

Aus der Klinik
Für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W.T. Knoefel

**Untersuchungen zur EpCAM-Expression
bei Adenokarzinomen des Ösophagus und des
ösophagogastralen Übergangs
mit Hilfe eines Tissue Microarrays**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Nina Lindenlauf

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf, Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. N. H. Stoecklein

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. S. E. Baldus

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

<u>1 Einleitung</u>	1
1.1 Einführung in die Problematik.....	1
1.2 Ösophaguskarzinome und Karzinome des ösophagogastralen Übergangs..	2
1.2.1 Epidemiologie.....	2
1.2.2 Ätiologie	3
1.2.2.1 Barrett-Ösophagus und Cardiale intestinale Metaplasie.....	4
1.2.3 Pathologie und Typisierung.....	5
1.2.4 Stadieneinteilung.....	7
1.2.4.1 pTNM-Klassifikation der Ösophagustumore.....	8
1.2.4.2 pTNM-Klassifikation der Magentumore.....	9
1.2.5 Prognose.....	11
1.2.6 Therapiekonzepte.....	11
1.2.6.1 Chirurgische Therapiemaßnahmen.....	12
1.2.6.2 Strahlentherapie.....	13
1.2.6.3 Chemotherapie.....	13
1.2.6.4 Kombinierte Therapieverfahren.....	14
1.3 EpCAM:.....	15
1.3.1 Biologie.....	15
1.3.2 EpCAM-Expression bei Karzinomen.....	16
1.3.3 EpCAM-Expression bei Ösophaguskarzinomen.....	17
1.4 Der WNT-Signalweg und EpCAM.....	19
1.5 Tissue Microarray	20
<u>2 Material und Methode</u>	21
2.1 Geräte, Materialien, Softwar.....	21
2.2 Patientenkollektiv.....	22
2.3 Tissue Microarray (TMA).....	23

2.4 Immunhistochemie.....	27
2.5 Auswertung.....	33
2.6 Statistische Analyse.....	35
2.6.1 Mann-Whitney-Test.....	35
2.6.2 Chi-Quadrat-Test.....	36
2.6.3 Fisher`s exact test:.....	36
2.6.4 Kaplan-Meier-Methode und Log-Rang-Test.....	37
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Analyse der TMA-Herstellung.....	39
3.2 Analyse der Expression von EpCAM.....	40
3.2.1 Analyse der EpCAM-Expression im gesunden Gewebe.....	40
3.2.1.1 Analyse der EpCAM-Expression im Plattenepithel des Ösophagus.....	40
3.2.1.2 Analyse der EpCAM-Expression in der gesunden Magenmucosa.....	40
3.2.2 Analyse der EpCAM-Expression im Karzinom.....	41
3.2.2.1 Analyse der EpCAM-Expression nach HercepTest™.....	41
3.2.2.2 Analyse der EpCAM-Expression nach Immunreaktivem Score (IRS).....	44
3.2.2.3 Analyse der Expression von EpCAM in Verbindung mit Lymphozyteninfiltraten.....	45
3.2.2.4 Vergleichende Analyse zwischen peripheren und zentralen Tumoranteilen.....	46
3.3 Korrelation der EpCAM-Expression mit den histopathologischen Parametern	48
3.4 Überlebensanalyse.....	49
3.4.1 Überleben in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression.....	49
3.4.2 Überleben in Abhängigkeit von der T-Kategorie.....	51
3.4.3 Überleben in Abhängigkeit von der N-Kategorie.....	51
3.4.4 Überleben in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad.....	51
3.5 EpCAM-Expression in der Progression des Adenokarzinoms.....	52

3.5.1 Analyse der EpCAM-Expression im Barrett-Epithel	52
3.5.2 Analyse der Expression von EpCAM in Lymphknotenmetastasen.....	53
3.5.3 Vergleichende Analyse zwischen Barrett-Epithel, Tumor und Lymphknotenmetastasen.....	54
3.5.3.1 Vergleichende Analyse zwischen Tumor und Barrett-Epithel.....	55
3.5.3.2 Vergleichende Analyse zwischen Tumorgewebe und autologen Lymphknotenmetastasen.....	55
3.6 Analyse der Expression von beta-Catenin.....	59
3.6.1 Expression von beta-Catenin im gesunden Gewebe.....	59
3.6.2 Nukleäre Expression von beta-Catenin im Tumorgewebe.....	60
3.7 Analyse der Expression von E-Cadherin.....	62
4 Diskussion.....	63
5 Zusammenfassung.....	73
6 Literaturverzeichnis.....	74
7 Anhang.....	82
7.1 Danksagung.....	82
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	I
7.3 Tabellenverzeichnis.....	I
7.4 Abkürzungsverzeichnis.....	II
8 Lebenslauf.....	I

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Problematik

Das Adenokarzinom des Ösophagus gehört - trotz stark verbesserter Therapiemöglichkeiten in den letzten Jahrzehnten - mit einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von durchschnittlich weniger als 20% zu den Karzinomen mit der schlechtesten Prognose [1]. Dieses Karzinom wird aufgrund einer häufig sehr langen symptomlosen Phase erst spät erkannt. Bei vielen Patienten liegt bei Diagnosestellung bereits ein metastasiertes Stadium vor. Dies ist auch mit heutigen Therapiekonzepten als unheilbar anzusehen. Zur Prognoseverbesserung werden daher dringend neue therapeutische Konzepte benötigt.

Im Hinblick auf eine effektivere Therapie erscheint bei vielen Karzinomen das epitheliale zelluläre Adhäsionsmolekül EpCAM als eine erfolgsversprechende Zielstruktur. Therapieansätze, die gegen EpCAM gerichtet sind, konnten in präklinischen, wie auch in klinischen Studien bereits positive Ergebnisse zeigen [2-7].

In vielen epithelialen Malignomen wurde eine hohe EpCAM-Expression beobachtet, weshalb EpCAM ursprünglich als tumorassoziiertes Antigen bezeichnet wurde [8]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass EpCAM offenbar auch an physiologischen Prozessen wie Zellmigration, Proliferation und Differenzierung beteiligt ist [3, 9].

Über den Einfluss von EpCAM bei der Entstehung und Progression von Adenokarzinomen des Ösophagus gibt es bislang nur wenige Daten.

Im Hinblick auf die äußerst schlechte Prognose und die weiterhin unbefriedigenden Ergebnisse der systemischen Therapie, war es das Ziel dieser Arbeit, die Frequenz und Stärke der EpCAM-Expression beim Adenokarzinom des Ösophagus zu untersuchen. Durch die Korrelation der EpCAM-Expression mit den histopathologischen Parametern und dem postoperativen Überleben, wollten wir testen, ob und inwiefern man über die

Expression von EpCAM auf die biologische Rolle des Moleküls rückschließen kann.

