwach positive Anfärbungen in einen Großteil der Fälle waren (4 Fälle negativ; 12 Fälle Grade 1; 7 Fälle Grade 2; 2 Fälle Grade 3) mit diffusen Verteilungsmuster über die verschiedenen Krankheitsstadien für das Zytoplasma. In Abbildung 17 A gut zu erkennen das zylinderförmige, metaplastische Epithel mit nur sehr blasser Anfärbung des Zytoplasmas und einzelner Zellkerne. In Abbildung 17 B erneut die intestinale Metaplasie, zu erkennen anhand der Becherzellen mit sehr hellem Zytoplasma, welche dadurch teils „leer“ wirken. Hier sieht man lediglich einige wenige braune Präzipitate im Zytoplasma. Eine Anfärbung der Nuclei findet sich hier nicht. Die low grade intraepitheliale Dysplasie in Abbildung 17 C präsentiert vereinzelte, schwach positive Zellkerne und überwiegend schwach positives Zytoplasma. Die high grade intraepitheliale Dysplasie (Abbildung 17 D) mit stark veränderten Zellkernen und Drüsenarchitektur zeigt eine leichte zytoplasmatische Anfärbung für eIF4E und nur wenige schwach positive Zellkerne intraepithelial. Im Tumoranschnitt (Abbildung 17 E) erneut eine vermehrte zytoplasmatische Anfärbung, jedoch nur wenige schwach positive Zellkerne in den malignen Drüsenformationen. Zusammenfassend war die Färbung des Zellkernes in 76% aller Fälle negativ, in den restlichen Fällen wurde Grade 1-2 vergeben.

[Hier eingeben]

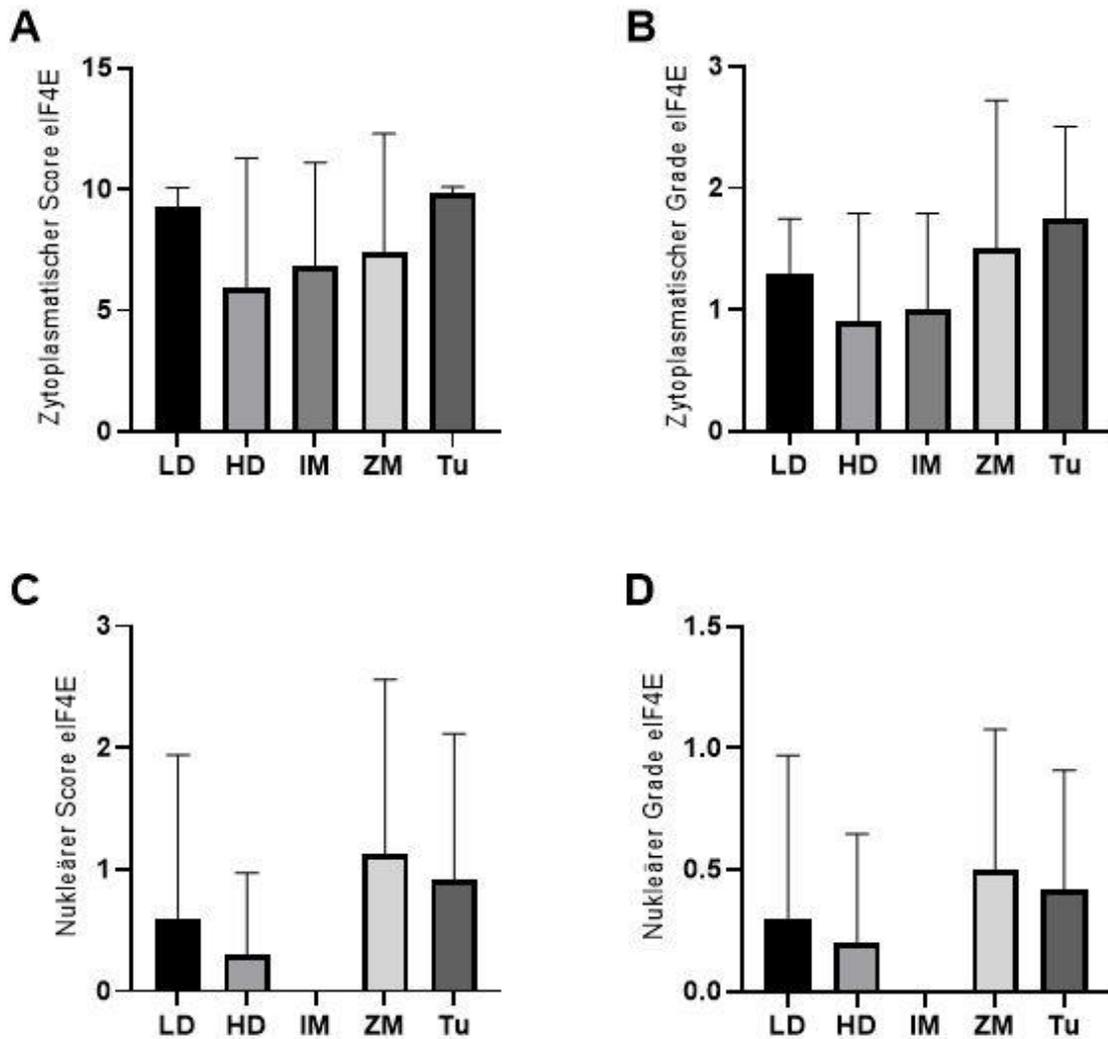


Abbildung 18 A-D: Säulendiagramm zur Anfärbung von eIF4E. Dargestellt sind die der Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Untersuchungsergebnisse beider Rater für nukleären und zytoplasmatischen Score und Grade. Die Unterteilung wurde an der x-Achse anhand der Diagnose/Erkrankungsstadien (LD = low grade intraepitheliale Dysplasie, high grade intraepitheliale Dysplasie, IM = Intestinale Metaplasie, ZM = Zylindermetaplasie, Tu = Tumor) vorgenommen. Die y-Achse zeigt in den Abbildungen A und C den Score (0-100%) und in den Abbildungen B und D den Grade 0-3, wobei 0 = negativ, 1 = schwache Anfärbung, 2 = mittlere Anfärbung und 3 = starke Anfärbung. Abbildung A stellt den zytoplasmatischen Score der Erkrankungsstadien dar, Abbildung B den zytoplasmatischen Grade, in Abbildung C sieht man den nukleären Score der Erkrankungsstadien, in Abbildung D den nukleären Grade.

In Abbildung 18 A-D die oben beschriebenen Ergebnisse der Auswertung für Scoring und Grading zu eIF4E als Balkendiagramme. In Abbildung 18 A sind die Werte des zytoplasmatischen Scoring präsentiert. Für die Zylinderzell- und intestinale Metaplasie zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Die Gruppe der high grade Dysplasie (HD) zeigte die geringste Anfärbbarkeit (Score). Die Gruppen „Tumor“ und „low grade intraepitheliale Dysplasie“ präsentierten ein ähnlich hohes Scoring. Auch die intestinale Metaplasie (IM) und die Zylinderzellmetaplasie (ZM) erhielten im Mittelwert ähnlich hohe Werte für das Scoring. In Abbildung 18 B sind die Mittelwerte der Untersuchungsergebnisse für das zytoplasmatische Grade graphisch zusammengefasst. In der graphischen Übersicht zu erkennen, dass die Entität Tumor (Tu) im Schnitt das höchste zytoplasmatische Grade erhielt. Die niedrigsten

[Hier eingeben]

Werte wurde erneut für die Gruppe „high grade intraepitheliale Dysplasie“ (HD) vergeben. In Abbildung 18 C und D zu sehen sind die Säulendiagramme für eIF4E für den nukleären Score und Grade. Die höchsten Werte für Grading und Scoring wurden für die Zylinderzellmetaplasie (ZM) durch die Untersucher vergeben. Die immunhistochemischen Schnitte für die Zylinderzellmetaplasie wurden als vollständig negativ gewertet für die nukleäre Anfärbung. Darauf folgend in ansteigender Reihenfolge für den nukleären Score und Grade: high grade intraepitheliale Dysplasie (HD), low grade intraepitheliale Dysplasie (LD) und Tumor (Tu) (Abbildung 18 C und D). Nach ANOVA-Analyse (Tabelle 7) mit anschließenden Bonferroni-Post-Hoc (Anhang 4) zeigte sich im Vergleich weder für die nukleäre oder zytoplasmatische Anfärbung und Intensität mit eIF4E-Antikörpern ein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Untergruppen.

Tabelle 7 - Einfaktorielle ANOVA-Analyse für die IHC-Auswertung der eIF4E-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien mit Vergleich zwischen und innerhalb der jeweiligen Gruppen „zytoplasmatischer Score“, „zytoplasmatischer Grade“, „nukleärer Score“ und „nukleärer Grade“.

eIF4E		Quadratsumme	Freiheitsgrade	Quad. Mittelwert	F-Wert	Signifikanz
Zytoplasmatischer Score	Zwischen den Gruppen	118,678	4	29,67	2,27	0,076
	Innerhalb der Gruppen	588,142	45	13,07		
	Total	706,82	49			
Zytoplasmatisches Grading	Zwischen den Gruppen	5,25	4	1,313	1,89	0,129
	Innerhalb der Gruppen	31,25	45	0,694		
	Total	36,5	49			
Nukleärer Score	Zwischen den Gruppen	7,888	4	1,972	1,635	0,182
	Innerhalb der Gruppen	54,292	45	1,206		
	Total	62,180	49			
Nukleäres Grading	Zwischen den Gruppen	1,463	4	0,366	1,551	0,204
	Innerhalb der Gruppen	10,617	45	0,236		
	Total	12,080	49			

[Hier eingeben]

4.2.5 eIF5B

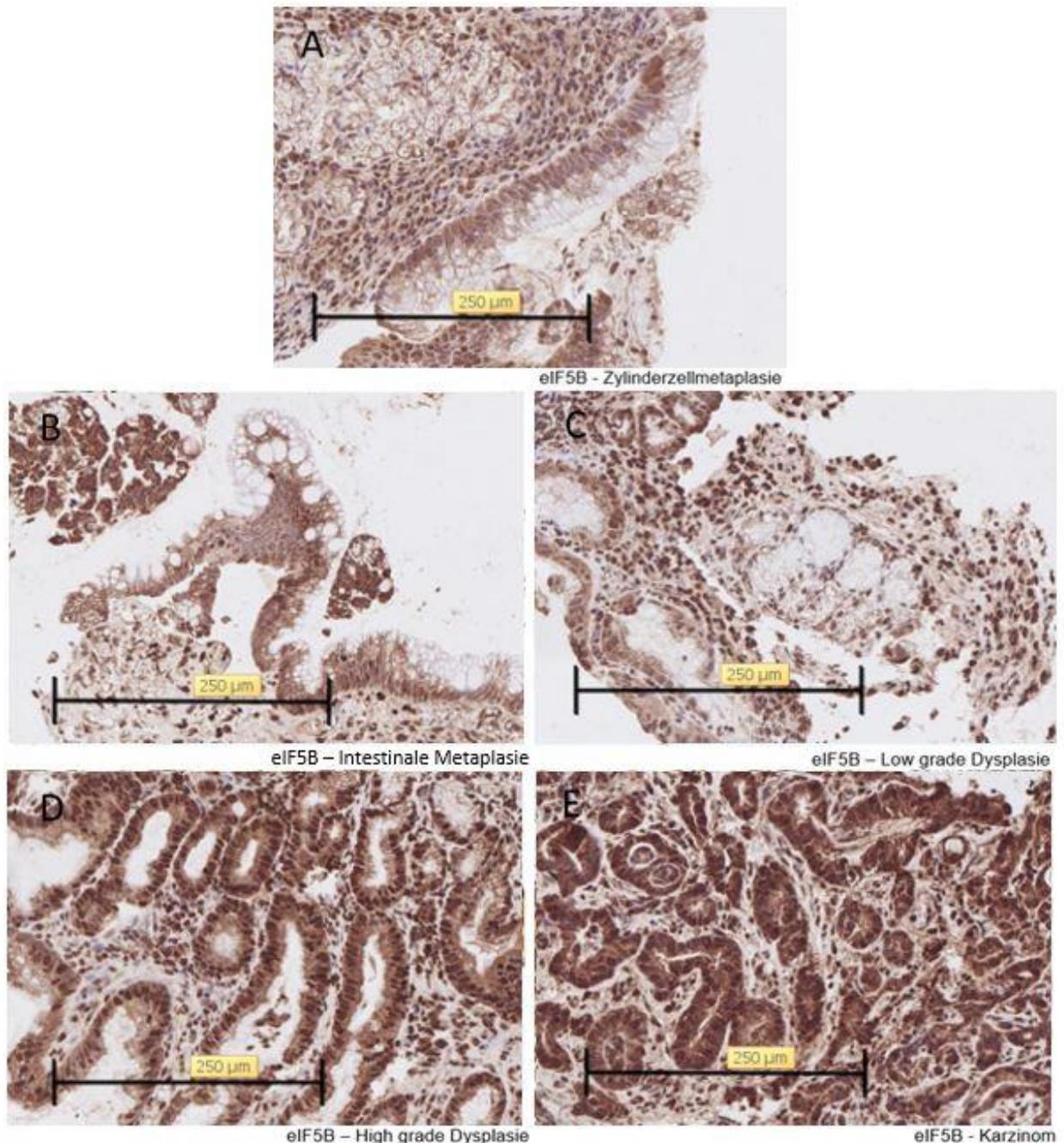


Abbildung 19 A-E: Immunhistochemische Schnitte mit eIF5B – Färbung in 8,5-fachen Zoom (NDP.View 2) mit der Kennzeichnung des Maßstabes 250 µm aus dem Kollektiv der Barrett - Karzinom - Sequenz mit ansteigender Malignität aus dem Eingangsgut des Institutes für Pathologie Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R. Abbildung A – Zylinderzellmetaplasie; Abbildung B – Intestinale Metaplasie; Abbildung C – Low grade intraepitheliale Dysplasie; Abbildung D – High grade intraepitheliale Dysplasie und Abbildung E – Barrett-Karzinom. Zu sehen sowohl die zytoplasmatische als auch nukleäre Färbung gegen eIF5B anhand brauner Präzipitate. Die Intensität wurde von 0 (negativ), 1 (schwache Expression), 2 (mittlere Expression) zu 3 (starke Expression) vorgenommen.

Eine ausgeprägte Positivität für eIF5B über alle Erkrankungsstadien zeigt sich in Abbildung 19 A-E anhand starker Anfärbung im Zytoplasma und Nucleus. Vor allem in Abbildung 19 E (Barrett-Adenokarzinom) erkennt man eine deutliche Anfärbung der Zellkerne und des Zytoplasmas, im Vergleich hierzu Abbildung 19 B (intestinale Metaplasie), welche eine

[Hier eingeben]

schwächere Positivität sowohl für die Nuclei als auch das Zytoplasma des Epithels zeigt. Eine ähnlich intensive Anfärbung für eIF5B im Zytoplasma und Zellkern wie für die Tumoranschnitte zeigt sich in den Abbildung 19 C (low grade intraepitheliale Dysplasie). Hier vor allem gut zu erkennen die ausgeprägt angefärbten Zellkerne in den Epithelzellen. In Abbildung 19 D (high grade intraepitheliale Dysplasie) zu sehen eine im Vergleich zu Abbildung 19 E schwächere zytoplasmatische Anfärbung gegen eIF5B. Die veränderten Zellkerne wirken ähnlich stark angefärbt wie in den Tumoranschnitten.