1.2 Ösophaguskarzinome und Karzinome des ösophagogastralen Übergangs

Das Adenokarzinom des Ösophagus ist ein epithelialer Tumor mit glandulärer Differenzierung, der meist aus einer Barrett-Mucosa im unteren Teil des Ösophagus hervorgeht. Seltener entsteht ein Adenokarzinom aus heterotoper Magenmukosa im oberen Teil des Ösophagus oder aus mukösen sowie submukösen Drüsen [1].

1.2.1 Epidemiologie

Adenokarzinome von Ösophagus und Kardia stellten noch bis vor wenigen Jahren ein im Vergleich zum Plattenepithelkarzinom relativ seltenes Krankheitsbild dar. Die Bedeutung der Ösophagus-Adenokarzinome hat sich allerdings in den letzten Jahrzehnten grundlegend verändert. Die Rate der Adenokarzinome ist im Verlauf der letzten 30 Jahren in den westlichen Ländern dramatisch angestiegen [10, 11]. Epidemiologische Studien zeigen eine Verdopplung der Inzidenz zwischen den frühen 1970ern und den späten 1980ern. Neben den ösophagealen betrifft dies auch die kardialen und subkardialen Adenokarzinome. Betroffen von dem Inzidenzanstieg des Adenokarzinoms ist vor allem die männliche, weiße Bevölkerung, wobei die Gründe dafür unbekannt sind [1, 10]. Die Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms bleibt dagegen bis heute konstant [12], sodass mittlerweile das Adenokarzinom das Plattenepithelkarzinom in Teilen Europas und der USA als häufigste Form des Ösophaguskarzinoms abgelöst hat. In den USA umfasst das Adenokarzinom mittlerweile ungefähr 60% aller Ösophaguskarzinome [13]. Aktuellen Krebsregisterdaten aus Deutschland kann entnommen werden, dass

auch hier die Inzidenz von Karzinomen im unteren Teil des Ösophagus (meist Adenokarzinome) stärker ansteigt als die Inzidenz der Karzinome im mittleren oder oberen Bereich (meist Plattenepithelkarzinome) (Robert-Koch-Institut: Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie).

In den USA steigt die Rate der Ösophaguskarzinome insgesamt stärker an als die jeder anderen Tumorart [10]. Der durchschnittliche jährliche Anstieg beträgt dabei ungefähr 20 Prozent. Dieser Trend zeigt sich sehr deutlich auch in epidemiologischen Daten aus Deutschland.

In Deutschland erkranken ungefähr 3900 Männer und 1050 Frauen jährlich an Speiseröhrenkrebs. Dies entspricht einem Anteil von 1,76% bei den Männern und 0,5% bei den Frauen gemessen an der Gesamtheit der Krebserkrankungen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in der männlichen Bevölkerung bei ungefähr 65 Jahre und damit 4,5 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter der Frauen. In Bezug auf die Mortalität bei Krebserkrankungen liegt das Ösophaguskarzinom bei den Männern an 10.Stelle und bei den Frauen an 15.Stelle (Robert-Koch-Institut: Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie).

Die Inzidenz der Ösophaguskarzinome in Deutschland liegt bei 5,6 pro 100.000 Einwohner bei den männlichen und 1,2 pro 100.000 Einwohner bei der weiblichen Bevölkerung. Die weltweit höchste Inzidenz der ösophagealen Karzinome findet sich mit ungefähr 135,2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner jährlich in China (Kreis Linxian, Provinz Henan) [14].

1.2.2 Ätiologie

Neben Faktoren wie Tabakkonsum, Adipositas oder Asthma-Medikation ist die aus dem andauernden Reflux von Magensäure resultierende Barrett-Metaplasie der Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines ösophagealen Adenokarzinoms. Für Refluxpatienten wurde ein bis zu 43mal höheres Risiko errechnet, an einem Adenokarzinom zu erkranken [15].

1.2.2.1 Barrett-Ösophagus und Cardiale intestinale Metaplasie

Der Barrett-Ösophagus stellt die stärkste Manifestation der chronischen Refluxkrankheit dar. In Folge des Refluxes im distalen Ösophagus wandelt sich das Plattenepithel zu einem Zylinderepithel vom intestinalen Typ (mit Becherzellen) um. Die Barrett-Metaplasie entwickelt sich dabei als Reaktion auf die andauernde Noxe. Das Barrett-Epithel kann hier allerdings nicht als Protektion angesehen werden, da es die häufigste Vorläuferläsion des Adenokarzinoms darstellt und somit zur Entartung prädisponiert. Etwa 90% der Adenokarzinome entwickeln sich auf dem Boden des Barrett-Epithel [16]. Bei den restlichen 10% der Karzinome ist bislang ungeklärt, ob sie einen anderen Ursprung haben oder die Metaplasie lediglich aufgrund ihrer geringen Größe nicht erkannt wird.

Bereits in dem Stadium der Metaplasie zeigen sich Mutationen in Genen, von denen bekannt ist, dass sie eine Bedeutung in der Tumorprogression haben. Es handelt sich dabei insbesondere um Mutationen in den Tumorsuppressorgenen p16 (CDKN2a) und p53. Alterationen bei p16 sind die frühesten genetischen Läsionen im Barrett-Epithel. Sie treten bereits bei 90% der Metaplasien auf. Die Mutationen von p53 treten in einem späteren Stadium der Metaplasie auf und scheinen mit einem erhöhten Risiko der Progression zum Adenokarzinom verbunden zu sein. Die Inaktivierung von p53 prädisponiert zur Entwicklung einer genetisch instabilen tetraploiden Zellpopulation, die einer Progression zur Aneuploidie und eines Adenokarzinoms vorausgeht [17]. Das Genom der Barrett-Epithelien kann aber offenbar auch schon subchromosomale Veränderungen, wie kleine Deletionen aufweisen [18-20]. Cai et al. konnten nachweisen, dass bei Patienten mit Barrett-Epithel sogar im histologisch gesund erscheinenden Plattenepithel des Ösophagus bereits ebenfalls solche genetischen Alterationen zu finden sind [19]. Jedoch sind diese genetischen Veränderungen nicht spezifisch für die Entwicklung von Adenokarzinomen, sondern finden sich auch in den frühen Stadien anderer Tumorentitäten.

Patienten mit Barrett-Metaplasie scheinen ein 30fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Adenokarzinoms zu haben. Patienten mit Reflux, jedoch

ohne Barrett-Epithel zeigen lediglich einen Risikoanstieg von 3,1 im Vergleich zur Normalbevölkerung [21]. Das Lebenszeitrisiko, ein Adenokarzinom zu entwickeln, beträgt in dem Patientengut mit Barrettmetaplasie über 10%.