In Abbildung 20 A und B ist die Auswertung zytoplasmatische Anfärbung dargestellt. Für die intestinale Metaplasie (IM) wurde insgesamt durch beide Untersucher nur eine schwache Anfärbbarkeit und Färbeintensität vergeben im Vergleich zu den anderen Gruppen, sowohl im Zytoplasma als auch für die Zellkerne. Ähnlich hohe Werte für den zytoplasmatischen Score wurden für die Gruppen Zylinderzellmetaplasie (ZM), low grade intraepitheliale Dysplasie (LD) und Tumor (Tu) vergeben. Die high grade intraepitheliale Dysplasie erhielt für den zytoplasmatischen Score (Abbildung 20 A) einen im Vergleich ähnlich niedrigen Wert wie die intestinale Metaplasie, zeigte jedoch eine stärkere, zytoplasmatische Anfärbeintensität (Abbildung 20 B). In Abbildung 20 C und D sind die Werte für die Auswertung der nukleären Anfärbung graphisch dargestellt. Man erkennt vor allem für die nukleäre Anfärbeintensität für eIF5b (Grade) über alle Gruppen hinweg gleich hohe Werte. Vor allem für die Subgruppe Zylinderzellemetaplasie und Tumor wurden für den Score und Grade der Zellkerne ähnlich hohe Werte vergeben. Auch die intraepithelialen Dysplasien (LD und HD) erhielten durch die Untersucher annähernd gleiche Werte für das nukleäre Scoring und Grading (siehe Abbildung 20 C und D). In der Gesamtübersicht zeigt sich eine scheinbar schwächere Anfärbung gegen eIF5B für die Immunhistochemieschnitte der intestinalen Metaplasie (IM) sowohl zytoplasmatisch (Abbildung 20 A und B) als auch nukleär (Abbildung 20 C und D). Insgesamt zu erwähnen ist, dass die Untersucher für die Anfärbung des Zellkernes Grade zwischen 2 und 3 für alle Erkrankungsstadien vergaben. Letztlich ergibt sich dadurch keine relevante Unterscheidung für die Anfärbung des Nukleus durch eIF5B über alle Gruppen hinweg.

[Hier eingeben]

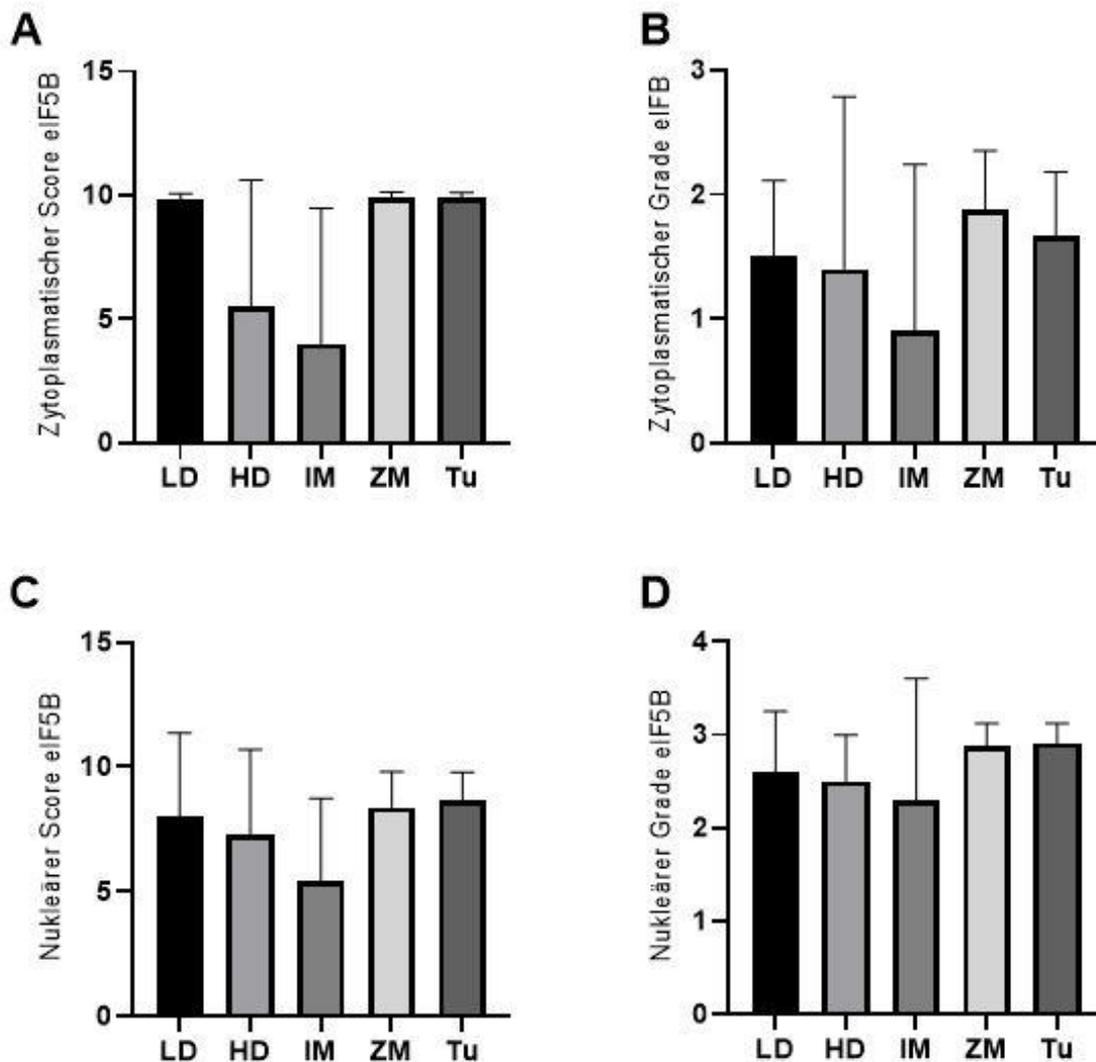


Abbildung 20 A-D: Säulendiagramm zur Anfärbung von eIF5B. Dargestellt sind die der Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Untersuchungsergebnisse beider Rater für nukleären und zytoplasmatischen Score und Grade. Die Unterteilung wurde an der x-Achse anhand der Diagnose/Erkrankungsstadien (LD = low grade intraepitheliale Dysplasie, high grade intraepitheliale Dysplasie, IM = Intestinale Metaplasie, ZM = Zylindermetaplasie, Tu = Tumor) vorgenommen. Die y-Achse zeigt in den Abbildungen A und C den Score (0-100%) und in den Abbildungen B und C den Grade 0-3, wobei 0 = negativ, 1 = schwache Anfärbung, 2 = mittlere Anfärbung und 3 = starke Anfärbung. Abbildung A stellt den zytoplasmatischen Score der Erkrankungsstadien dar, Abbildung B den zytoplasmatische Grade, in Abbildung C sieht man den nukleären Score der Erkrankungsstadien, in Abbildung D den nukleären Grade.

Bei der anschließenden ANOVA-Analyse zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen für das zytoplasmatische Scoring ($p = 0,000$), jedoch nicht für das zytoplasmatische Grading von eIF5B (Tabelle 8). Für den nukleären Score sowie das nukleäre Grading fanden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 8). Der anschließende Bonferroni-Test zeigte dann signifikante Unterschiede zwischen den Stadien „Tumor“ und „high grade intraepitheliale Dysplasie“ und „intestinaler Metaplasie“ beim zytoplasmatischen Scoring (Anhang 5).

[Hier eingeben]

Tabelle 8 - Einfaktorielle ANOVA-Analyse für die IHC-Auswertung der eIF5B-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien mit Vergleich zwischen und innerhalb der jeweiligen Gruppen „zytoplasmatischer Score“, „zytoplasmatischer Grade“, „nukleärer Score“ und „nukleärer Grade“

eIF5B		Quadratsumme	Freiheitsgrade	Quad. Mittelwert	F-Wert	Signifikanz
Zytoplasmatischer Score	Zwischen den Gruppen	325,488	4	81,372	8,067	0,000
	Innerhalb der Gruppen	453,892	45	10,086		
	Total	799,38	49			
Zytoplasmatisches Grading	Zwischen den Gruppen	5,078	4	1,27	1,26	0,300
	Innerhalb der Gruppen	45,342	45	1,008		
	Total	50,42	49			
Nukleärer Score	Zwischen den Gruppen	69,278	4	17,32	2,413	0,063
	Innerhalb der Gruppen	323,042	45	7,179		
	Total	392,32	49			
Nukleäres Grading	Zwischen den Gruppen	2,728	4	0,682	1,238	0,308
	Innerhalb der Gruppen	24,792	45	0,551		
	Total	27,52	49			

[Hier eingeben]

4.2.6 eIF6

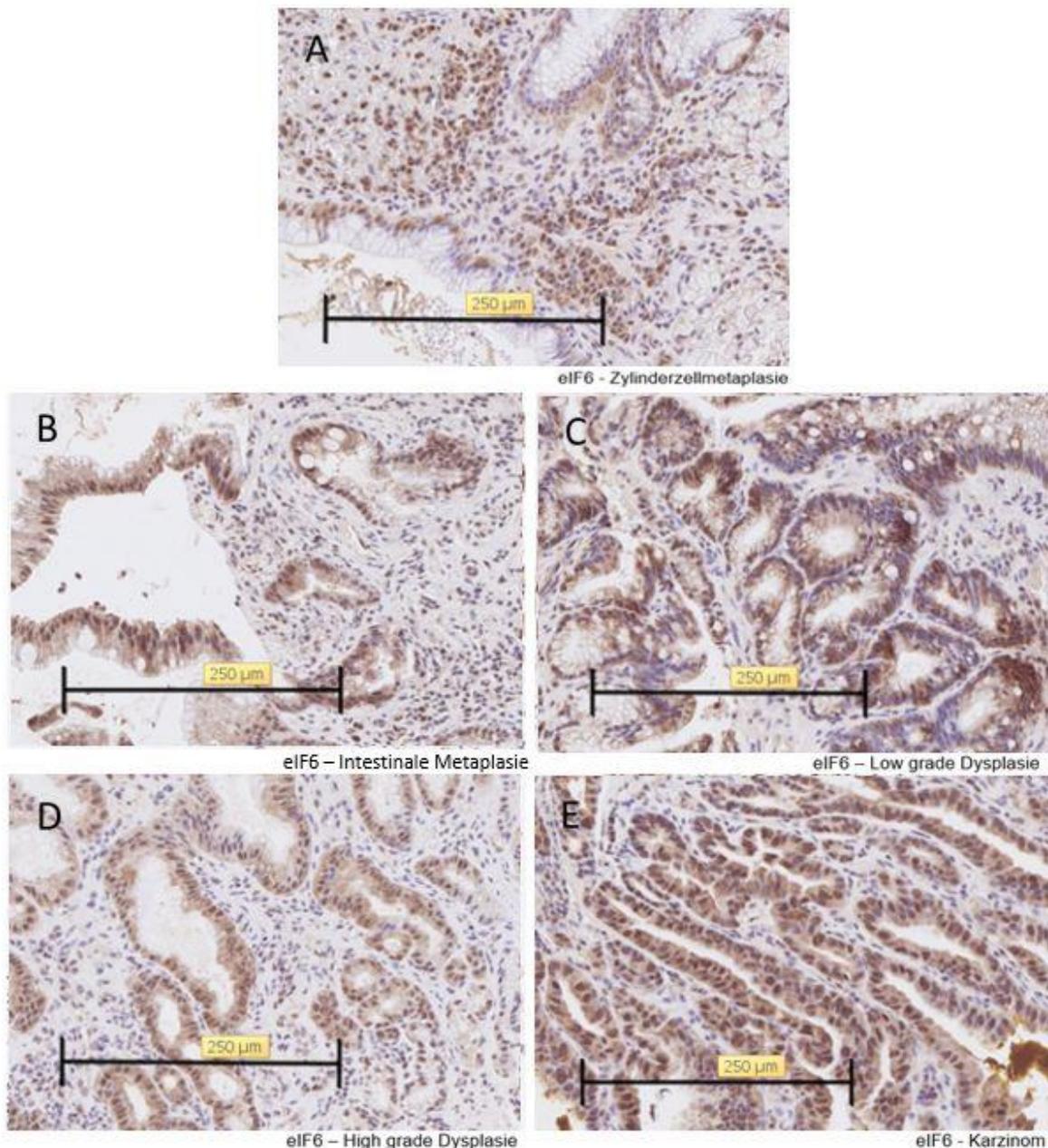


Abbildung 21 A-E: Immunhistochemische Schnitte mit eIF6 – Färbung in 8,5-fachen Zoom (NDP.View 2) mit der Kennzeichnung des Maßstabes 250 µm aus dem Kollektiv der Barrett - Karzinom - Sequenz mit ansteigender Malignität aus dem Eingangsgut des Institutes für Pathologie Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R. Abbildung A – Zylinderzellmetaplasie; Abbildung B – Intestinale Metaplasie; Abbildung C – Low grade intraepitheliale Dysplasie; Abbildung D – High grade intraepitheliale Dysplasie und Abbildung E – Barrett-Karzinom. Zu sehen sowohl die zytoplasmatische als auch nukleäre Färbung gegen eIF6 anhand brauner Präzipitate. Die Intensität wurde von 0 (negativ), 1 (schwache Expression), 2 (mittlere Expression) zu 3 (starke Expression) vorgenommen.

Auch die IHC-Schnitte mit eIF6-Anfärbung zeigt über alle Erkrankungsstadien positives Zytoplasma und Zellkerne (siehe Abbildung 21 A-E). Dazwischen liegend gut zu erkennen das nicht-angefärbte (negative) Gewebestrüma. Die Nuklei sind sowohl in den entzündlichen Vorstufen als auch im Karzinom ausgeprägt positiv ohne signifikante Unterschiede.

[Hier eingeben]

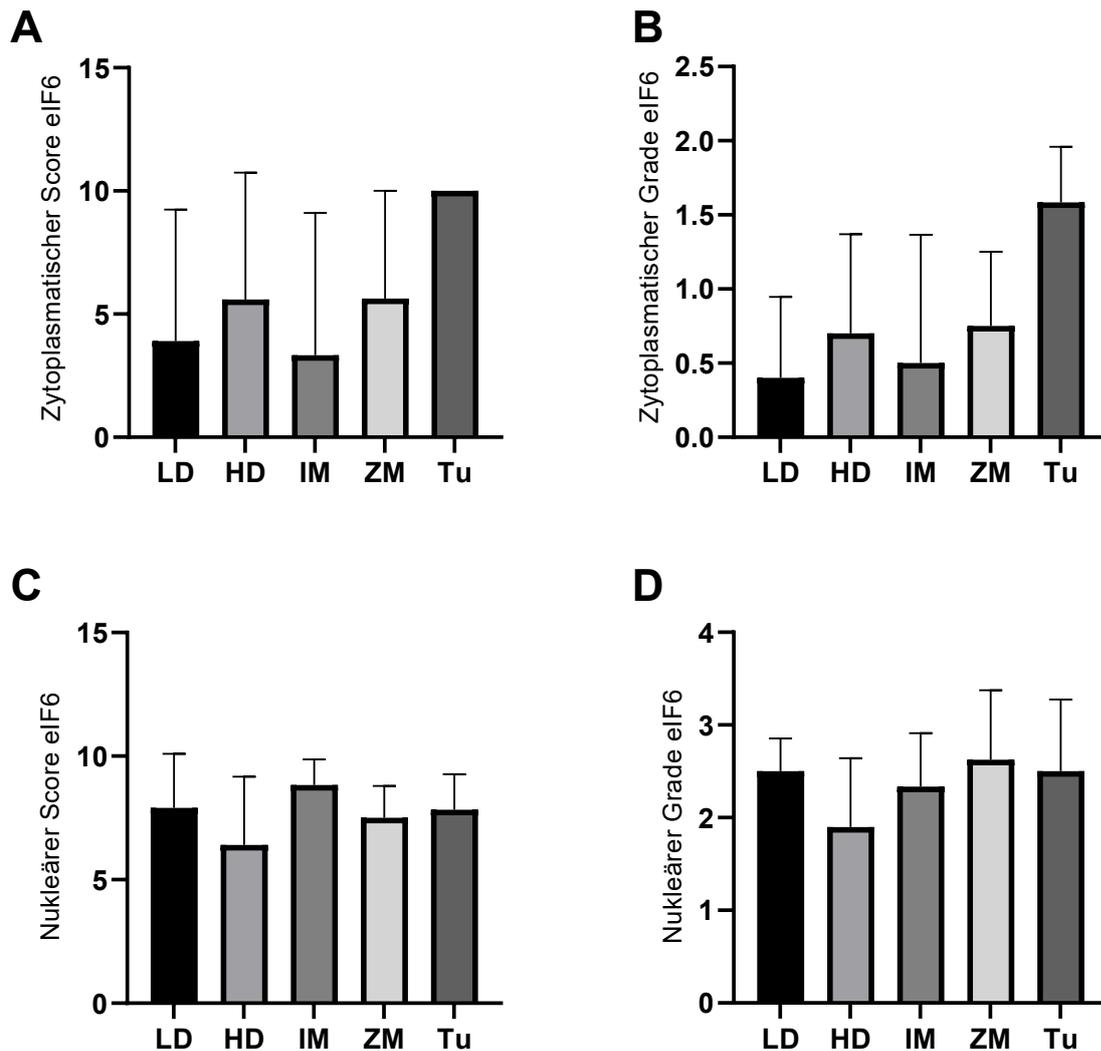


Abbildung 22 A-D: Säulendiagramm zur Anfärbung von eIF6. Dargestellt sind die der Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Untersuchungsergebnisse beider Rater für nukleären und zytoplasmatischen Score und Grade. Die Unterteilung wurde an der x-Achse anhand der Diagnose/Erkrankungsstadien (LD = low grade intraepitheliale Dysplasie, high grade intraepitheliale Dysplasie, IM = Intestinale Metaplasie, ZM = Zylindermetaplasie, Tu = Tumor) vorgenommen. Die y-Achse zeigt in den Abbildungen A und C den Score (0-100%) und in den Abbildungen B und D den Grade 0-3, wobei 0 = negativ, 1 = schwache Anfärbung, 2 = mittlere Anfärbung und 3 = starke Anfärbung. Abbildung A stellt den zytoplasmatischen Score der Erkrankungsstadien dar, Abbildung B den zytoplasmatischen Grade, in Abbildung C sieht man den nukleären Score der Erkrankungsstadien, in Abbildung D den nukleären Grade.

Die Untersucher vergaben im Mittel für die zytoplasmatische Anfärbung durch eIF6 niedrige Grade im Vergleich zur Anfärbung der Zellkerne für alle Gruppen (siehe Abbildung 22 A-D). Der zytoplasmatische Grade und Score für die Tumorschnitte (Tu) (Abbildung 22 A und B) grenzte sich signifikant von den anderen Morphologien ab. Die niedrigsten Werte wurden für die Schnitte der intestinalen Metaplasie vergeben (IM). Ähnlich niedrige Werte vergaben die Untersucher auch für die Gruppe der low grade intraepithelialen Dysplasie (LD) für die zytoplasmatische Anfärbung mittels eIF6. Auch zu erkennen in Abbildung 22 A und B die im Mittel gleich hohen Bewertungen für die Gruppen der high grade intraepithelialen Dysplasie und der Zylindermetaplasie. In Abbildung 22 C und D ist sind die Werte für das nukleäre

[Hier eingeben]

Scoring und Grading aller Gruppen für eIF6 dargestellt. Man sieht über alle Morphologien eine ähnliche Wertung für Score und Grade im Zellkern, so dass sich keine der Gruppen abgrenzt. Relevant zu erwähnen ist, dass für das Kollektiv der intestinalen Metaplasie zwei Schnitte aufgrund von Materialmangels aus der Wertung fielen. In der einfaktoriellen ANOVA-Analyse (Tabelle 9) präsentierten sich ein signifikanter Unterschied sowohl zwischen den Gruppen als auch innerhalb der Gruppen für das zytoplasmatische Grade ($p = 0,000$) und Score ($p = 0,006$). Für das nukleäre Score und Grade fand sich keine Signifikanz. Der zytoplasmatische Grade und Score für die Gruppe „Tumor“ grenzte sich signifikant im anschließenden Bonferroni-Test (Anhang 6) von allen inflammatorisch-veränderten Vorstufen ab.

Tabelle 9 - Einfaktorielle ANOVA-Analyse für die IHC-Auswertung der eIF6-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien mit Vergleich zwischen und innerhalb der jeweiligen Gruppen „zytoplasmatischer Score“, „zytoplasmatischer Grade“, „nukleärer Score“ und „nukleärer Grade“

eIF6		Quadratsumme	Freiheitsgrade	Quad. Mittelwert	F-Wert	Signifikanz
Zytoplasmatischer Score	Zwischen den Gruppen	281,144	4	70,286	4,173	0,006
	Innerhalb der Gruppen	690,508	41	16,842		
	Total	971,652	45			
Zytoplasmatisches Grade	Zwischen den Gruppen	9,518	4	2,38	6,767	0,000
	Innerhalb der Gruppen	14,417	41	0,352		
	Total	23,935	45			
Nukleärer Score	Zwischen den Gruppen	25,157	4	6,289	1,871	0,134
	Innerhalb der Gruppen	137,8	41	3,361		
	Total	162,957	45			
Nukleärer Grade	Zwischen den Gruppen	3,109	4	0,777	1,625	0,186
	Innerhalb der Gruppen	19,608	41	0,478		
	Total	22,717	45			

[Hier eingeben]

5 Diskussion

5.1 Rolle der einzelnen eIFs im Barrett-Adenokarzinom

Die eukaryotischen Initiationsfaktoren haben bedeutende Funktionen bei der Translation von Proteinen. Sie regulieren die Bindung an das Ribosom, entwinden die mRNA oder erkennen die 5'-Cap-Struktur als Bindungsstruktur für die kleine ribosomale Untereinheit als Teil des Präinitiationskomplexes während der Initiation. In diversen *in vitro*-Studien wurde ihre Rolle in der Karzinogenese verschiedener Malignome nachgewiesen (25; 64) und Optionen erörtert, eIFs als Tumormarker oder Therapieansatz (92) zu nutzen.

Eine ausführliche Studie zum Einfluss der Regulation der eukaryotischen Initiationsfaktoren im Barrett-Adenokarzinom und der dazu resultierenden Entzündungsstufen fehlt jedoch bisher. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird daher untersucht, ob und welche eukaryotischen Initiationsfaktoren im Adenokarzinom des Ösophagus exprimiert werden und ob sie einen Einfluss auf die Entstehung Barrett-Malignoms ausüben.

5.1.1 eIF1

eIF1 spielt eine wichtige Rolle bei der Initiation der Translation und ist Teil des sogenannten 43S-Präinitiationskomplexes. Dysregulationen in diesem Bereich finden sich in vielen Tumorentitäten, weshalb eIF1 als potentieller Biomarker angesehen wird. Im Kollektiv des Barrett-Adenokarzinoms zeigte sich nach immunhistochemischer Färbung eine signifikante Steigerung der Expression von eIF1 zwischen dem Zytoplasma der Tumorzellen und der intestinalen Metaplasie. Im Vergleich low grade/high grade Dysplasie zu Tumor präsentierte sich ebenfalls eine stärkere Anfärbung für eIF1 in den Tumorzellen. Es gab jedoch keine signifikante Veränderung des Färbemusters im Nukleus für eIF1. Im Gegensatz dazu wurde bei Untersuchungen von immunhistochemischen Schnitten des duktales Pankreaskarzinoms festgestellt, dass eine Herabregulierung der eIFs 1, 2D, 3C und 6 im Zytoplasma der Karzinomzellen stattfindet im Vergleich zum gesunden Gewebe (21). Als Schlussfolgerung deutet dies auf eine Relevanz der genannten eIFs und der Translationsinitiation im duktales Pankreaskarzinom. In der genannten Studie zeigte sich eine für eIF1 eine signifikante Abnahme im Zytoplasma der Tumorzellen von Grade 1 bis 3 im Vergleich zu den nicht-neoplastischen Zellen. Auch zeigte sich ein Zusammenhang zwischen niedriger Expression von eIF1 und einer schlechteren Gesamtüberleben der Patienten (21).

In den Immunoblot - Analysen der Studie von Golob-Schwarzl (2020) zum duktales Adenokarzinom des Pankreas zeigte sich ein erhöhter Proteingehalt von eIF1 in den nicht-neoplastischen Zellen des Pankreas. In den Malignomzellen der untersuchten Pankreaskarzinomschnitte zeigte sich eine vergleichsweise verminderter Proteingehalt von eIF1.

[Hier eingeben]

Im Dichtevergleich der Western Blots zum Barrett-Adenokarzinom stellte sich im Kontrast dazu für die OE33-Zellreihe eine erhöhte Expression für eIF1 dar im Vergleich zur gesunden Kontroll-Zelllinie (HEEC).

Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine relevant veränderte Expression von eIF1 im Adenokarzinom des Barrett-Ösophagus und somit auf eine veränderte Translationsinitiation in den Malignomzellen hin. Da bisher keine Daten im Zusammenhang mit der Regulation von eIF1 als Bestandteil des Vorinitiationskomplexes und der Entstehung des Barrett-Adenokarzinoms vorliegen, können keine Daten zum Vergleich herangezogen werden. Es ist jedoch durchaus in Betracht zu ziehen, eIF1 als prognostischer Biomarker und therapeutischer Ansatz beim Adenokarzinom des Ösophagus zu nutzen.

[Hier eingeben]

5.1.2 eIF2 α und p-eIF2 α

Als Antwort auf Stress bilden Zellen fehlerhaft gefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum. Die Zellen reagieren darauf mit der Unfolded Protein Response, kurz UPR, die durch die Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Retikulum Kinase (PERK) reguliert wird. Durch Aktivierung des PERK-Signalweges und die daran anschließende Phosphorylierung von eIF2 α durch PERK wird die Synthese neuer Proteine gedämpft, um die Zell-Homöostase aufrechtzuerhalten oder wiederherzustellen. In Studien wurde über erhöhte Mengen von phosphoryliertem eIF2 α bei krebserkrankten Patienten mit diagnostiziertem HER2-positiven Mammakarzinom (43) oder kolorektalen Karzinom (58) berichtet, was darauf schließen lässt, dass die PERK während der Tumorprogression vermehrt aktiviert wird und damit assoziiert die Phosphorylierung von eIF2 α gesteigert wird (74). Auch wurde eine Überregulation von eIF2 α und seiner phosphorylierten Form in Tumorgewebe von gastrointestinalen Malignomen nachgewiesen (51).

In den immunhistochemischen Färbungen der vorliegenden Studie zeigte sich ein stärkeres zytoplasmatisches Staining für eIF2 α von Tumorgewebe im Vergleich zur Meta- oder Dysplasie. Dies lässt darauf schließen, dass auch in den Zellen des Barrett-Adenokarzinom eIF2 α vermehrt exprimiert wird und ein wichtiger Regulationspunkt in der Karzinogenese des Ösophagusmalignoms sein könnte. Eine Auswertung der immunhistochemischen Schnitte für p-eIF2 α fand aus technischen Gründen nicht statt.

In den Western Blot-Analysen konnte für keine der Barrett-Zellreihen eine signifikante Veränderung für eIF2 α -Menge dargestellt werden. Es zeigte sich eher ein diffuses Expressionsmuster über alle Stadien. In den durchgeführten Western Blots für p-eIF2 α zeigte sich eine im Vergleich zu den anderen Stadien verminderte Phosphorylierung in den OE33-Zellen dar. Dieses könnte durch eine verminderte Kinaseaktivität von PERK und im Umkehrschluss zu einer geringeren Phosphorylierung von eIF2 α zustande kommen. Da die immunhistochemischen Ergebnisse nicht den Befunden aus der Zellkultur entsprechen, ist nun fraglich, ob es im Rahmen der in-vitro-Versuche in den Zelllinien zu einem veränderten Gehalt an eIF2 α und p-eIF2 α kommt, welche sich im menschlichen Gewebe sich nicht nachvollziehbar darstellen lassen. Zwar zeigt sich eine scheinbare Veränderung der Anfärbung von Entzündungsgewebe zum Malignomgewebe mittels eIF2 α , diese lässt sich jedoch nicht mittels Western Blot nicht reproduzieren. Hierbei sah man eine verminderte Proteinmenge von eIF2 α , welches reziprok zu den IHC-Ergebnissen wäre. Es ist fraglich, ob sich Ergebnisse der Zellkultur reliabel sind, da es sich hierbei lediglich um eine untersuchte Zelllinie aus einem einzelnen Patienten handelt, im Gegensatz zu den Ergebnissen der Immunhistochemie mit einem größeren Patientengut. Es gibt somit dennoch mögliche Hinweise auf eine Beeinflussung der Karzinogenese des Barrett-Adenokarzinoms durch eIF2 α oder dessen

[Hier eingeben]

Phosphorylierung im Rahmen des PERK-Signalweges bzw. im Umkehrschluss durch die UPR gibt.

[Hier eingeben]

5.1.3 eIF3a

In früheren Studien wurde darüber berichtet, dass eIF3a als Untereinheit von eIF3 eine relevante Rolle in verschiedenen Karzinogenesen spielt (91). Die Regulation von eIF3a ist assoziiert mit der Entstehung, Prognose, Metastasierung und Therapierbarkeit von Ösophagus (13)-, Lungen- (34), Mamma (2)-, Cervix (15)-, Colon (30)- und Pankreaskarzinomen (87). Auch als neues potientes Therapeutikum für Malignome rückt eIF3a in das Interessengebiet verschiedener Forschungsgruppen (56; 89). Wir fokussierten uns im Rahmen der Studie zum Barrett-Kollektiv auf eIF3a als größte Untereinheit von eIF3 und bereits vorbekannte relevante eIF für den Tumorprogress im Ösophagus. Es zeigte sich während der Untersuchungen keine signifikante Veränderung in der Expression von eIF3a in den verschiedenen Barrett-Stadien in den immunhistochemischen Färbungen. Auch in den Western Blot - Experimenten stellte sich der eIF3a-Gehalt nicht signifikant verändert in den CP-A Zellen dar im Vergleich zur gesunden Kontrolle (HEEC), zum Karzinom (OE33) und der Metastase (OACM5.1.C). Letztlich zeigt sich in unserer Studie kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen eIF3a und der Entstehung des Adenokarzinoms im Ösophagus.

5.1.4 eIF4E

Eine Fehlregulation der Protein-Synthese und das damit verbundene Zell- und Gewebewachstum führt konsekutiv zur Malignomentstehung. Laut vorheriger Studien ist die Expression von eIF4E signifikant erhöht im Karzinomgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe (12; 24). Die Translation von Proteinen in Zellen muss streng reguliert werden um die Entstehung von Krebszellen zu vermeiden. Diese Regulation findet vor allem während der Initiation der Translation statt, obwohl auch noch während der Elongationsphase Kontrollmechanismen greifen können. Die Rolle von eIF4E während der Translationsinitiation und der Tumorentstehung ist gut erforscht und wurde in diversen Studien bereits beschrieben, jedoch ist nach wie vor wenig über die Expressionsregulation von eIF4E bekannt. Nachweislich führt eine vermehrte Expression von eIF4E nicht, wie angenommen, zu einer generell vermehrten Proteintranslation in der Zelle, jedoch zu einer verstärkten Translation von „eIF4E – sensibler“ mRNAs, welche im Zusammenhang mit der Bildung von Malignomen stehen soll. eIF4E hat also bei vermehrter Expression eine Onkogen-ähnliche Wirkung, führt zu unkontrollierten Zellwachstum und fördert die Karzinogenese (39). Dies zeigt die wichtige Rolle von eIF4e in der Proteinsynthese.