Dabei ist das Risiko, neben der Häufigkeit und Ausprägtheit der Refluxsymptome, abhängig von der Länge sowie dem Dysplasiegrad des Barrett-Oesophagus [22-24]. Als Short-Segment bezeichnet man den Barrett-Oesophagus bei einer Länge unter 3 cm. Dies betrifft ungefähr 8 bis 20 Prozent der Bevölkerung. Einen long segment-Barrett-Oesophagus mit über 3 cm findet man lediglich bei einem Prozent der Bevölkerung [11].

Hinsichtlich einer Dysplasie unterscheidet man Barrett-Epithel ohne Dysplasie, mit geringgradiger und höhergradiger Dysplasie. Die Dysplasie im Barrett-Epithel ist definiert als ein neoplastischer Prozess, der auf das Epithel beschränkt ist. Die Gefahr, ein Karzinom zu entwickeln steigt mit zunehmendem Dysplasiegrad an.

Ursachen für die Entwicklung von Adenokarzinomen des ösophago-gastralen Übergangs sind weniger genau geklärt. Die Vorstufe des Karzinoms bezeichnet man hier als Cardiale intestinale Metaplasie (CIM). Diese wird sowohl mit einer Helicobacter-pylori-Infektion [25, 26] wie auch mit gastro-ösophagealem Reflux in Verbindung gebracht [27-30].

1.2.3 Pathologie und Typisierung

Bei den malignen Neoplasien des Ösophagus handelt es sich in den meisten Fällen um Plattenepithel- oder Adenokarzinome, nur in seltenen Fällen findet man kleinzellige oder undifferenzierte Karzinome. Die Verteilung ist dabei stark abhängig von regionalen Gegebenheiten. Betrachtet man das europäische Mittel, zeigt sich, dass das Adenokarzinom etwa 40 bis 50% der Ösophaguskarzinome ausmacht.

Im gesamten Ösophagus kann es zu der Entwicklung eines Karzinoms kommen, wobei die unterschiedlichen Karzinomtypen meist an charakteristischen Stellen entstehen. Bezüglich der Karzinomlokalisierung

unterscheidet man anatomisch drei Abschnitte des Ösophagus: zervikal (5-10%), (supra)bifurkal (30-35%) und infrabifurcal (50-60%). Adenokarzinome finden sich im distalen Ösophagus und am ösophago-gastralen Übergang. Nach Siewert werden die Barrett-Adenokarzinome als Typ-1-Karzinome den Ösophaguskarzinomen, die Karzinome des ösophago-gastralen Übergangs als Typ-2-Karzinome den Kardiakarzinomen (Karzinome des ösophagogastralen Übergangs) zugeteilt. Typ-3-Karzinome bezeichnen subcardiale Magentumore, die von aboral die Kardia infiltrieren [1].

Häufig ist es schwer, eine klare Trennung zwischen den Karzinomen von Ösophagus und denen des ösophago-gastralen Übergangs vorzunehmen. Ösophaguskarzinome können in Richtung Kardia wachsen und diese involvieren, ebenso können sich Kardiakarzinome in den distalen Ösophagus ausbreiten [1]. Das Metastasierungsverhalten und die Überlebensrate von Adenokarzinomen des Ösophagus und Kardiakarzinomen lassen sich gut vergleichen [31-33]. Aus diesen Gründen wurden die beiden Karzinome, wie bereits in anderen Studien, auch in dieser Arbeit in einer Gruppe ausgewertet.

Die Differenzierung der Tumore reicht von gut differenziert (G1) bis anaplastisch (G4).

G1	Tumor gut differenziert
G2	Tumor mäßig differenziert
G3	Tumor schlecht differenziert
G4	Tumor undifferenziert/anaplastisch

Tabelle 1: Einteilung in verschiedene Differenzierungsgrade [34].

1.2.4 Stadieneinteilung

Das Ösophaguskarzinom breitet sich zunächst lokal in den Wandschichten des Ösophagus und nachfolgend in umliegenden Organen und Geweben aus. Durch eine fehlende Serosa wird sowohl die Ausbreitung in benachbarte Strukturen sowie auch die Metastasierung erleichtert.

Aufgrund der Anatomie erfolgt meist eine rasche lymphogene Metastasierung in lokale paraösophageale und parakardiale Lymphknoten. Die Prävalenz von Lymphknotenmetastasen ist dabei abhängig vom Tumorinvasionsgrad [35, 36]. Das Risiko für Lymphknotenmetastasen beträgt bei Tumoren, die auf die Mucosa beschränkt sind, 5% und steigt bei Karzinomen, die die Umgebung infiltrieren auf bis zu 80% an.

Im Verlauf treten dann auch Fernmetastasen auf, die typischerweise in Lunge und Leber zu finden sind. Bei weit fortgeschrittenen Karzinomen findet sich häufig eine Peritonealkarzinose.

Im Rahmen des Tumorstaging werden Endoskopie/Endosonographie, Röntgen-Breischluck, CT, Bronchoskopie sowie Skelettszintigraphie und die PET eingesetzt. Das histopathologische Tumorstaging wird nach der pTNM-Klassifikation eingeteilt (Tabelle 2).

1.2.4.1 *pTNM-Klassifikation der Ösophagustumore*

<u>Tumor</u>	
pTx	Primärtumor nicht beurteilbar
pT0	Kein Primärtumor nachweisbar
pTis	Nichtinvasives Karzinom
pT1	Primärtumor begrenzt auf Lamina propria und Submucosa
pT2	Primärtumor infiltriert Muscularis propria
pT3	Primärtumor infiltriert Adventitia
pT4	Ausbreitung auf extraösophageale Strukturen
<u>Regionäre Lymphknoten</u>	
pNx	Regionärer Lymphknotenbefall nicht beurteilbar
pN0	Kein regionärer Lymphknotenbefall
pN1	Regionärer Lymphknotenbefall
<u>Fernmetastasen</u>	
pMx	Fernmetastasen nicht beurteilbar
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen (M1a: zervikal, zöliakal, M1b: andere)

Tabelle 2: Staging der Ösophagustumore (die pTNM-Klassifikation entspricht der TNM-Klassifikation).

Da die Kardiakarzinome histopathologisch nach den Magentumoren klassifiziert werden, wird an dieser Stelle auch die pTNM-Klassifikation der Magentumore aufgeführt (Tabelle 3).