In der Studie von Diab-Assaf (16) wurde in IHC-Schnitten von kolorektalen Adenokarzinomgewebe eine gesteigerte Expression von eIF4E im Epithel dargestellt. In der gesunden Kontrolle zeigte sich das eIF4E-Färbung negativ, in der Dysplasie leicht und im Adenokarzinom deutlich positiv, ein Indiz dafür, dass im kolorektalen Karzinom eIF4E überexprimiert wird und eventuell für die Karzinogenese mitverantwortlich ist. Im

[Hier eingeben]

immunhistochemischen Staining des Ösophagusgewebe unserer Studie zeigte sich für eIF4E keine signifikante Veränderung zwischen den Stadien. Die eIF4E-Expression zeigt keine Unterschiede zwischen Karzinom- und Kontrollgewebe, was darauf hinweist, dass eIF4E für die Tumorgenese des Barrett-Adenokarzinom keine Relevanz hat. In den *in vitro*-Analysen dieser Studie zeigt sich in den Western Blots für eIF4E eine erhöhte Proteinmenge in den Zellen der Zelllinie OE33 (Karzinom) im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Entzündung. Eventuell könnte man in diesem Zusammenhang, wie bereits im Ergebniskapitel angedeutet, von einer verstärkten Transkription von eIF4E sprechen und somit konsekutiv von einer vermehrten Translation von eIF4E-sensiblen mRNAs (39). Zusammenfassend scheint es zwar in den Zellexperimenten Hinweise auf eine relevante Rolle von eIF4E in der Karzinogenese zu geben, diesmal in Bezug auf das Barrett-Adenokarzinom, diese Ergebnisse lassen sich jedoch nicht auf die immunhistochemischen Färbungen am Patientengewebe übertragen. Es ist daher fraglich, ob eIF4E als Ausgangspunkt für Diagnostik als Biomarker im Barrett-Karzinom geeignet ist. Es könnte jedoch ein Ansatz für die zukünftige Therapie bei Ösophaguskarzinomen sein.

5.1.5 eIF5 und eIF5B

In vorherigen Studien wurde für eIF5 eine tragende Rolle in verschiedenen Karzinogenesen nachgewiesen. Beispielsweise wurde gemeinsam mit dem eukaryotischen Initiationsfaktor 6 in Gewebeanschnitten von Lungenkrebspatienten via RT-PCR eine vermehrte Expression beider eIFs aufgezeigt (11). Als Schlussfolgerung scheint eIF5 eng verbunden mit der Entstehung von Lungenkarzinomen. Ähnliche Erkenntnisse präsentierten sich in der retrospektiven Studie zum Endometriumskarzinom von Smolle et al. (2019). In den immunhistochemischen Gewebeschnitten der Malignompatienten zeigte sich eine signifikant erhöhte Anfärbung von eIF5 im Vergleich zum nicht-neoplastischen Gewebe (80). Auch in Anschnitten von Mammakarzinomen bei männlichen Patienten konnte eine Hochregulation der Transkription für eIF5 und damit assoziiert eine schlechtere Prognose für das Gesamtüberleben der Patienten nachgewiesen werden (36). In der vorliegenden Studie zum Barrett-Adenokarzinom wurden lediglich Western Blot – Analysen zu eIF5 vorgenommen, eine immunhistochemische Anfärbung fand aufgrund von technischen Problemen nicht statt, da der genutzte Antikörper das Gewebe nicht ausreichend anfärbte. In den Analysen zu den Zellkulturexperimenten zeigte sich eine vermehrte Transkription von eIF5 in den OE33-Malignomzellen im Vergleich zur gesunden HEEC-Zelllinien, unabhängig von den gemessenen Zeitpunkten. Dies könnte auf einen möglichen Zusammenhang zwischen vermehrter eIF5-Expression und der Barrett-Karzinogenese hindeuten.

Eine der Funktionen von eIF5B unter physiologischen Bedingungen ist sowohl die Vermittlung der Bindung der ribosomalen Untereinheiten 40S und 60S für die Bildung eines

[Hier eingeben]

funktionsfähigen Ribosomens, als auch die Stabilisierung der Met-tRNAⁱ-Bindung (79). Somit ist eIF5B essenziell für den regulären Ablauf der Translationsinitiation. Auch unter hypoxischen Konditionen oder bei viraler Infektion ist eIF5B Regulator der Protein-Translation im Rahmen der Initiation durch die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), eine Sekundärstruktur der mRNA, welche sowohl viralen als auch eukaryotischen Ursprungs sein kann (70; 85). Dies lässt vermuten, dass eIF5B mit der virus-assoziierten Karzinogenese und der damit verbundenen Immunreaktion involviert ist (84). Daher könnte eIF5B als therapeutischer Ansatzpunkt für Malignome in zukünftige Studien in Betracht gezogen werden. In den Western Blot – Analysen der vorliegenden Studie zeigte sich eine signifikante Verminderung des eIF5B-Gehaltes in den Entzündungszellen. Es ist also anzunehmen, dass die Transkription und Translation von eIF5B während der Inflammation bzw. der damit verbundenen Immunreaktion inhibiert oder abgebaut wird. In der Studie zur Rolle von eIF5B während einer Infektion mit Picornaviridae zeigte sich in den Immunoblot-Analysen eine durch Enteroviren gebildete Protease (3C) spezifische Spaltung von eIF5B. eIF5B könnte daher eine zusätzliche Rolle bei der Unterbrechung der Translation spielen, die in Enterovirus-infizierten Zellen auftritt (8). Dies wurde auch in mit Hepatitis C – infizierten Zellen nachgewiesen (63). Eine signifikant vermehrte Expression von eIF5B in Tumorzellen zeigte sich dagegen nicht in den Western Blot – Analysen, jedoch in den immunhistochemischen Schnitten der Adenokarzinompatienten. Hierbei wurde verstärkte zytoplasmatische Anfärbung von eIF5B beobachtet. Dies wiederum würde doch Beobachtungen aus anderen Studien bestätigen, dass eIF5B in Malignomen vermehrt exprimiert wird (47; 72; 84) und somit in stressbedingten Zellveränderungen wie der Karzinogenese eine tragende Rolle spielt.

[Hier eingeben]

5.1.6 eIF6

Eine verstärkte Expression von eIF6 führt in ovariellen Malignomzellen zu einer Stimulation der Motilität und Invasivität. Diese erhöhte Expression von eIF6 triggert eine Überregulation von Proteinen, welche an einem funktionellen Netzwerk beteiligt sind, dass für die Tumorzell-Motilität zuständig ist (69). eIF6 wird als nukleäres Matrixprotein bezeichnet und wurde im Zytoplasma der Drüsenzellen in den Krypten des Kolonepithels nachgewiesen (76). Vermehrte Expression von eIF6 tritt im kolorektalen Karzinom und auch in abgeschwächter Form in kanzerösen Vorstufen auf. Es kommt zu einem progressiven Anstieg von eIF6 von gesundem über dysplastisches zu Tumorgewebe (94). Die Epithelzellen des ösophagealen Adenokarzinoms zeigten sich in der IHC-Färbung signifikant verstärkt angefärbt im Vergleich zur Metaplasie und Dysplasie. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass eIF6 in Barrett-Tumorzellen ebenfalls vermehrt exprimiert ist und damit für die Tumorentstehung von Relevanz ist, ähnlich wie in der oben genannten Studie (Sanvito et al. 2000). Diese Erkenntnis lässt sich jedoch nicht mit den *in vitro*-Analysen bestätigen. Es zeigt sich kein zeitlicher Zusammenhang zwischen eIF6-Gehalt in den Zellen und dem Fortschreiten der Karzinogenese im Barrett-Ösophagus.

[Hier eingeben]

5.2 Limitationen

Diese Studie hat diverse Limitationen. Die Anzahl der angefärbten Schnitte aus der Barrett-Kohorte ist gering, so dass eine allgemeingültige Aussage über die Rolle verschiedener eIFs in der Barrett-Karzinogenese nur schwer zu tätigen ist. Weitere Färbungen waren auch aus zeitlichen Gründen und durch die Limitierung der zur Verfügung stehenden Proben für diese Studie nicht möglich. Zusätzlich ergab sich während der Etablierung neuer Färbeprotokolle in der IHC-Diagnostik mit der Zeit eine unzureichende Anfärbung von eIF4E, was uns zu einem Wechsel des Antikörpers und einer erneuten immunhistochemischen Färbung der Schnitte zwang. Diese war bei Auswertung zufriedenstellend. Ebenfalls wurde von einer Auswertung von p-eIF2 α und eIF5 in den immunhistochemischen Schnitten abgesehen, da auch hier nur eine unzureichende Anfärbung stattfand und zu diesem Zeitpunkt kein alternativer Antikörper vorlag. Des Weiteren gibt es keine Vorkenntnisse durch andere Studien zur Rolle der eIFs in Barrett-Entzündungsvorstufen und dem assoziierten Malignom. Lediglich eine Studie über den Einfluss der eIFs im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (13) hat die Wechselwirkungen zwischen eIFs und der Karzinogenese untersucht. Es ist nach wie vor unklar, welche weiteren Proteine verändert exprimiert werden und wie eukaryotischen Initiationsfaktoren die Regulationsmechanismen in diesem Typus Karzinom verändern. Weitere eIFs bzw. zusätzliche Untereinheiten der genutzten eIFs wurden nicht untersucht, sollten allerdings in zukünftigen Studien als potenzieller Biomarker oder Therapietargets für das Barrett-Adenokarzinom untersucht werden.

[Hier eingeben]

6 Zusammenfassung

Die Barrett-Metaplasie ist eine aufgrund von Reflux entstehende entzündliche Veränderung, die in Endkonsequenz in ein Adenokarzinom münden kann. Die chronische Reizung und Entzündung ist die Basis für die Karzinogenese des Barrett-Malignoms. Eng verbunden damit und in diversen Studien nachgewiesen ist die Rolle der eukaryotischen Initiationsfaktoren in der Karzinogenese. Die veränderte Regulation der Translation und Expression von Proteinen führt zu einem veränderten Überlebenszyklus von Zellen und auf lange Sicht zu einer Entartung der Zellen. Wie in dieser Studie mehrfach aufgezeigt wurden viele eIFs experimentell in diversen Malignomen erhöht oder vermindert exprimiert nachgewiesen. Auch im Barrett-Adenokarzinom wurde anhand unserer Experimente belegt, dass es in den verschiedenen Stadien der Karzinogenese (Metaplasie, low grade und high grade Dysplasie, Karzinom) zur unterschiedlichen Expression der eIFs kommt und damit die Regulation der Translation während der Krebsentstehung verändert ist bzw. es zu einer Fehlregulation kommt. Assoziiert damit ist die veränderte Proteintranslation und Zellhomöostase, was wir in unseren Zellkulturexperimenten nachweisen konnten.

In dieser Arbeit wurde weiterhin überprüft, ob sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Veränderung der Expression der eIFs im Barrett-Karzinom stattfindet. Dazu wurden sowohl Zellkulturexperimente mit vier verschiedenen Zelllinien in unterschiedlichen Stadien der Entartung als auch immunhistologische Untersuchungen der ausgewählten eukaryotischen Initiationsfaktoren an Ösophagus-Biopsien und Resektaten von Patienten mit Barrett-assoziiierter Metaplasie, Dysplasie und Barrett-Karzinomen durchgeführt.

Es ist unbestreitbar, dass die molekulare Pathologie eine wichtige Rolle in der künftigen Diagnostik und in therapeutischen Anwendungen in der täglichen klinischen Praxis spielen wird. Eukaryotische Initiationsfaktoren sind mögliche Ziele in der zukünftigen Krebstherapie. Der Einfluss verschiedener eIFs auf die Karzinogenese muss jedoch noch geklärt werden. Auch wenn die frühen Stadien des Barrett-Adenokarzinoms bei der Diagnose durch Endoskopie in einer mehrdimensionalen Therapie gut behandelt werden können, ist die 5-Jahres-Überlebensrate sehr gering, was die Untersuchung der molekularen Grundlagen dieser Tumorentität sowie die Identifikation neuer Zielstrukturen für mögliche therapeutische Interventionen notwendig macht.

[Hier eingeben]

7 Literaturverzeichnis

1. Ali MU, Ur Rahman MS, Jia Z, Jiang C (2017)
Eukaryotic translation initiation factors and cancer.
Tumour Biol 39, 1010428317709805
2. Bachmann F, Bänziger R, Burger MM (1997)
Cloning of a novel protein overexpressed in human mammary carcinoma.
Cancer Res 57, 988–994
3. B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A (2013)
The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression.
Nucleic Acids Res 41, 7683–7699
4. Bonaldo P, Sandri M (2013)
Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy.
Dis Model Mech 6, 25–39
5. Bonomi M, Patsias A, Posner M, Sikora A (2014)
The role of inflammation in head and neck cancer.
Adv Exp Med Biol 816, 107–127
6. Borden KLB (2016)
The eukaryotic translation initiation factor eIF4E wears a "cap" for many occasions.
Translation (Austin) 4, e1220899
7. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J (2005)
A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress.
Science 307, 935–939
8. Breyne S de, Bonderoff JM, Chumakov KM, Lloyd RE, Hellen CUT (2008)
Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF5B by enterovirus 3C proteases.
Virology 378, 118–122
9. Brina D, Miluzio A, Ricciardi S, Biffo S (2015)
eIF6 anti-association activity is required for ribosome biogenesis, translational control and tumor progression.
Biochim Biophys Acta 1849, 830–835
10. Browning KS, Gallie DR, Hershey JW, Hinnebusch AG, Maitra U, Merrick WC, Norbury C (2001)
Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 311
This letter arises from the Cold Spring Harbor Translational Control meeting held on September 6–10 2000 in Cold Spring Harbor, NY, USA.
Trends in Biochemical Sciences 26, 284

[Hier eingeben]

11. Cai S-X, Chen W-S, Zeng W, Cheng X-F, Lin M-B, Wang J-S (2021)
Roles of HDAC2, eIF5, and eIF6 in Lung Cancer Tumorigenesis.
Curr Med Sci 41, 764–769
12. Chen C-N, Hsieh F-J, Cheng Y-M, Lee P-H, Chang K-J (2004)
Expression of eukaryotic initiation factor 4E in gastric adenocarcinoma and its association with clinical outcome.
J Surg Oncol 86, 22–27
13. Chen G, Burger MM (1999)
p150 expression and its prognostic value in squamous-cell carcinoma of the esophagus.
Int. J. Cancer 84, 95–100
14. Coussens LM, Werb Z (2002)
Inflammation and cancer.
Nature 420, 860–867
15. Dellas A, Torhorst J, Bachmann F, Bänziger R, Schultheiss E, Burger MM (1998)
Expression of p150 in cervical neoplasia and its potential value in predicting survival.
Cancer 83, 1376–1383
16. Diab-Assaf M, Abou-khouzam R, Saadallah-Zeidan N, Habib K, Bitar N, Karam W, Liagre B, Harakeh S, Azar R (2015)
Expression of eukaryotic initiation factor 4E and 4E binding protein 1 in colorectal carcinogenesis.
Int J Clin Exp Pathol 8, 404–413
17. Fass R, Ofman JJ (2002)
Gastroesophageal reflux disease--should we adopt a new conceptual framework?
Am J Gastroenterol 97, 1901–1909
18. Gartmann M, Blau M, Armache J-P, Mielke T, Topf M, Beckmann R (2010)
Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining.
J. Biol. Chem. 285, 14848–14851
19. Gillen P, Keeling P, Byrne PJ, West AB, Hennessy TP (1988)
Experimental columnar metaplasia in the canine oesophagus.
Br J Surg 75, 113–115
20. Golob-Schwarzl N, Krassnig S, Toeglhofer AM, Park YN, Gogg-Kamerer M, Vierlinger K, Schröder F, Rhee H, Schicho R, Fickert P, Haybaeck J (2017)
New liver cancer biomarkers: PI3K/AKT/mTOR pathway members and eukaryotic translation initiation factors.
Eur J Cancer 83, 56–70
21. Golob-Schwarzl N, Puchas P, Gogg-Kamerer M, Weichert W, Göppert B, Haybaeck J (2020)
New Pancreatic Cancer Biomarkers eIF1, eIF2D, eIF3C and eIF6 Play a Major Role in Translational Control in Ductal Adenocarcinoma.
Anticancer Res 40, 3109–3118