1.2.4.2 *pTNM-Klassifikation der Magentumore*

<u>Tumor</u>	
pTx	Primärtumor nicht beurteilbar
pT0	Kein Primärtumor vorhanden
pT1	Tumor auf Mucosa/Submucosa beschränkt
pT2	Tumor bis zur Serosa reichend
pT3	Tumor durchbricht die Serosa (Nachbarorgane frei)
pT4	Tumorbefall auch der Nachbarorgane
<u>Regionäre</u>	
<u>Lymphknoten</u>	
pNx	Regionaler Lymphknotenbefall nicht beurteilbar
pN0	Regionale Lymphknoten frei
pN1	Regionaler Lymphknotenbefall < 3cm vom Tumor entfernt
pN2	Regionaler Lymphknotenbefall > 3cm vom Tumor entfernt
pN3	Disseminierter intraabdominaler Lymphknotenbefall
<u>Fernmetastasen</u>	
pMx	Fernmetastasen nicht beurteilbar
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen gesichert

Tabelle 3: Staging der Magentumore (die pTNM-Klassifikation entspricht der TNM-Klassifikation).

Anhand der pTNM-Klassifikation lassen sich die Ösophaguskarzinome wie alle bösartigen Neubildungen in vier UICC-Stadien einteilen [37].

UICC-Stadien

I	T1	N0	M0
IIA	T2, T3	N0	M0
IIB	T1, T2	N1	M0
III	T3	N1	M0
	T4	jedes N	M0
IV	jedes T	jedes N	M1
IVA	jedes T	jedes N	M1a
IVB	jedes T	jedes N	M1b

Klinische Zeichen sind im Frühstadium sehr selten, sodass das Ösophaguskarzinom meist erst in einem späten Stadium diagnostiziert wird (Tabelle 4). Weniger als 10% der Ösophagustumore werden als Frühkarzinome erkannt [12]; dementsprechend gering ist auch die 5-Jahres-Überlebensrate. Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren zeigen häufig Dysphagie, Gewichtsverlust, retrosternale Schmerzen sowie Schmerzen im Rücken und Heiserkeit.

<u>Stadium</u>	<u>Prozentualer Anteil der Karzinome</u>
I	9%
II	16%
III	34%
IV	41%

Tabelle 4: Prozentuale Zuteilung der entdeckten Ösophaguskarzinome nach Stadium [12].

1.2.5 Prognose

Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Zufallsbefunden von Adenokarzinomen beträgt nur 5 bis 15 Prozent, bei Erkennung der Entartung im Rahmen von Früherkennungsprogrammen ist die Rate mit 35 bis 40 Prozent etwas höher [1]. Die Prognose steht in enger Korrelation mit dem Tumorstadium. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach Resektion reicht je nach Tumorstadium von 95% bis unter 1% (Tabelle 5) [13].

<u>UICC-Tumorstadium</u>	<u>5-Jahres-Überlebensrate</u>
0	> 95%
I	50 bis 80%
II A	30 bis 40%
II B	10 bis 30%
III	10 bis 15%
IV A	<5%
IV B	<1%

Tabelle 5: 5-Jahres-Überlebensraten in verschiedenen Tumorstadien nach Resektion [13].

Allgemeine Vorsorgeuntersuchungen finden in der Bevölkerung nicht statt. Bei vorhandenem Barrett-Ösophagus existieren Schemata zur regelmäßigen Kontrolle.

1.2.6 Therapiekonzepte

Es gibt verschiedene Therapiemaßnahmen, die in Abhängigkeit vom Tumorstadium eingesetzt werden. Einer insgesamt schlechten 5-Jahres-Überlebensrate stehen im Tumorstadium I sehr gute operative Ergebnisse

gegenüber. Kurativ, sowie palliativ können Strahlen- oder Chemotherapie sowie kombinierte Verfahren eingesetzt werden. Palliativ stehen Symptomverbesserung und Lebensverlängerung im Vordergrund.

1.2.6.1 Chirurgische Therapiemaßnahmen

Besonders in frühen Tumorstadien stellt die Ösophagektomie mit Lymphknotendissektion die Therapie der Wahl dar. Es können unterschiedliche Zugangswege gewählt werden: links thorakoabdominal, transhiatal, rechts thorakoabdominal, retrosternal. Nach Entfernung des Ösophagus wird der Defekt mit einem Magenhochzug oder einem Colon- bzw. Jejunuminterponat überbrückt [38].

Im UICC-Stadium I können 5-Jahres-Überlebensraten von über 90% erreicht werden [39]. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass lediglich 9% der Karzinome in diesem frühen Stadium erkannt werden. Ungefähr 50% der Karzinome werden bei Erstdiagnose den Stadien II und III zugeordnet. Die 5-Jahres-Überlebensraten sinken hier bei selektiver chirurgischer Therapie auf 35% bis 57%. Nach neuesten Studien [40] zeigt sich, dass der Therapieerfolg bei Patienten im höheren Alter (>75 Jahre) mit dem von jüngeren Patienten vergleichbar ist. Die Prognose scheint daher unabhängig vom Alter der Patienten zu sein.

Der Einsatz vorhandener adjuvanter und neoadjuvanter Therapiekonzepte ist umstritten, da ein Überlebenseffekt bislang nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Problematisch ist auch eine hohe Anzahl von Nebenwirkungen, sodass die isolierte En-bloc-Resektion des Ösophagus bevorzugt eingesetzt wird [41]. Bei primär nicht operablen Tumoren wird häufig durch neoadjuvante Radiochemotherapie versucht, eine Remission des Tumors zu erreichen, um im Anschluss kurativ operieren zu können.

Die Mortalitätsrate bei der Ösophagektomie ist auch heute mit 8% bis 20% noch relativ hoch [42, 43]. Zu beachten sind in Bezug auf die Patientenkonstitution besonders die kardiale und pulmonale Funktion. Bollschweiler et al. weisen in diesem Zusammenhang auf die hohe Zahl

schwerer Begleiterkrankungen - vorwiegend kardiovaskuläre und chronische Lungenerkrankungen - bei Patienten mit Speiseröhrenkrebs hin [16]. Im Gegensatz zum Alter steigern die genannten Komorbiditäten eindeutig das Operationsrisiko [44, 45].

1.2.6.2 Strahlentherapie

Das Adenokarzinom des Ösophagus gilt als strahlensensibel. Bei nicht operablen Tumoren kann eine Bestrahlung mit einer kumulativen Strahlendosis von 50 bis 60 Gy durchgeführt werden. Es zeigen sich dabei 1- und 2-Jahres-Überlebensraten von ca. 33% und 10% [46]; trotz hoher Remissionsraten von ca. 80% zeigen die niedrigen Überlebensraten, dass sich mit Hilfe der Radiotherapie der Tumor nicht längerfristig beherrschen lässt.

Der Wert einer neoadjuvanten Strahlentherapie wird kontrovers diskutiert. Eine adjuvante Strahlentherapie ist aufgrund eines fehlenden Überlebensvorteils im Vergleich zur alleinigen chirurgischen Therapie nicht indiziert [47-49].

1.2.6.3 Chemotherapie

Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren können durch intensive Chemotherapie Überlebenszeiten von bis zu 17 Monaten erreicht werden [50]. Das Therapieergebnis ist dabei in erster Linie abhängig vom Ansprechen des Patienten auf die Chemotherapie. Mehrere Studien haben bereits untersucht, wie sich eine neoadjuvante Chemotherapie auf das Adenokarzinom des Ösophagus auswirkt [51-57]. Die Studienergebnisse sind nicht eindeutig und werden kontrovers diskutiert. Eine einzelne Arbeitsgruppe beschreibt, dass Patienten, die mit einer neoadjuvanten Therapie behandelt wurden, ein längeres Überleben aufwiesen als Patienten, die lediglich einer chirurgischen Therapie unterzogen wurden [58]. Es zeigte sich ein Überlebensvorteil von 14% nach 5 Jahren. Die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant.

1.2.6.4 Kombinierte Therapieverfahren

In Studien, die sowohl das Adeno- wie auch das Plattenepithelkarzinom einbezogen haben, wird ein 5-Jahres-Überleben von 26% sowie ein 3-Jahres-Überleben von 30% bei Kombinationstherapien publiziert, während bei alleiniger Radiatio kein Patient das 3-Jahres-Intervall überlebte. Auch der Krankheitsverlauf war günstiger: Nach 12 Monaten zeigte sich in 46% ein Fortschreiten der Erkrankung, während dies bei alleiniger Bestrahlung sogar bei 68% der Patienten der Fall war [46, 59].

Bei Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien setzt man die Radiochemotherapie häufig als neoadjuvante Therapie ein, um vor dem chirurgischen Eingriff eine Tumorreduktion zu erreichen. Dabei konnte ebenfalls ein verbessertes Überleben im Vergleich zur alleinigen chirurgischen Therapie festgestellt werden [57, 60]. Bei multimodaler Therapie ergaben sich 1-, 2- und 3-Jahres-Überlebensraten von 52%, 37% und 32%, verglichen mit 44%, 26% und 6% bei chirurgischer Therapie ohne Chemoradiatio. Das Überleben nach drei Jahren war dabei signifikant höher [57].

Trotz einer günstigeren Prognose kann man jedoch auch bei der kombinierten Therapie bisweilen nicht von einem zufriedenstellenden Ergebnis sprechen. Studien zur Verbesserung der Therapie dauern an, bisweilen konnten die Heilungsraten jedoch weder durch Veränderung der Strahlendosis noch durch Erhöhung der chemischen Toxizität verbessert werden.

Für den kurativen Ansatz erscheint somit zurzeit nur die chirurgische Therapie geeignet. Karzinome im oberen Teil des Ösophagus können gegebenenfalls mit einer selektiven Radiochemotherapie behandelt werden. Bei en-bloc-Resektion des Ösophagus können im Stadium I 5-Jahres-Überlebensraten von bis zu 90% erreicht werden. Da die Karzinome allerdings meist erst in späteren Stadien entdeckt werden, wird insgesamt lediglich ein relatives 5-Jahres-Überleben von etwa 11% bei den männlichen und 8% bei den weiblichen Patienten erreicht.

Die Ergebnisse der neoadjuvanten Chemotherapie werden zurzeit kontrovers diskutiert, sie scheint jedoch bei geeigneten Patienten (lokal fortgeschrittener

Tumor und gutes Ansprechen auf die Therapie) das Überleben verlängern zu können.

1.3 EpCAM:

1.3.1 Biologie

Das epitheliale Zell-Adhäsions-Molekül (Epithelial-cellular adhesion molecule) EpCAM ist ein transmembranes Glykoprotein Typ1 mit einem Gewicht von 40kD. Es wird kodiert durch das 9-Exon-Gen TACSTD1 (tumor-associated calcium-signal-transducer) [3], welches auf Chromosom 2p21 lokalisiert ist.

Nachdem für EpCAM eine Vielzahl von Synonymen (17-1A, GA733-2, EGP 40) bestanden haben, hat man sich mittlerweile in der offiziellen Nomenklatur auf die Bezeichnungen EpCAM und CD326 geeinigt.

Das Molekül besteht aus einer externen Domäne mit zwei EGF-ähnlichen Motiven, darauf folgen eine Cystein-reiche Region, die Transmembrandomäne und eine kurze intrazelluläre Domäne bestehend aus zwei alpha-actinin-Bindungsstellen. Die Bindungsstellen können eine Verbindung mit dem Actin-Cytoskelett herstellen und tragen zur Funktion von EpCAM als intrazelluläres Adhäsionsmolekül zur Modulation der Cadherin-vermittelten Adhäsion bei.

Innerhalb des reifen Gewebes wird EpCAM in den meisten glandulären Epithelien und Übergangsepithelien exprimiert. Es befindet sich dabei an der basolateralen Membran. Im normalen Plattenepithel, sowie in mesenchymalen, muskulären und neuroendokrinen Geweben wird es nicht exprimiert [3]. Frühe Entwicklungsstufen vieler Gewebe zeigen eine hohe EpCAM-Expression; so ist in embryonalem Lebergewebe EpCAM nachweisbar, wohingegen dies in gesundem reifen Lebergewebe - bis auf die Gallengangsepithelien - nicht der Fall ist. Weiterhin zeigt sich das typische Bild einer dynamischen Veränderung des Expressionsschemas. So zeigen zum Beispiel Vorläuferzellen der Hautepithelien eine EpCAM-Expression, während bei differenzierten Keratinozyten eine EpCAM-Expression nicht mehr nachweisbar ist [53].

1.3.2 EpCAM-Expression bei Karzinomen

Bei verschiedenen Tumorentitäten konnte eine starke EpCAM-Expression bzw. eine de novo-Expression nachgewiesen werden. Dazu gehören u.a. das Mammakarzinom, die Karzinome von Colon und Magen, das Ovarialkarzinom sowie das Nierenzellkarzinom und Karzinome der Mundhöhle und der Lunge.

Beim Mammakarzinom korreliert eine starke EpCAM-Expression mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall sowie einem schlechteren Gesamtüberleben [61, 62]. Es stellte sich nun die Frage, ob eine hohe EpCAM-Expression bei dieser Tumorart direkt zu einem aggressiven Phänotyp beiträgt. Gillanders et al. [63] konnten nachweisen, dass eine EpCAM-Überexpression beim Mammakarzinom mit einer gesteigerten Proliferation, Migration und Invasivität von Mammakarzinomzellen einhergeht. Bei Hemmung der EpCAM-Expression durch RNA-Interferenzversuche kam es zur verringerten Proliferation und Invasivität [63].