[Hier eingeben]

22. Golob-Schwarzl N, Schweiger C, Koller C, Krassnig S, Gogg-Kamerer M, Gantenbein N, Toeglhofer AM, Wodlej C, Bergler H, Pertschy B, Uranitsch S, Holter M, El-Heliebi A, Fuchs J, Punschart A, Stiegler P, Keil M, Hoffmann J, Henderson D, Lehrach H, Reinhard C, Regenbrecht C, Schicho R, Fickert P, Lax S, Haybaeck J (2017)
Separation of low and high grade colon and rectum carcinoma by eukaryotic translation initiation factors 1, 5 and 6.
Oncotarget 8, 101224–101243
23. Gomes-Duarte A, Lacerda R, Menezes J, Romão L (2018)
eIF3: a factor for human health and disease.
RNA Biol 15, 26–34
24. Graff JR, Konicek BW, Lynch RL, Dumstorf CA, Dowless MS, McNulty AM, Parsons SH, Brail LH, Colligan BM, Koop JW, Hurst BM, Deddens JA, Neubauer BL, Stancato LF, Carter HW, Douglass LE, Carter JH (2009)
eIF4E activation is commonly elevated in advanced human prostate cancers and significantly related to reduced patient survival.
Cancer Res 69, 3866–3873
25. Guan X-Y, Fung JM-W, Ma N-F, Lau S-H, Tai L-S, Xie D, Zhang Y, Hu L, Wu Q-L, Fang Y, Sham JST (2004)
Oncogenic role of eIF-5A2 in the development of ovarian cancer.
Cancer Res 64, 4197–4200
26. Guillem PG (2005)
How to make a Barrett esophagus: pathophysiology of columnar metaplasia of the esophagus.
Dig Dis Sci 50, 415–424
27. Günther T (2002)
Die gastroösophageale Übergangszone - Pathomorphologie der Entzündung und molekulare Genetik des Karzinoms, 10-13
28. Guri Y, Colombi M, Dazert E, Hindupur SK, Roszik J, Moes S, Jenoe P, Heim MH, Riezman I, Riezman H, Hall MN (2017)
mTORC2 Promotes Tumorigenesis via Lipid Synthesis.
Cancer Cell 32, 807-823.e12
29. Hashem Y, Des Georges A, Dhote V, Langlois R, Liao HY, Grassucci RA, Hellen CUT, Pestova TV, Frank J (2013)
Structure of the mammalian ribosomal 43S preinitiation complex bound to the scanning factor DHX29.
Cell 153, 1108–1119
30. Haybaeck J, O'Connor T, Spilka R, Spizzo G, Ensinger C, Mikuz G, Brunhuber T, Vogetseder A, Theurl I, Salvenmoser W, Draxl H, Bänziger R, Bachmann F, Schäfer G, Burger M, Obrist P (2010)
Overexpression of p150, a part of the large subunit of the eukaryotic translation initiation factor 3, in colon cancer.
Anticancer Res 30, 1047–1055

[Hier eingeben]

31. Hershey JWB (2015)
The role of eIF3 and its individual subunits in cancer.
Biochim Biophys Acta 1849, 792–800
32. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J (2005)
mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events.
Cell 123, 569–580
33. Hu ZW, Wang ZG, Wu JM, Tian SR, Zhang Y, Zhan XL, Du X, Wang F, Xin RH, Xu H (2017)
Relationship between the severity of reflux esophagitis and the esophageal motility features on high resolution manometry.
Zhonghua Yi Xue Za Zhi 97, 3306–3311
34. Huang M-S, Yuan F-Q, Gao Y, Liu J-Y, Chen Y-X, Wang C-J, He B-M, Zhou H-H, Liu Z-Q (2019)
Circular RNA screening from EIF3a in lung cancer.
Cancer Med 8, 4159–4168
35. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IGH, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ (2007)
Temozolimum, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma.
N Engl J Med 356, 2271–2281
36. Humphries MP, Sundara Rajan S, Droop A, Suleman CAB, Carbone C, Nilsson C, Honarpisheh H, Cserni G, Dent J, Fulford L, Jordan LB, Jones JL, Kanthan R, Litwiniuk M, Di Benedetto A, Mottolese M, Provenzano E, Shousha S, Stephens M, Walker RA, Kulka J, Ellis IO, Jeffery M, Thygesen HH, Cappelletti V, Daidone MG, Hedenfalk IA, Fjällskog M-L, Melisi D, Stead LF, Shaaban AM, Speirs V (2017)
A Case-Matched Gender Comparison Transcriptomic Screen Identifies eIF4E and eIF5 as Potential Prognostic Markers in Male Breast Cancer.
Clin Cancer Res 23, 2575–2583
37. Ingle GR, Sievers TM, Holt CD (2000)
Sirolimus: continuing the evolution of transplant immunosuppression.
Ann Pharmacother 34, 1044–1055
38. Ismail-Beigi F, Pope CE (1974)
Distribution of the histological changes of gastroesophageal reflux in the distal esophagus of man.
Gastroenterology 66, 1109–1113
39. Karki S, Andrieu C, Ziouziou H, Rocchi P (2015)
The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) as a Therapeutic Target for Cancer.
Adv Protein Chem Struct Biol 101, 1–26
40. Katsikis PD, Cohen SB, Londei M, Feldmann M (1995)
Are CD4+ Th1 cells pro-inflammatory or anti-inflammatory? The ratio of IL-10 to IFN-

[Hier eingeben]

- gamma or IL-2 determines their function.
Int Immunol 7, 1287–1294
41. Kazi AA, Pruznak AM, Frost RA, Lang CH (2011)
Sepsis-induced alterations in protein-protein interactions within mTOR complex 1 and the modulating effect of leucine on muscle protein synthesis.
Shock 35, 117–125
 42. Kellerman R, Kintanar T (2017)
Gastroesophageal Reflux Disease.
Prim Care 44, 561–573
 43. Kim JY, Heo S-H, Song IH, Park IA, Kim Y-A, Gong G, Lee HJ (2016)
Activation of the PERK-eIF2 α Pathway Is Associated with Tumor-infiltrating Lymphocytes in HER2-Positive Breast Cancer.
Anticancer Res 36, 2705–2711
 44. Kolupaeva VG (2005)
Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association.
RNA 11, 470–486
 45. Koop H, Fuchs KH, Labenz J, Lynen Jansen P, Messmann H, Miehke S, Schepp W, Wenzl TG (Hrsg) (05/2014 // 2014)
Gastroösophageale Refluxkrankheit unter Federführung Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) // S2k-Leitlinie: Gastroösophageale Refluxkrankheit unter Federführung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS):AWMF Register Nr. 021-013
 46. LeFebvre AK, Korneeva NL, Trutschl M, Cvek U, Duzan RD, Bradley CA, Hershey JWB, Rhoads RE (2006)
Translation Initiation Factor eIF4G-1 Binds to eIF3 through the eIF3e Subunit.
J. Biol. Chem. 281, 22917–22932
 47. Li Q, Xiao M, Shi Y, Hu J, Bi T, Wang C, Yan L, Li X (2021)
eIF5B regulates the expression of PD-L1 in prostate cancer cells by interacting with Wig1.
BMC Cancer 21
 48. Lin KY, Nag N, Pestova TV, Marintchev A (2018)
Human eIF5 and eIF1A Compete for Binding to eIF5B.
Biochemistry 57, 5910–5920
 49. Lindkvist B, Johansen D, Stocks T, Concin H, Bjørge T, Almquist M, Häggström C, Engeland A, Hallmans G, Nagel G, Jonsson H, Selmer R, Ulmer H, Tretli S, Stattin P, Manjer J (2014)
Metabolic risk factors for esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma: a prospective study of 580,000 subjects within the Me-Can project.
BMC Cancer 14, 103

[Hier eingeben]

50. Llácer JL, Hussain T, Saini AK, Nanda JS, Kaur S, Gordiyenko Y, Kumar R, Hinnebusch AG, Lorsch JR, Ramakrishnan V (2018)
Translational initiation factor eIF5 replaces eIF1 on the 40S ribosomal subunit to promote start-codon recognition.
Elife 7
51. Lobo MV, Martín ME, Pérez MI, Alonso FJ, Redondo C, Alvarez MI, Salinas M (2000)
Levels, phosphorylation status and cellular localization of translational factor eIF2 in gastrointestinal carcinomas.
Histochem J 32, 139–150
52. Lowe D, Kudaravalli P, Hsu R. (Hrsg) (2022)
StatPearls.
2023. Aufl. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
53. Malley CO, Pidgeon GP (2016)
The mTOR pathway in obesity driven gastrointestinal cancers: Potential targets and clinical trials.
BBA Clin 5, 29–40
54. Markiewski MM, Lambris JD (2007)
The Role of Complement in Inflammatory Diseases From Behind the Scenes into the Spotlight.
Am J Pathol 171, 715–727
55. Marshall RE, Anggiansah A, Owen WA, Owen WJ (1997)
The relationship between acid and bile reflux and symptoms in gastro-oesophageal reflux disease.
Gut 40, 182–187
56. Mei C, Liu C, Gao Y, Dai W-T, Zhang W, Li X, Liu Z-Q (2022)
eIF3a Regulates Colorectal Cancer Metastasis via Translational Activation of RhoA and Cdc42.
Front Cell Dev Biol 10
57. Messmann H (Hrsg) (2021)
Klinische Gastroenterologie.
Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
58. Minnee E, Faller WJ (2021)
Translation initiation and its relevance in colorectal cancer.
FEBS J 288, 6635–6651
59. Montrucchio G, Lupia E, Battaglia E, Passerini G, Bussolino F, Emanuelli G, Camussi G (1994)
Tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis depends on in situ platelet-activating factor biosynthesis.
J Exp Med 180, 377–382

[Hier eingeben]

60. Moser B, Willimann K (2004)
Chemokines: role in inflammation and immune surveillance.
Ann Rheum Dis 63 Suppl 2, ii84-ii89
61. Nanda JS, Cheung Y-N, Takacs JE, Martin-Marcos P, Saini AK, Hinnebusch AG, Lorsch JR (2009)
eIF1 controls multiple steps in start codon recognition during eukaryotic translation initiation.
J Mol Biol 394, 268–285
62. Nathan CO, Franklin S, Abreo FW, Nassar R, Benedetti A de, Williams J, Stucker FJ (1999)
Expression of eIF4E during head and neck tumorigenesis: possible role in angiogenesis.
Laryngoscope 109, 1253–1258
63. Niepmann M, Gerresheim GK (2020)
Hepatitis C Virus Translation Regulation.
Int J Mol Sci 21
64. Oblinger JL, Burns SS, Huang J, Pan L, Ren Y, Shen R, Kinghorn AD, Welling DB, Chang L-S (2017)
Overexpression of eIF4F components in meningiomas and suppression of meningioma cell growth by inhibiting translation initiation.
Exp Neurol 299, 299–307
65. Oh CK, Filler SG, Cho SH (2001)
Eukaryotic translation initiation factor-6 enhances histamine and IL-2 production in mast cells.
J Immunol 166, 3606–3611
66. Passmore LA, Schmeing TM, Maag D, Applefield DJ, Acker MG, Algire MA, Lorsch JR, Ramakrishnan V (2007)
The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome.
Mol Cell 26, 41–50
67. Pestova TV, Kolupaeva VG (2002)
The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection.
Genes Dev 16, 2906–2922
68. Peterson TR, Sabatini DM (2005)
eIF3: a connectOR of S6K1 to the translation preinitiation complex.
Mol Cell 20, 655–657
69. Pinzaglia M, Montaldo C, Polinari D, Simone M, La Teana A, Tripodi M, Mancone C, Londei P, Benelli D (2015)
EIF6 over-expression increases the motility and invasiveness of cancer cells by modulating the expression of a critical subset of membrane-bound proteins.
BMC Cancer 15, 131

[Hier eingeben]

70. Pisareva VP, Pisarev AV (2014)
eIF5 and eIF5B together stimulate 48S initiation complex formation during ribosomal scanning.
Nucleic Acids Res 42, 12052–12069
71. Ramanathan A, Robb GB, Chan S-H (2016)
mRNA capping: biological functions and applications.
Nucleic Acids Res 44, 7511–7526
72. Ross JA, Dungen KV, Bressler KR, Fredriksen M, Khandige Sharma D, Balasingam N, Thakor N (2019)
Eukaryotic initiation factor 5B (eIF5B) provides a critical cell survival switch to glioblastoma cells via regulation of apoptosis.
Cell Death Dis 10, 57
73. Rossi S, Baili P, Capocaccia R, Caldora M, Carrani E, Minicozzi P, Pierannunzio D, Santaquilani M, Trama A, Allemani C, Belot A, Buzzoni C, Lorez M, Angelis R de (Hrsg) (2015)
The EUROCARE-5 study on cancer survival in Europe 1999-2007: Database, quality checks and statistical analysis methods
74. Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I (2016)
The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress.
Curr Mol Med 16, 533–544
75. Runge TM, Abrams JA, Shaheen NJ (2015)
Epidemiology of Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma.
Gastroenterol Clin North Am 44, 203–231
76. Sanvito F, Vivoli F, Gambini S, Santambrogio G, Catena M, Viale E, Veglia F, Donadini A, Biffo S, Marchisio PC (2000)
Expression of a highly conserved protein, p27BBP, during the progression of human colorectal cancer.
Cancer Res 60, 510–516
77. Savarino E, Marabotto E, Bodini G, Pellegatta G, Coppo C, Giambruno E, Brunacci M, Zentilin P, Savarino V (2017)
Epidemiology and natural history of gastroesophageal reflux disease.
Minerva Gastroenterol Dietol 63, 175–183
78. Sharma R, Quilty F, Gilmer JF, Long A, Byrne A-M (2017)
Unconjugated secondary bile acids activate the unfolded protein response and induce golgi fragmentation via a src-kinase-dependant mechanism.
Oncotarget 8, 967–978
79. Shin B-S, Maag D, Roll-Mecak A, Arefin MS, Burley SK, Lorsch JR, Dever TE (2002)
Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity.
Cell 111, 1015–1025

[Hier eingeben]