Eine starke EpCAM-Expression konnte auch beim Gallenblasenkarzinom [64] und beim Ovarialkarzinom [65] als negativer prognostischer Marker identifiziert werden. Interessanterweise gibt es allerdings auch Karzinome, bei denen eine hohe EpCAM-Expression anscheinend mit einer gesteigerten Überlebensdauer verbunden ist. Beispiele hierfür sind das Nierenzellkarzinom [66] und das Magenkarzinom [67]. In der gesunden Magenmukosa zeigte sich eine positive EpCAM-Expression im Bereich der Drüsen. Im Verlauf einer intestinalen Metaplasie stieg die Expression von EpCAM dann deutlich an, wohingegen die Expression bei fortgeschrittenen Magenkarzinomstadien wieder geringer war [67].

Verschiedene Studien haben bereits im Hinblick auf eine Erklärung für die unterschiedliche EpCAM-Expression in verschiedenen Tumoren den Methylierungsstatus des Promotors untersucht. Spizzo et al. konnten bei in-vitro-Versuchen zeigen, dass die EpCAM-Promotor-Region sowie Exon1 in EpCAM-negativen Brustkrebszelllinien (Hs578T) im Gegensatz zu EpCAM-positiven Zelllinien (MCF-7) stärker methyliert sind [68]. Andere Arbeiten zeigten eine vergleichbare Korrelation zwischen der Promotor-Methylierung und

der EpCAM-Expression im Tumor. In der Arbeit von Shiah et al. konnte 2008 eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Promotor-Methylierung und einer geringen EpCAM-Expression bei oralen Plattenepithelkarzinomen festgestellt werden, sodass hier die Methylierung als Regulationsmechanismus der EpCAM-Expression diskutiert werden kann [69].

1.3.3 EpCAM-Expression bei Ösophaguskarzinomen

Die Plattenepithel-Karzinome des Ösophagus weisen eine EpCAM-Expression auf, während das Ausgangsepithel (Plattenepithel) kein EpCAM exprimiert [70, 71]. Es konnte dabei kein signifikanter Zusammenhang zwischen der EpCAM-Expression im Ösophaguskarzinom und den histopathologischen Parametern beobachtet werden. In der Arbeit von Stoecklein et al. zeigte sich jedoch, dass eine starke EpCAM-Expression im Plattenepithelkarzinom mit einem signifikant geringeren Überleben einhergeht [70]. Die Studienergebnisse sind hier allerdings nicht einheitlich. Kimura et al. zeigten in ihrer Studie ein signifikant höheres Überleben für Patienten mit stark EpCAM-positiven Tumoren [71].

Das Barrett-Epithel als Ausgangspunkt des Adenokarzinoms zeigte in einer Studie nach Kumble et al. im Gegensatz zum Plattenepithel eine positive EpCAM-Expression [72]. Zusätzlich wurden vier Proben eines Adenokarzinoms untersucht, bei denen hohe Expressionswerte gefunden wurden. Die Arbeitsgruppe stellte die Vermutung auf, dass EpCAM positiv mit der Progression vom Barrett-Epithel zum Adenokarzinom korreliert [72]. Eine starke EpCAM-Expression im Barrett-Ösophagus konnte in nachfolgenden Studien bestätigt werden [73].

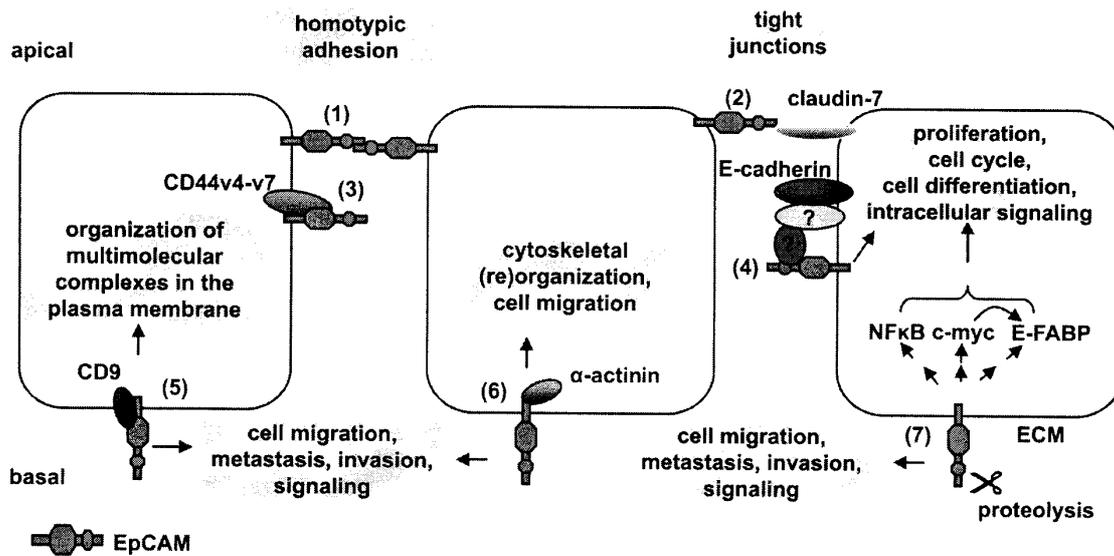


Abbildung 1: Schematische Darstellung der identifizierten Funktionen von EpCAM [74]. Homotypische Verbindung zwischen zwei EpCAM-Molekülen (1); Verbindung zwischen EpCAM und Claudin-7 (2); Verbindung zwischen EpCAM und CD44v4-v7 (3); indirekte Verbindung zwischen EpCAM und E-Cadherin (4); EpCAM bildet einen Primärkomplex mit CD19 im Tetraspanin-Netz (5); Verbindung zwischen EpCAM und alpha-Actinin (6); EpCAM moduliert die Expression von NF-KB, c-myc und E-FABP (epidannel fatty acid binding protein) (7).

Die Funktion von EpCAM und die Interaktion mit anderen Molekülen wurden bis dato hauptsächlich über in-vitro-Versuche gezeigt. Zur genaueren Klärung der Funktion von EpCAM stehen in-vivo-Versuche noch aus.

1.4 Der WNT-Signalweg und EpCAM

Der WNT-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Embryogenese und der Aufrechterhaltung verschiedener gastrointestinaler Organe [75]. Jedoch scheint er auch bei der Entstehung verschiedener Karzinome eine wichtige Rolle zu spielen [75-77].

Die Signalvermittlung des WNT-Signalwegs im Zellkern erfolgt über beta-Catenin, indem es zunächst in den Zellkern transloziert wird. Dort wirkt es als Transkriptionsaktivator verschiedener genetischer Programme (Abbildung 2). Eine solche Translokation in den Zellkern wird durch WNT-Liganden ermöglicht. WNT bindet an den Transmembranrezeptor Frizzled. Dies bewirkt eine Phosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils vom Co-Rezeptor LRP (low-density lipoprotein receptor related protein), in dessen Folge Axin am phosphorylierten Anteil von LRP gebunden wird. Dies verhindert eine Verbindung von Axin mit verschiedenen zytoplasmatischen Proteinen zu einem Komplex, der zu einer Phosphorylierung und schließlich Ubiquitinierung von beta-Catenin führen würde. In Abwesenheit von WNT kann sich dagegen ein solcher Komplex im Zytoplasma zusammenschließen. Axin interagiert dabei mit dem APC-Protein (adenomatous polyposis coli), GSK-3 β (glykogen synthase kinase) und CKI (casein kinase I). Phosphorylierung und Ubiquitinierung führen zu einem Abbau von beta-Catenin und verhindern somit die Translokation in den Zellkern.

Mutationen, die zu einer unnatürlichen Verstärkung des WNT-Signalwegs führen, konnten in verschiedenen Tumorentitäten beobachtet werden [76, 77]. In den meisten Fällen handelt es sich um eine Inaktivierung der APC-Funktion, die besonders häufig in kolorektalen Karzinomen beobachtet wird [76]. Seltener sind Mutationen, die zu einer Aktivierung von beta-Catenin oder einer Veränderung des WNT-Liganden führen.

Interessant für die vorliegende Arbeit ist, dass EpCAM offenbar an der WNT-Signalvermittlung im Zellkern beteiligt ist [78, 79].

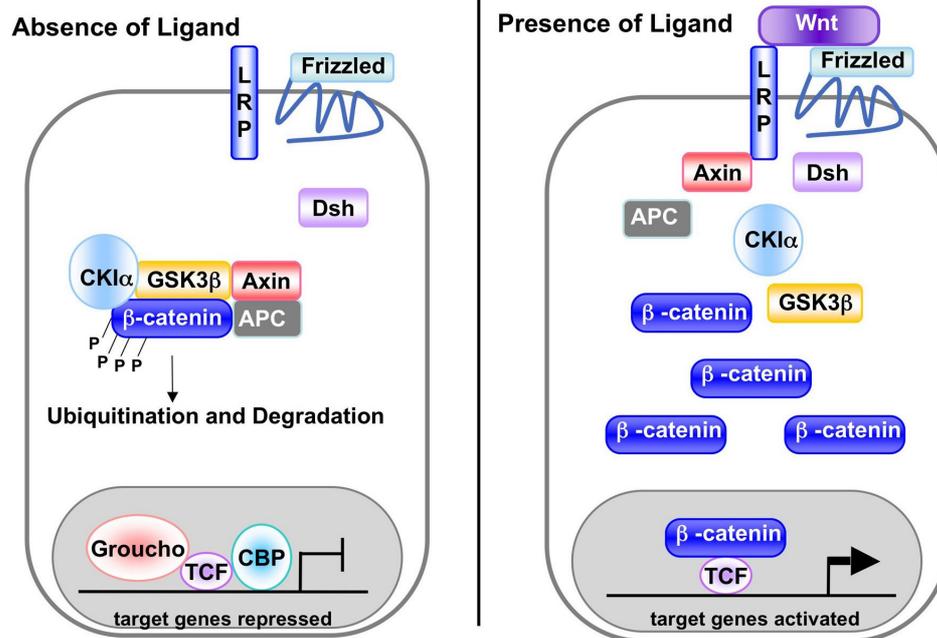


Abbildung 2: Schema des WNT-Signalweg (in Abwesenheit (a) und in Anwesenheit (b) des spezifischen Liganden WNT) [80].

1.5 Tissue Microarray

Battifora beschrieb als erster die Möglichkeit, mehrere Gewebeproben in einen einzelnen Paraffinblock zu platzieren und schuf damit die Grundlage für die Tissue Microarray-Technik. Die Methode des Tissue Microarray wurde dann erstmals 1998 von Kononen et al. in Zusammenarbeit mit dem Unternehmen Beechers Instruments Inc (Maryland USA) publiziert [81].

Bei dieser Methode können bis zu 1000 archivierte Patientenproben auf einem Paraffinblock platziert werden. Heutzutage setzt man zum Teil bereits automatisierte TMA-Geräte ein. Insgesamt ermöglicht diese Methode, ein großes Kollektiv unter möglichst einheitlichen Bedingungen zu analysieren. Dies führt zu einer guten Vergleichbarkeit der untersuchten Proben untereinander. Im Vergleich zu den älteren Methoden, bei denen jede Gewebeprobe einzeln behandelt werden musste, gelangt man schnell zu einem Ergebnis und erreicht somit auch unter Kostenaspekten eine hohe Effizienz.

2 Material und Methode

2.1 Geräte, Materialien, Softwar

10 × Target Retrieval Solution (Dako S1699)
ABC-Kit (Vectastain, Peroxidase: Mouse IgG:PK-4002, Rabbit-IgG:PK-4001)
AB-Serum (Biotest, 805135)
Cryoschneider (SLEEMainz, MHR-Controller, 22778)
DAB + Chromogen (DAKO, K3468)
DAKO Fettstift (DAKO, Hamburg)
Deckgläschen (Menzel-Glaser)
E-Cadherin-Antikörper (DAKO, M3612, NCH-38)
Entellan (MERCK, 38, Darmstadt)
EpCAM-Antikörper (DAKO, M0804, Ber-EP4)
Ethanol 70-ig, 90-ig, 100-ig (Roth, Karlsruhe)
Gefrierschrank (Thermo electron corporation, Forma 905)
H₂O₂ (Merck, 8597.1000 304K19013597)
Hämatoxylin-Eosin-Lösung (Sigma, Deisenhofen)
Kamera (Leica, DFC 280, 49658)
Mikroskop (Leica, DMIL, 49775)
Mikrotom (Leica, SM2000R, 50749)
Mouse IgG1 (MOPC-21) (Sigma, M5284)
Objektträger (Engelbrecht)
PBS (Gibco, 14190-169, pH 7,4)
Peroxidase Mouse IgG (Vector laboratories, PK4001 10-20/21)
Pipettenspitzen (Eppendorf VWR)
Plastikpipetten (International 631-0801)
Rabbit Immunoglobulin Fraction (DAKO, X0903)
SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA)
beta-Catenin-Antikörper (Lab vision/Neo markers, RB-1491-P, 9E10.3)
Stanzgerät (Beecher Instruments)

Wärmeschrank (Memmert, 38146)

Wasserbad (Färbung) (Memmert, 52636)

Wasserbad (Leica, HI 1210, 50750)

Xylol (Merck, 1.08685.2500)

2.2 Patientenkollektiv

Das in der Arbeit berücksichtigte Tumorkollektiv umfasste in Paraffin eingebettete Gewebe von 98 Patienten mit Karzinomen im Bereich von Ösophagus und ösophagogastralem Übergang. Bei den Patienten wurde im Zeitraum 1992 bis 2006 eine Tumorsektion mit kurativer Intention in den Allgemeinchirurgischen Abteilungen der Universitätskliniken Düsseldorf und Köln vorgenommen. Patienten, die mit einer neoadjuvanten Therapie behandelt wurden, wurden nicht einbezogen. Die in die Studie aufgenommenen Patienten wurden im Rahmen der histopathologischen Beurteilung ausgewählt. Es handelte sich ausschließlich um Adenokarzinome. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Alter zwischen 26 Jahren und 82 Jahren, der Altersmedian lag bei 64 Jahren. In dem Kollektiv befanden sich insgesamt 77 Männer und 21 Frauen. Die pTNM-Klassifikation erfolgte nach den UICC-Kriterien [37]. Die Einteilung der untersuchten Tumoren gemäß der TNM-Klassifikation wird in Tabelle 6 zusammengefasst. Bei Fertigstellung der Promotionsarbeit lagen bei vier der 98 Patienten keine Angaben zur T- und N-Kategorie sowie dem Differenzierungsgrad vor. Dementsprechend wurden diese Patienten in Tabellen und Analysen, die Bezug auf diese Daten nehmen, nicht berücksichtigt.