80. Smolle MA, Czapiewski P, Lapińska-Szumczyk S, Majewska H, Supernat A, Zaczek A, Biernat W, Golob-Schwarzl N, Haybaeck J (2019)
The Prognostic Significance of Eukaryotic Translation Initiation Factors (eIFs) in Endometrial Cancer.
Int J Mol Sci 20
81. Sonenberg N, Hinnebusch AG (2009)
Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets.
Cell 136, 731–745
82. Spilka R, Ernst C, Mehta AK, Haybaeck J (2013)
Eukaryotic translation initiation factors in cancer development and progression.
Cancer Lett 340, 9–21
83. Subramanian CR, Triadafilopoulos G (2015)
Endoscopic treatments for dysplastic Barrett's esophagus: resection, ablation, what else?
World J Surg 39, 597–605
84. Suresh S, Chen B, Zhu J, Golden RJ, Lu C, Evers BM, Novaresi N, Smith B, Zhan X, Schmid V, Jun S, Karacz CM, Peyton M, Zhong L, Wen Z, Sathe AA, Xing C, Behrens C, Wistuba II, Xiao G, Xie Y, Fu Y-X, Minna JD, Mendell JT, O'Donnell KA (2020)
eIF5B drives integrated stress response-dependent translation of PD-L1 in lung cancer.
Nat Cancer 1, 533–545
85. Thakor N, Smith MD, Roberts L, Faye MD, Patel H, Wieden H-J, Cate JHD, Holcik M (2017)
Cellular mRNA recruits the ribosome via eIF3-PABP bridge to initiate internal translation.
RNA Biol 14, 553–567
86. Wang L, Wen X, Luan F, Fu T, Gao C, Du H, Guo T, Han J, Huangfu L, Cheng X, Ji J (2019)
EIF3B is associated with poor outcomes in gastric cancer patients and promotes cancer progression via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.
Cancer Manag Res 11, 7877–7891
87. Wang SQ, Liu Y, Yao MY, Jin J (2016)
Eukaryotic Translation Initiation Factor 3a (eIF3a) Promotes Cell Proliferation and Motility in Pancreatic Cancer.
J Korean Med Sci 31, 1586–1594
88. Whiteman DC, Kendall BJ (2016)
Barrett's oesophagus: epidemiology, diagnosis and clinical management.
Med J Aust 205, 317–324
89. Yin J-Y, Zhang J-T, Zhang W, Zhou H-H, Liu Z-Q (2018)
eIF3a: A new anticancer drug target in the eIF family.
Cancer Lett 412, 81–87

[Hier eingeben]

90. Zhang F, Waheed S, Armato U, Wu J, Zhang C, Li Z (2022)
eIF6 as a Promising Diagnostic and Prognostic Biomarker for Poorer Survival of Cutaneous Melanoma.
Front Oncol 12, 848346
91. Zhang L, Pan X, Hershey JWB (2007)
Individual overexpression of five subunits of human translation initiation factor eIF3 promotes malignant transformation of immortal fibroblast cells.
J. Biol. Chem. 282, 5790–5800
92. Zhang W, Gong P, Tian Q, Han S, Wang J, He P, Guo Y, Wang G, Chen Q, Huang J, Li M (2022)
The eIF4A Inhibitor Silvestrol Blocks the Growth of Human Glioblastoma Cells by Inhibiting AKT/mTOR and ERK1/2 Signaling Pathway.
J Oncol 2022, 4396316
93. Zhou S, Wang G-P, Liu C, Zhou M (2006)
Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and angiogenesis: prognostic markers for breast cancer.
BMC Cancer 6, 231
94. Zhu W, Li GX, Chen HL, Liu XY (2017)
The role of eukaryotic translation initiation factor 6 in tumors.
Oncol Lett 14, 3–9

[Hier eingeben]

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Rolle der eIFs in der Protein Translation	12
Abbildung 2: Analyse der Expression von eIF1 mittels Western Blot.	29
Abbildung 3: Analyse der Expression von eIF2 α mittels Western Blot.	30
Abbildung 4: Analyse der Expression von p-eIF2 α mittels Western Blot	31
Abbildung 5: Analyse der Expression von eIF3a mittels Western Blot.	32
Abbildung 6: Analyse der Expression von eIF4E mittels Western Blot.	33
Abbildung 7: Analyse der Expression von eIF5 mittels Western Blot	34
Abbildung 8: Analyse der Expression von eIF5B mittels Western Blot.	36
Abbildung 9: Analyse der Expression von eIF6 mittels Western Blot.	37
Abbildung 10 A - E: Exemplarische HE-Schnitte	40
Abbildung 11 A - E: Immunhistochemische Schnitte mit eIF1 – Färbung.	42
Abbildung 12 A - D: Säulendiagramm zur Anfärbung von eIF1.	44
Abbildung 13 A - E: Immunhistochemische Schnitte mit eIF2 α – Färbung.	46
Abbildung 14 A - B: Säulendiagramm zur Anfärbung von eIF2 α .	47
Abbildung 15 A - E: Immunhistochemische Schnitte mit eIF3a – Färbung.	49
Abbildung 16 A - D: Säulendiagramm zur Anfärbung von eIF3a.	50
Abbildung 17 A - E: Immunhistochemische Schnitte mit eIF4E – Färbung.	52
Abbildung 18 A - D: Säulendiagramm zur Anfärbung von eIF4E.	54
Abbildung 19 A - E: Immunhistochemische Schnitte mit eIF5B – Färbung.	56
Abbildung 20 A - D: Säulendiagramm zur Anfärbung von eIF5B.	58
Abbildung 21 A - E: Immunhistochemische Schnitte mit eIF6 – Färbung.	60
Abbildung 22 A - D: Säulendiagramm zur Anfärbung von eIF6.	61

[Hier eingeben]

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Standardreihe Konzentration	23
Tabelle 2 - Verwendete Antikörper für die Western Blot Analysen	25
Tabelle 3 - Verwendete Antikörper für die immunhistochemische Färbung der ausgewählten Schnitt	26
Tabelle 4 - Einfaktorielle ANOVA-Analyse für die IHC-Auswertung der eIF1-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien mit Vergleich zwischen und innerhalb der jeweiligen Gruppen „zytoplasmatischer Score“, „zytoplasmatischer Grade“, „nukleärer Score“ und „nukleärer Grade“.	45
Tabelle 5 - Einfaktorielle ANOVA-Analyse für die IHC-Auswertung der eIF2α-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien mit Vergleich zwischen und innerhalb der jeweiligen Gruppen „zytoplasmatischer Score“, „zytoplasmatischer Grade“, „nukleärer Score“ und „nukleärer Grade“.	48
Tabelle 6 - Einfaktorielle ANOVA-Analyse für die IHC-Auswertung der eIF3a-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien mit Vergleich zwischen und innerhalb der jeweiligen Gruppen „zytoplasmatischer Score“, „zytoplasmatischer Grade“, „nukleärer Score“ und „nukleärer Grade“.	51
Tabelle 7 - Einfaktorielle ANOVA-Analyse für die IHC-Auswertung der eIF4E-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien mit Vergleich zwischen und innerhalb der jeweiligen Gruppen „zytoplasmatischer Score“, „zytoplasmatischer Grade“, „nukleärer Score“ und „nukleärer Grade“.	55
Tabelle 8 - Einfaktorielle ANOVA-Analyse für die IHC-Auswertung der eIF5B-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien mit Vergleich zwischen und innerhalb der jeweiligen Gruppen „zytoplasmatischer Score“, „zytoplasmatischer Grade“, „nukleärer Score“ und „nukleärer Grade“.	59
Tabelle 9 - Einfaktorielle ANOVA-Analyse für die IHC-Auswertung der eIF6-Expression in den verschiedenen Krankheitsstadien mit Vergleich zwischen und innerhalb der jeweiligen Gruppen „zytoplasmatischer Score“, „zytoplasmatischer Grade“, „nukleärer Score“ und „nukleärer Grade“.	62

[Hier eingeben]

10 Anhang

Anhang 1 – Tabelle von eIF1 mit Bonferroni-Post-Hoc-Test auf signifikante Unterschiede (zur besseren Übersicht gelb markiert) zwischen den Gruppen (ZM – Zylinderzellmetaplasie, IM – Intestinale Metaplasie, LD – low grade intraepitheliale Dysplasie, HD – high grade intraepitheliale Dysplasie und Tu – Tumor) bei den abhängigen Variablen „zytoplasmatischer Score und Grade“ und „nukleärer Score und Grade“ für eIF1. In jeder Zeile ist die Testung der Nullhypothese dargestellt.

Mehrfachvergleich		Bonferroni						
Abhängige Variable	Gruppe (I)	Gruppe (J)	Mittlere Differenz Gruppe (I-J)	Standardfehler	Sig.	95% Konfidenzintervall		
						Untergrenze	Obergrenze	
Zytoplasmatischer Score	LD	HD	3,600	1,63289	0,326	-1,2204	8,4204	
		IM	3,900	1,63289	0,212	-0,9204	8,7204	
		ZM	2,125	1,73194	1,000	-2,9878	7,2378	
		Tu	-0,250	1,56337	1,000	-4,8652	4,3652	
	HD	LD	-3,600	1,63289	0,326	-8,4204	1,2204	
		IM	0,300	1,63289	1,000	-4,5204	5,1204	
		ZM	-1,475	1,73194	1,000	-6,5878	3,6378	
		Tu	-3,850	1,56337	0,177	-8,4652	0,7652	
	IM	LD	-3,900	1,63289	0,212	-8,7204	0,9204	
		HD	-0,300	1,63289	1,000	-5,1204	4,5204	
		ZM	-1,775	1,73194	1,000	-6,8878	3,3378	
		Tu	-4,150	1,56337	0,109	-8,7652	0,4652	
	ZM	LD	-2,125	1,73194	1,000	-7,2378	2,9878	
		HD	1,475	1,73194	1,000	-3,6378	6,5878	
		IM	1,775	1,73194	1,000	-3,3378	6,8878	
		Tu	-2,375	1,66656	1,000	-7,2948	2,5448	
	Tu	LD	0,250	1,56337	1,000	-4,3652	4,8652	
		HD	3,850	1,56337	0,177	-0,7652	8,4652	
		IM	4,150	1,56337	0,109	-0,4652	8,7652	
		ZM	2,375	1,66656	1,000	-2,5448	7,2948	
Zytoplasmatischer Grade	LD	HD	0,400	0,37417	1,000	-0,7046	1,5046	
		IM	0,600	0,37417	1,000	-0,5046	1,7046	

[Hier eingeben]

		ZM	0,150	0,39686	1,000	-1,0216	1,3216
		Tu	-0,600	0,35824	1,000	-1,6575	0,4575
	HD	LD	-0,400	0,37417	1,000	-1,5046	0,7046
		IM	0,200	0,37417	1,000	-0,9046	1,3046
		ZM	-0,250	0,39686	1,000	-1,4216	0,9216
		Tu	-1,000	0,35824	0,077	-2,0575	0,0575
	IM	LD	-0,600	0,37417	1,000	-1,7046	0,5046
		HD	-0,200	0,37417	1,000	-1,3046	0,9046
		ZM	-0,450	0,39686	1,000	-1,6216	0,7216
		Tu	-1,20000*	0,35824	0,016	-2,2575	-0,1425
	ZM	LD	-0,150	0,39686	1,000	-1,3216	1,0216
		HD	0,250	0,39686	1,000	-0,9216	1,4216
		IM	0,450	0,39686	1,000	-0,7216	1,6216
		Tu	-0,750	0,38188	0,557	-1,8773	0,3773
	Tu	LD	0,600	0,35824	1,000	-0,4575	1,6575
		HD	1,000	0,35824	0,077	-0,0575	2,0575
		IM	1,20000*	0,35824	0,016	0,1425	2,2575
		ZM	0,750	0,38188	0,557	-0,3773	1,8773
Nuklearer Score	LD	HD	0,600	1,83874	1,000	-4,8281	6,0281
		IM	0,100	1,83874	1,000	-5,3281	5,5281
		ZM	-0,700	1,95028	1,000	-6,4574	5,0574
		Tu	0,383	1,76046	1,000	-4,8137	5,5803
	HD	LD	-0,600	1,83874	1,000	-6,0281	4,8281
		IM	-0,500	1,83874	1,000	-5,9281	4,9281
		ZM	-1,300	1,95028	1,000	-7,0574	4,4574
		Tu	-0,217	1,76046	1,000	-5,4137	4,9803
	IM	LD	-0,100	1,83874	1,000	-5,5281	5,3281
		HD	0,500	1,83874	1,000	-4,9281	5,9281
		ZM	-0,800	1,95028	1,000	-6,5574	4,9574
		Tu	0,283	1,76046	1,000	-4,9137	5,4803
	ZM	LD	0,700	1,95028	1,000	-5,0574	6,4574
		HD	1,300	1,95028	1,000	-4,4574	7,0574

[Hier eingeben]

		IM	0,800	1,95028	1,000	-4,9574	6,5574
		Tu	1,083	1,87666	1,000	-4,4567	6,6234
	Tu	LD	-0,383	1,76046	1,000	-5,5803	4,8137
		HD	0,217	1,76046	1,000	-4,9803	5,4137
		IM	-0,283	1,76046	1,000	-5,4803	4,9137
		ZM	-1,083	1,87666	1,000	-6,6234	4,4567
Nuklearer Grade	LD	HD	0,100	0,55103	1,000	-1,5267	1,7267
		IM	0,300	0,55103	1,000	-1,3267	1,9267
		ZM	-0,300	0,58445	1,000	-2,0253	1,4253
		Tu	-0,217	0,52757	1,000	-1,7741	1,3408
	HD	LD	-0,100	0,55103	1,000	-1,7267	1,5267
		IM	0,200	0,55103	1,000	-1,4267	1,8267
		ZM	-0,400	0,58445	1,000	-2,1253	1,3253
		Tu	-0,317	0,52757	1,000	-1,8741	1,2408
	IM	LD	-0,300	0,55103	1,000	-1,9267	1,3267
		HD	-0,200	0,55103	1,000	-1,8267	1,4267
		ZM	-0,600	0,58445	1,000	-2,3253	1,1253
		Tu	-0,517	0,52757	1,000	-2,0741	1,0408
	ZM	LD	0,300	0,58445	1,000	-1,4253	2,0253
		HD	0,400	0,58445	1,000	-1,3253	2,1253
		IM	0,600	0,58445	1,000	-1,1253	2,3253
		Tu	0,083	0,56239	1,000	-1,5769	1,7435
	Tu	LD	0,217	0,52757	1,000	-1,3408	1,7741
		HD	0,317	0,52757	1,000	-1,2408	1,8741
		IM	0,517	0,52757	1,000	-1,0408	2,0741
		ZM	-0,083	0,56239	1,000	-1,7435	1,5769

*.Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

[Hier eingeben]

Anhang 2 – Tabelle von eIF2 α mit Bonferroni-Post-Hoc-Test auf signifikante Unterschiede (zur besseren Übersicht gelb markiert) zwischen den Gruppen (ZM – Zylinderzellmetaplasie, IM – Intestinale Metaplasie, LD – low grade intraepitheliale Dysplasie, HD – high grade intraepitheliale Dysplasie und Tu – Tumor) bei den abhängigen Variablen „zytoplasmatischer Score und Grade“ für eIF2 α . In jeder Zeile ist die Testung der Nullhypothese dargestellt. Zur besseren Übersicht wurde in Tabelle 8 auf die Darstellung der Auswertung von „nukleärer Score und Grade“ verzichtet, da diese nicht signifikant waren.

Mehrfachvergleich							
Bonferroni							
Abhängige Variable	Gruppe (I)	Gruppe (J)	Mittlere Differenz Gruppe (I-J)	Standardfehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Zytoplasmatischer Score	LD	HD	1,7	1,19094	1,000	-1,8157	5,2157
		IM	2,4	1,19094	0,499	-1,1157	5,9157
		ZM	-0,725	1,26318	1,000	-4,454	3,004
		Tu	-0,85	1,14024	1,000	-4,2161	2,5161
	HD	LD	-1,7	1,19094	1,000	-5,2157	1,8157
		IM	0,7	1,19094	1,000	-2,8157	4,2157
		ZM	-2,425	1,26318	0,612	-6,154	1,304
		Tu	-2,55	1,14024	0,303	-5,9161	0,8161
	IM	LD	-2,4	1,19094	0,499	-5,9157	1,1157
		HD	-0,7	1,19094	1,000	-4,2157	2,8157
		ZM	-3,125	1,26318	0,172	-6,854	0,604
		Tu	-3,25	1,14024	0,066	-6,6161	0,1161
	ZM	LD	0,725	1,26318	1,000	-3,004	4,454
		HD	2,425	1,26318	0,612	-1,304	6,154
		IM	3,125	1,26318	0,172	-0,604	6,854
		Tu	-0,125	1,2155	1,000	-3,7132	3,4632
	Tu	LD	0,85	1,14024	1,000	-2,5161	4,2161
		HD	2,55	1,14024	0,303	-0,8161	5,9161
		IM	3,25	1,14024	0,066	-0,1161	6,6161
		ZM	0,125	1,2155	1,000	-3,4632	3,7132
Zytoplasmatischer Grade	LD	HD	0,1	0,34378	1,000	-0,9149	1,1149
		IM	0,9	0,34378	0,120	-0,1149	1,9149
		ZM	-0,375	0,36463	1,000	-1,4514	0,7014
		Tu	-0,91667	0,32914	0,078	-1,8883	0,055

[Hier eingeben]

	HD	LD	-0,1	0,34378	1,0 00	-1,1149	0,9149
		IM	0,8	0,34378	0,2 45	-0,2149	1,8149
		ZM	-0,475	0,36463	1,0 00	-1,5514	0,6014
		Tu	-1,01667*	0,32914	0,0 34	-1,9883	-0,045
	IM	LD	-0,9	0,34378	0,1 20	-1,9149	0,1149
		HD	-0,8	0,34378	0,2 45	-1,8149	0,2149
		ZM	-1,27500*	0,36463	0,0 11	-2,3514	-0,1986
		Tu	-1,81667*	0,32914	0,0 00	-2,7883	-0,845
	ZM	LD	0,375	0,36463	1,0 00	-0,7014	1,4514
		HD	0,475	0,36463	1,0 00	-0,6014	1,5514
		IM	1,27500*	0,36463	0,0 11	0,1986	2,3514
		Tu	-0,54167	0,35087	1,0 00	-1,5775	0,4941
	Tu	LD	0,91667	0,32914	0,0 78	-0,055	1,8883
		HD	1,01667*	0,32914	0,0 34	0,045	1,9883
		IM	1,81667*	0,32914	0,0 00	0,845	2,7883
		ZM	0,54167	0,35087	1,0 00	-0,4941	1,5775

*.Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

[Hier eingeben]

Anhang 3 – Tabelle von eIF3a mit Bonferroni-Post-Hoc-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (ZM – Zylinderzellmetaplasie, IM – Intestinale Metaplasie, LD – low grade intraepitheliale Dysplasie, HD – high grade intraepitheliale Dysplasie und Tu – Tumor) bei den abhängigen Variablen „zytoplasmatischer Score und Grade“ für eIF3a. In jeder Zeile ist die Testung der Nullhypothese dargestellt.

Mehrfachvergleich		Bonferroni						
Abhängige Variable	Gruppe (I)	Gruppe (J)	Mittlere Differenz Gruppe (I-J)	Standardfehler	Sig.	95% Konfidenzintervall		
						Untergrenze	Obergrenze	
Zytoplasmatischer Score	LD	HD	0,000	0,9594	1,000	-2,8322	2,8322	
		IM	-1,300	0,9594	1,000	-4,1322	1,5322	
		ZM	0,000	1,0176	1,000	-3,004	3,004	
		Tu	-1,500	0,91855	1,000	-4,2116	1,2116	
	HD	LD	0,000	0,9594	1,000	-2,8322	2,8322	
		IM	-1,300	0,9594	1,000	-4,1322	1,5322	
		ZM	0,000	1,0176	1,000	-3,004	3,004	
		Tu	-1,500	0,91855	1,000	-4,2116	1,2116	
	IM	LD	1,300	0,9594	1,000	-1,5322	4,1322	
		HD	1,300	0,9594	1,000	-1,5322	4,1322	
		ZM	1,300	1,0176	1,000	-1,704	4,304	
		Tu	-0,200	0,91855	1,000	-2,9116	2,5116	
	ZM	LD	0,000	1,0176	1,000	-3,004	3,004	
		HD	0,000	1,0176	1,000	-3,004	3,004	
		IM	-1,300	1,0176	1,000	-4,304	1,704	
		Tu	-1,500	0,97918	1,000	-4,3906	1,3906	
	Tu	LD	1,500	0,91855	1,000	-1,2116	4,2116	
		HD	1,500	0,91855	1,000	-1,2116	4,2116	
		IM	0,200	0,91855	1,000	-2,5116	2,9116	
		ZM	1,500	0,97918	1,000	-1,3906	4,3906	
Zytoplasmatischer Grade	LD	HD	0,000	0,16125	1,000	-0,476	0,476	
		IM	-0,200	0,16125	1,000	-0,676	0,276	
		ZM	0,000	0,17103	1,000	-0,5049	0,5049	
		Tu	-0,250	0,15438	1,000	-0,7057	0,2057	
	HD	LD	0,000	0,16125	1,000	-0,476	0,476	

[Hier eingeben]

		IM	-0,200	0,16125	1,0 00	-0,676	0,276
		ZM	0,000	0,17103	1,0 00	-0,5049	0,5049
		Tu	-0,250	0,15438	1,0 00	-0,7057	0,2057
	IM	LD	0,200	0,16125	1,0 00	-0,276	0,676
		HD	0,200	0,16125	1,0 00	-0,276	0,676
		ZM	0,200	0,17103	1,0 00	-0,3049	0,7049
		Tu	-0,050	0,15438	1,0 00	-0,5057	0,4057
	ZM	LD	0,000	0,17103	1,0 00	-0,5049	0,5049
		HD	0,000	0,17103	1,0 00	-0,5049	0,5049
		IM	-0,200	0,17103	1,0 00	-0,7049	0,3049
		Tu	-0,250	0,16457	1,0 00	-0,7358	0,2358
	Tu	LD	0,250	0,15438	1,0 00	-0,2057	0,7057
		HD	0,250	0,15438	1,0 00	-0,2057	0,7057
		IM	0,050	0,15438	1,0 00	-0,4057	0,5057
		ZM	0,250	0,16457	1,0 00	-0,2358	0,7358
Nuklearer Score	LD	HD	1,000	0,42164	0,2 20	-0,2447	2,2447
		IM	1,000	0,42164	0,2 20	-0,2447	2,2447
		ZM	1,000	0,44721	0,3 04	-0,3202	2,3202
		Tu	1,000	0,40369	0,1 71	-0,1917	2,1917
	HD	LD	-1,000	0,42164	0,2 20	-2,2447	0,2447
		IM	0,000	0,42164	1,0 00	-1,2447	1,2447
		ZM	0,000	0,44721	1,0 00	-1,3202	1,3202
		Tu	0,000	0,40369	1,0 00	-1,1917	1,1917
	IM	LD	-1,000	0,42164	0,2 20	-2,2447	0,2447
		HD	0,000	0,42164	1,0 00	-1,2447	1,2447
		ZM	0,000	0,44721	1,0 00	-1,3202	1,3202
		Tu	0,000	0,40369	1,0 00	-1,1917	1,1917
	ZM	LD	-1,000	0,44721	0,3 04	-2,3202	0,3202
		HD	0,000	0,44721	1,0 00	-1,3202	1,3202
		IM	0,000	0,44721	1,0 00	-1,3202	1,3202
		Tu	0,000	0,43033	1,0 00	-1,2704	1,2704
	Tu	LD	-1,000	0,40369	0,1 71	-2,1917	0,1917

[Hier eingeben]

		HD	0,000	0,40369	1,000	-1,1917	1,1917
		IM	0,000	0,40369	1,000	-1,1917	1,1917
		ZM	0,000	0,43033	1,000	-1,2704	1,2704
Nuklearer Grade	LD	HD	0,400	0,20976	0,629	-0,2192	1,0192
		IM	0,400	0,20976	0,629	-0,2192	1,0192
		ZM	0,150	0,22249	1,000	-0,5068	0,8068
		Tu	0,400	0,20083	0,525	-0,1929	0,9929
	HD	LD	-0,400	0,20976	0,629	-1,0192	0,2192
		IM	0,000	0,20976	1,000	-0,6192	0,6192
		ZM	-0,250	0,22249	1,000	-0,9068	0,4068
		Tu	0,000	0,20083	1,000	-0,5929	0,5929
	IM	LD	-0,400	0,20976	0,629	-1,0192	0,2192
		HD	0,000	0,20976	1,000	-0,6192	0,6192
		ZM	-0,250	0,22249	1,000	-0,9068	0,4068
		Tu	0,000	0,20083	1,000	-0,5929	0,5929
	ZM	LD	-0,150	0,22249	1,000	-0,8068	0,5068
		HD	0,250	0,22249	1,000	-0,4068	0,9068
		IM	0,250	0,22249	1,000	-0,4068	0,9068
		Tu	0,250	0,21409	1,000	-0,382	0,882
	Tu	LD	-0,400	0,20083	0,525	-0,9929	0,1929
		HD	0,000	0,20083	1,000	-0,5929	0,5929
		IM	0,000	0,20083	1,000	-0,5929	0,5929
		ZM	-0,250	0,21409	1,000	-0,882	0,382

*.Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

[Hier eingeben]

Anhang 4 – Tabelle von eIF4E mit Bonferroni-Post-Hoc-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (ZM – Zylinderzellmetaplasie, IM – Intestinale Metaplasie, LD – low grade intraepitheliale Dysplasie, HD – high grade intraepitheliale Dysplasie und Tu – Tumor) bei den abhängigen Variablen „zytoplasmatischer Score und Grade“ für eIF4E. In jeder Zeile ist die Testung der Nullhypothese dargestellt.

Mehrfachvergleich		Bonferroni						
Abhängige Variable	Gruppe (I)	Gruppe (J)	Mittlere Differenz Gruppe (I-J)	Standardfehler	Sig.	95% Konfidenzintervall		
						Untergrenze	Obergrenze	
Zytoplasmatischer Score	LD	HD	3,400	1,61678	0,411	-1,3728	8,1728	
		IM	2,500	1,61678	1,000	-2,2728	7,2728	
		ZM	1,925	1,71485	1,000	-3,1374	6,9874	
		Tu	-0,533	1,54794	1,000	-5,103	4,0363	
	HD	LD	-3,400	1,61678	0,411	-8,1728	1,3728	
		IM	-0,900	1,61678	1,000	-5,6728	3,8728	
		ZM	-1,475	1,71485	1,000	-6,5374	3,5874	
		Tu	-3,933	1,54794	0,146	-8,503	0,6363	
	IM	LD	-2,500	1,61678	1,000	-7,2728	2,2728	
		HD	0,900	1,61678	1,000	-3,8728	5,6728	
		ZM	-0,575	1,71485	1,000	-5,6374	4,4874	
		Tu	-3,033	1,54794	0,563	-7,603	1,5363	
	ZM	LD	-1,925	1,71485	1,000	-6,9874	3,1374	
		HD	1,475	1,71485	1,000	-3,5874	6,5374	
		IM	0,575	1,71485	1,000	-4,4874	5,6374	
		Tu	-2,458	1,65011	1,000	-7,3296	2,4129	
	Tu	LD	0,533	1,54794	1,000	-4,0363	5,103	
		HD	3,933	1,54794	0,146	-0,6363	8,503	
		IM	3,033	1,54794	0,563	-1,5363	7,603	
		ZM	2,458	1,65011	1,000	-2,4129	7,3296	
Zytoplasmatischer Grade	LD	HD	0,400	0,37268	1,000	-0,7002	1,5002	
		IM	0,300	0,37268	1,000	-0,8002	1,4002	
		ZM	-0,200	0,39528	1,000	-1,3669	0,9669	
		Tu	-0,450	0,35681	1,000	-1,5033	0,6033	
	HD	LD	-0,400	0,37268	1,000	-1,5002	0,7002	

[Hier eingeben]

		IM	-0,100	0,37268	1,0 00	-1,2002	1,0002
		ZM	-0,600	0,39528	1,0 00	-1,7669	0,5669
		Tu	-0,850	0,35681	0,2 15	-1,9033	0,2033
	IM	LD	-0,300	0,37268	1,0 00	-1,4002	0,8002
		HD	0,100	0,37268	1,0 00	-1,0002	1,2002
		ZM	-0,500	0,39528	1,0 00	-1,6669	0,6669
		Tu	-0,750	0,35681	0,4 12	-1,8033	0,3033
	ZM	LD	0,200	0,39528	1,0 00	-0,9669	1,3669
		HD	0,600	0,39528	1,0 00	-0,5669	1,7669
		IM	0,500	0,39528	1,0 00	-0,6669	1,6669
		Tu	-0,250	0,38036	1,0 00	-1,3729	0,8729
	Tu	LD	0,450	0,35681	1,0 00	-0,6033	1,5033
		HD	0,850	0,35681	0,2 15	-0,2033	1,9033
		IM	0,750	0,35681	0,4 12	-0,3033	1,8033
		ZM	0,250	0,38036	1,0 00	-0,8729	1,3729
Nuklearer Score	LD	HD	0,300	0,49122	1,0 00	-1,1501	1,7501
		IM	0,600	0,49122	1,0 00	-0,8501	2,0501
		ZM	-0,525	0,52102	1,0 00	-2,0631	1,0131
		Tu	-0,317	0,47031	1,0 00	-1,705	1,0717
	HD	LD	-0,300	0,49122	1,0 00	-1,7501	1,1501
		IM	0,300	0,49122	1,0 00	-1,1501	1,7501
		ZM	-0,825	0,52102	1,0 00	-2,3631	0,7131
		Tu	-0,617	0,47031	1,0 00	-2,005	0,7717
	IM	LD	-0,600	0,49122	1,0 00	-2,0501	0,8501
		HD	-0,300	0,49122	1,0 00	-1,7501	1,1501
		ZM	-1,125	0,52102	0,3 62	-2,6631	0,4131
		Tu	-0,917	0,47031	0,5 75	-2,305	0,4717
	ZM	LD	0,525	0,52102	1,0 00	-1,0131	2,0631
		HD	0,825	0,52102	1,0 00	-0,7131	2,3631
		IM	1,125	0,52102	0,3 62	-0,4131	2,6631
		Tu	0,208	0,50135	1,0 00	-1,2717	1,6884
	Tu	LD	0,317	0,47031	1,0 00	-1,0717	1,705

[Hier eingeben]

		HD	0,617	0,47031	1,000	-0,7717	2,005
		IM	0,917	0,47031	0,575	-0,4717	2,305
		ZM	-0,208	0,50135	1,000	-1,6884	1,2717
Nuklearer Grade	LD	HD	0,100	0,21722	1,000	-0,5413	0,7413
		IM	0,300	0,21722	1,000	-0,3413	0,9413
		ZM	-0,200	0,2304	1,000	-0,8802	0,4802
		Tu	-0,117	0,20797	1,000	-0,7306	0,4973
	HD	LD	-0,100	0,21722	1,000	-0,7413	0,5413
		IM	0,200	0,21722	1,000	-0,4413	0,8413
		ZM	-0,300	0,2304	1,000	-0,9802	0,3802
		Tu	-0,217	0,20797	1,000	-0,8306	0,3973
	IM	LD	-0,300	0,21722	1,000	-0,9413	0,3413
		HD	-0,200	0,21722	1,000	-0,8413	0,4413
		ZM	-0,500	0,2304	0,353	-1,1802	0,1802
		Tu	-0,417	0,20797	0,512	-1,0306	0,1973
	ZM	LD	0,200	0,2304	1,000	-0,4802	0,8802
		HD	0,300	0,2304	1,000	-0,3802	0,9802
		IM	0,500	0,2304	0,353	-0,1802	1,1802
		Tu	0,083	0,2217	1,000	-0,5711	0,7378
	Tu	LD	0,117	0,20797	1,000	-0,4973	0,7306
		HD	0,217	0,20797	1,000	-0,3973	0,8306
		IM	0,417	0,20797	0,512	-0,1973	1,0306
		ZM	-0,083	0,2217	1,000	-0,7378	0,5711

*.Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

[Hier eingeben]

Anhang 5 – Tabelle von eIF5B mit Bonferroni-Post-Hoc-Test auf signifikante zwischen den Gruppen (ZM – Zylinderzellmetaplasie, IM – Intestinale Metaplasie, LD – low grade intraepitheliale Dysplasie, HD – high grade intraepitheliale Dysplasie und Tu – Tumor) bei den abhängigen Variablen „zytoplasmatischer Score und Grade“ für eIF5B. In jeder Zeile ist die Testung der Nullhypothese dargestellt.

Mehrfachvergleich		Bonferroni						
Abhängige Variable	Gruppe (I)	Gruppe (J)	Mittlere Differenz Gruppe (I-J)	Standardfehler	Sig.	95% Konfidenzintervall		
						Untergrenze	Obergrenze	
Zytoplasmatischer Score	LD	HD	4,30000*	1,42032	0,041	0,1071	8,4929	
		IM	5,80000*	1,42032	0,002	1,6071	9,9929	
		ZM	-0,075	1,50647	1,000	-4,5222	4,3722	
		Tu	-0,117	1,35985	1,000	-4,131	3,8977	
	HD	LD	-4,30000*	1,42032	0,041	-8,4929	-0,1071	
		IM	1,500	1,42032	1,000	-2,6929	5,6929	
		ZM	-4,375	1,50647	0,057	-8,8222	0,0722	
		Tu	-4,41667*	1,35985	0,022	-8,431	-0,4023	
	IM	LD	-5,80000*	1,42032	0,002	-9,9929	-1,6071	
		HD	-1,500	1,42032	1,000	-5,6929	2,6929	
		ZM	-5,87500*	1,50647	0,003	-10,3222	-1,4278	
		Tu	-5,91667*	1,35985	0,001	-9,931	-1,9023	
	ZM	LD	0,075	1,50647	1,000	-4,3722	4,5222	
		HD	4,375	1,50647	0,057	-0,0722	8,8222	
		IM	5,87500*	1,50647	0,003	1,4278	10,3222	
		Tu	-0,042	1,4496	1,000	-4,321	4,2377	
	Tu	LD	0,117	1,35985	1,000	-3,8977	4,131	
		HD	4,41667*	1,35985	0,022	0,4023	8,431	
		IM	5,91667*	1,35985	0,001	1,9023	9,931	
		ZM	0,042	1,4496	1,000	-4,2377	4,321	
Zytoplasmatischer Grade	LD	HD	0,100	0,44891	1,000	-1,2252	1,4252	
		IM	0,600	0,44891	1,000	-0,7252	1,9252	
		ZM	-0,375	0,47614	1,000	-1,7806	1,0306	
		Tu	-0,167	0,4298	1,000	-1,4355	1,1021	
	HD	LD	-0,100	0,44891	1,000	-1,4252	1,2252	

[Hier eingeben]

		IM	0,500	0,44891	1,000	-0,8252	1,8252
		ZM	-0,475	0,47614	1,000	-1,8806	0,9306
		Tu	-0,267	0,4298	1,000	-1,5355	1,0021
	IM	LD	-0,600	0,44891	1,000	-1,9252	0,7252
		HD	-0,500	0,44891	1,000	-1,8252	0,8252
		ZM	-0,975	0,47614	0,465	-2,3806	0,4306
		Tu	-0,767	0,4298	0,812	-2,0355	0,5021
	ZM	LD	0,375	0,47614	1,000	-1,0306	1,7806
		HD	0,475	0,47614	1,000	-0,9306	1,8806
		IM	0,975	0,47614	0,465	-0,4306	2,3806
		Tu	0,208	0,45816	1,000	-1,1442	1,5609
	Tu	LD	0,167	0,4298	1,000	-1,1021	1,4355
		HD	0,267	0,4298	1,000	-1,0021	1,5355
		IM	0,767	0,4298	0,812	-0,5021	2,0355
		ZM	-0,208	0,45816	1,000	-1,5609	1,1442
Nuklearer Score	LD	HD	0,700	1,19822	1,000	-2,8373	4,2373
		IM	2,600	1,19822	0,353	-0,9373	6,1373
		ZM	-0,375	1,27091	1,000	-4,1268	3,3768
		Tu	-0,667	1,14721	1,000	-4,0533	2,72
	HD	LD	-0,700	1,19822	1,000	-4,2373	2,8373
		IM	1,900	1,19822	1,000	-1,6373	5,4373
		ZM	-1,075	1,27091	1,000	-4,8268	2,6768
		Tu	-1,367	1,14721	1,000	-4,7533	2,02
	IM	LD	-2,600	1,19822	0,353	-6,1373	0,9373
		HD	-1,900	1,19822	1,000	-5,4373	1,6373
		ZM	-2,975	1,27091	0,237	-6,7268	0,7768
		Tu	-3,267	1,14721	0,066	-6,6533	0,12
	ZM	LD	0,375	1,27091	1,000	-3,3768	4,1268
		HD	1,075	1,27091	1,000	-2,6768	4,8268
		IM	2,975	1,27091	0,237	-0,7768	6,7268
		Tu	-0,292	1,22293	1,000	-3,9019	3,3185
	Tu	LD	0,667	1,14721	1,000	-2,72	4,0533

[Hier eingeben]

		HD	1,367	1,14721	1,0 00	-2,02	4,7533
		IM	3,267	1,14721	0,0 66	-0,12	6,6533
		ZM	0,292	1,22293	1,0 00	-3,3185	3,9019
Nuklearer Grade	LD	HD	0,100	0,33194	1,0 00	-0,8799	1,0799
		IM	0,300	0,33194	1,0 00	-0,6799	1,2799
		ZM	-0,275	0,35208	1,0 00	-1,3144	0,7644
		Tu	-0,317	0,31781	1,0 00	-1,2549	0,6215
	HD	LD	-0,100	0,33194	1,0 00	-1,0799	0,8799
		IM	0,200	0,33194	1,0 00	-0,7799	1,1799
		ZM	-0,375	0,35208	1,0 00	-1,4144	0,6644
		Tu	-0,417	0,31781	1,0 00	-1,3549	0,5215
	IM	LD	-0,300	0,33194	1,0 00	-1,2799	0,6799
		HD	-0,200	0,33194	1,0 00	-1,1799	0,7799
		ZM	-0,575	0,35208	1,0 00	-1,6144	0,4644
		Tu	-0,617	0,31781	0,5 86	-1,5549	0,3215
	ZM	LD	0,275	0,35208	1,0 00	-0,7644	1,3144
		HD	0,375	0,35208	1,0 00	-0,6644	1,4144
		IM	0,575	0,35208	1,0 00	-0,4644	1,6144
		Tu	-0,042	0,33879	1,0 00	-1,0418	0,9585
	Tu	LD	0,317	0,31781	1,0 00	-0,6215	1,2549
		HD	0,417	0,31781	1,0 00	-0,5215	1,3549
		IM	0,617	0,31781	0,5 86	-0,3215	1,5549
		ZM	0,042	0,33879	1,0 00	-0,9585	1,0418

*.Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

[Hier eingeben]

Anhang 6 – Tabelle von eIF6 mit Bonferroni-Post-Hoc-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (ZM – Zylinderzellmetaplasie, IM – Intestinale Metaplasie, LD – low grade intraepitheliale Dysplasie, HD – high grade intraepitheliale Dysplasie und Tu – Tumor) bei den abhängigen Variablen „zytoplasmatischer Score und Grade“ für eIF6. In jeder Zeile ist die Testung der Nullhypothese dargestellt.

Mehrfachvergleiche							
Bonferroni							
Abhängige Variable	Gruppe (I)	Gruppe (J)	Mittlere Differenz Gruppe (I-J)	Standardfehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Zytoplasmatischer Score	LD	HD	-1,700	1,8353	1,000	-7,1453	3,7453
		IM	0,567	2,11922	1,000	-5,721	6,8543
		ZM	-1,725	1,94663	1,000	-7,5006	4,0506
		Tu	-6,10000*	1,75717	0,012	-11,3134	-0,8866
	HD	LD	1,700	1,8353	0,000	-3,7453	7,1453
		IM	2,267	2,11922	1,000	-4,021	8,5543
		ZM	-0,025	1,94663	1,000	-5,8006	5,7506
		Tu	-4,400	1,75717	0,164	-9,6134	0,8134
	IM	LD	-0,567	2,11922	1,000	-6,8543	5,721
		HD	-2,267	2,11922	1,000	-8,5543	4,021
		ZM	-2,292	2,21634	1,000	-8,8675	4,2841
		Tu	-6,66667*	2,05193	0,023	-12,7547	-0,5787
	ZM	LD	1,725	1,94663	1,000	-4,0506	7,5006
		HD	0,025	1,94663	1,000	-5,7506	5,8006
		IM	2,292	2,21634	1,000	-4,2841	8,8675
		Tu	-4,375	1,87315	0,245	-9,9326	1,1826
	Tu	LD	6,10000*	1,75717	0,012	0,8866	11,3134
		HD	4,400	1,75717	0,164	-0,8134	9,6134
		IM	6,66667*	2,05193	0,023	0,5787	12,7547
		ZM	4,375	1,87315	0,245	-1,1826	9,9326
Zytoplasmatischer Grade	LD	HD	-0,300	0,26519	1,000	-1,0868	0,4868
		IM	-0,100	0,30621	1,000	-1,0085	0,8085
		ZM	-0,350	0,28128	1,000	-1,1845	0,4845
		Tu	-1,18333*	0,2539	0,000	-1,9366	-0,43
	HD	LD	0,300	0,26519	1,000	-0,4868	1,0868
		IM	0,200	0,30621	1,000	-0,7085	1,1085
		ZM	-0,050	0,28128	1,000	-0,8845	0,7845
		Tu	-,88333*	0,2539	0,012	-1,6366	-0,13
	IM	LD	0,100	0,30621	1,000	-0,8085	1,0085
		HD	-0,200	0,30621	1,000	-1,1085	0,7085
		ZM	-0,250	0,32025	1,000	-1,2002	0,7002
		Tu	-1,08333*	0,29649	0,007	-1,963	-0,2037
	ZM	LD	0,350	0,28128	1,000	-0,4845	1,1845

[Hier eingeben]

		HD	0,050	0,28128	1,000	-0,7845	0,8845
		IM	0,250	0,32025	1,000	-0,7002	1,2002
		Tu	-,83333*	0,27066	0,037	-1,6364	-0,0303
	Tu	LD	1,18333*	0,2539	0,000	0,43	1,9366
		HD	,88333*	0,2539	0,012	0,13	1,6366
		IM	1,08333*	0,29649	0,007	0,2037	1,963
		ZM	,83333*	0,27066	0,037	0,0303	1,6364
Nuklearer Score	LD	HD	1,500	0,81988	0,746	-0,9325	3,9325
		IM	-0,933	0,94671	1,000	-3,7422	1,8755
		ZM	0,400	0,86961	1,000	-2,1801	2,9801
		Tu	0,067	0,78497	1,000	-2,2623	2,3956
	HD	LD	-1,500	0,81988	0,746	-3,9325	0,9325
		IM	-2,433	0,94671	0,139	-5,2422	0,3755
		ZM	-1,100	0,86961	1,000	-3,6801	1,4801
		Tu	-1,433	0,78497	0,751	-3,7623	0,8956
	IM	LD	0,933	0,94671	1,000	-1,8755	3,7422
		HD	2,433	0,94671	0,139	-0,3755	5,2422
		ZM	1,333	0,99009	1,000	-1,6042	4,2709
		Tu	1,000	0,91665	1,000	-1,7197	3,7197
	ZM	LD	-0,400	0,86961	1,000	-2,9801	2,1801
		HD	1,100	0,86961	1,000	-1,4801	3,6801
		IM	-1,333	0,99009	1,000	-4,2709	1,6042
		Tu	-0,333	0,83678	1,000	-2,816	2,1494
	Tu	LD	-0,067	0,78497	1,000	-2,3956	2,2623
		HD	1,433	0,78497	0,751	-0,8956	3,7623
		IM	-1,000	0,91665	1,000	-3,7197	1,7197
		ZM	0,333	0,83678	1,000	-2,1494	2,816
Nuklearer Grade	LD	HD	0,600	0,30927	0,593	-0,3176	1,5176
		IM	0,167	0,35712	1,000	-0,8929	1,2262
		ZM	-0,125	0,32803	1,000	-1,0983	0,8483
		Tu	0,000	0,29611	1,000	-0,8785	0,8785
	HD	LD	-0,600	0,30927	0,593	-1,5176	0,3176
		IM	-0,433	0,35712	1,000	-1,4929	0,6262
		ZM	-0,725	0,32803	0,327	-1,6983	0,2483
		Tu	-0,600	0,29611	0,493	-1,4785	0,2785
	IM	LD	-0,167	0,35712	1,000	-1,2262	0,8929
		HD	0,433	0,35712	1,000	-0,6262	1,4929
		ZM	-0,292	0,37348	1,000	-1,3998	0,8164
		Tu	-0,167	0,34578	1,000	-1,1926	0,8592
	ZM	LD	0,125	0,32803	1,000	-0,8483	1,0983
		HD	0,725	0,32803	0,327	-0,2483	1,6983
		IM	0,292	0,37348	1,000	-0,8164	1,3998

[Hier eingeben]

	Tu	0,125	0,31565	1,000	-0,8115	1,0615
Tu	LD	0,000	0,29611	1,000	-0,8785	0,8785
	HD	0,600	0,29611	0,493	-0,2785	1,4785
	IM	0,167	0,34578	1,000	-0,8592	1,1926
	ZM	-0,125	0,31565	1,000	-1,0615	0,8115

[Hier eingeben]

11 Danksagungen

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christoph Gabers bedanken, der mich als Betreuer übernahm um mich weiterhin bei meiner Dissertation zu unterstützen und jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme hatte. Ebenso ein herzlicher Dank an Frau Prof. Dr. Yvonne Gabers, welche mir half meine statistischen Ergebnisse im Rahmen meiner Doktorarbeit auszuarbeiten.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem Team der Forschungs-AG Gabers/Haybäck des Institutes für Pathologie der Universitätsklinik Magdeburg bedanken. Insbesondere bei Frau Antje Schinlauer, die stets offen für meine Fragen war und mich mit guten Ratschlägen unterstützte, sowie mir die Arbeit im Labor von Grund auf mit viel Geduld und Erfahrung beibrachte.

Ein herzlicher Dank gilt auch meiner Familie, besonders bei meinen Eltern Carola und István Csiki, sowie meinem Bruder Normen Csiki und seiner Ehefrau Juliane. Sie haben mich jederzeit unterstützt und es mir überhaupt erst ermöglicht, das Medizinstudium zu Beginnen und Durchzustehen und mir trotz jeder Widrigkeit uneingeschränkt den Rücken gestärkt.

Ebenso gilt ein ganz besonderer Dank meinem Lebensgefährten Philipp Heinecke, der mich immer wieder motivierte weiter zu machen und meine Ziele zu erreichen.

[Hier eingeben]

12 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Die Rolle der eukaryotischen Initiationsfaktoren im Barrett Adenokarzinom und gastroösophagealen Entzündungen“

Im Institut für Pathologie mit Unterstützung

durch Prof. Dr. rer. nat. Christoph Garbers

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 03.05.2023

Unterschrift

[Hier eingeben]

13 Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.