Bei 26 der 98 Patienten waren zusätzlich zum Tumormaterial Gewebeproben von Normalepithel des Ösophagus vorhanden. Diese wurden ebenfalls im Hinblick auf Expression von EpCAM, beta-Catenin und E-Cadherin untersucht. Zu den Adenokarzinomproben wurden zu Vergleichszwecken jeweils zehn Materialproben von Barrett-Mucosa und gesunder Magenmucosa hinzugezogen. Es handelte sich hierbei um Biopsien aus dem Jahr 2007, die

aufgrund ihrer geringen Größe nicht in den TMA einbezogen wurden. Sie wurden einzeln angefärbt sowie analysiert.

	Patienten	
	absolut	in Prozent
T-Kategorie		
pT1	6	7
pT2	50	53
pT3	36	38
pT4	2	2
N-Kategorie		
pN0	29	31
pN1	39	41
pN2	13	14
pN3	13	14
Grading		
G1	0	0
G2	25	27
G3	53	56
G4	16	17

Tabelle 6: Verteilung des Patientenkollektivs gemäß TNM-Klassifikation.

2.3 Tissue Microarray (TMA)

Für die Herstellung des Tissue Microarrays wurden jeweils zwei Proben aus der Invasionsfront des Tumors und dem Tumorzentrum entnommen, sowie jeweils eine Probe von normalem Plattenepithel des Ösophagus und Lymphknotenmetastasen. Durch doppelte Entnahme von Proben aus Invasionsfront und Tumorzentrum wurde versucht, die Heterogenität innerhalb des Tumorgewebes zu berücksichtigen.

Neben dem Tumorgewebe wurden Plazenta- und Schilddrüsengewebe auf den TMAs platziert, welche als Orientierungspunkte im TMA dienten.

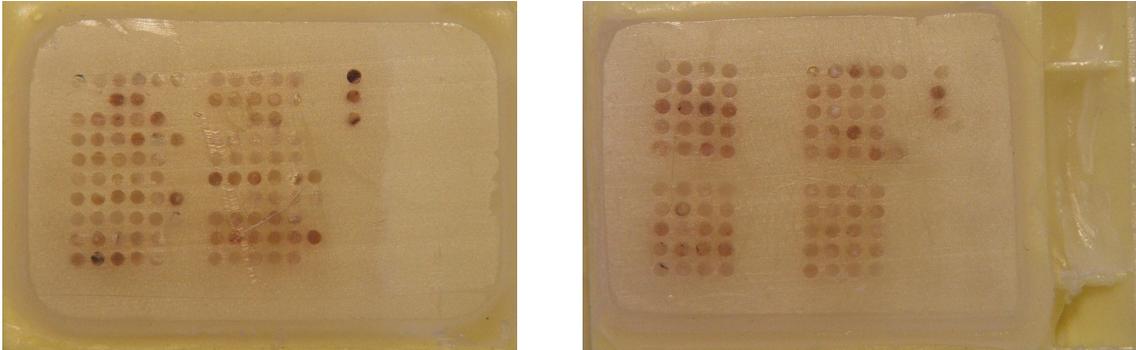


Abbildung 3: zwei Beispiele für TMAs mit Patientenproben und Orientierungspunkten.

Als Positivkontrolle wurden Proben von Kolonmucosa mitgefärbt, die bereits in mehreren Untersuchungen in unserem Labor als stark EpCAM-positiv ausgewertet worden waren.

Durchführung:

Vor dem Anfertigen der TMAs wurden zunächst von den entsprechenden Gewebeblöckchen HE-Schnitte angefertigt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden relevante Tumoreareale, unterschieden nach Invasionsfront, Zentrum sowie Normalgeweben, markiert, die später genau der Stanzregion entsprechen sollten.

Im ersten Schritt wurde nun zunächst mit Hilfe einer Hohlzylinder aus dem Paraffinblöckchen gestanzt, das den Rezipientblock bzw. späteren TMA darstellte. An diese Stelle wurde dann ein Gewebezylinder, der mit einer weiteren Nadel aus dem sogenannten Donorblock entnommen wurde, gestanzt. Dies wurde mit Hilfe eines Stanzgerätes (Tissue Arrayer) durchgeführt (Abbildung 4).

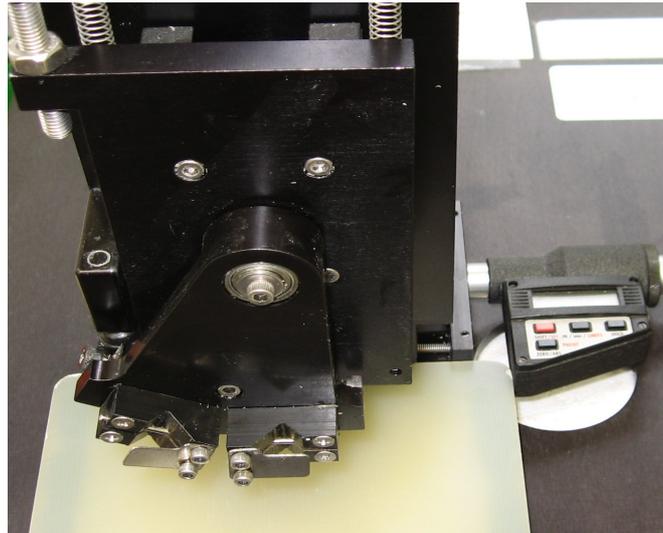


Abbildung 4: Stanzgerät.

Der Vorgang wurde wiederholt bis der TMA nach einem bestimmten Raster mit den Patientenproben gefüllt war. In diesem Fall sah das Raster so aus, dass nebeneinander die Proben von zwei Patienten sowie untereinander von 10 Patienten angeordnet waren. Zwischen den unterschiedlichen Proben eines Patienten wurde ein Abstand von 1,5 mm gewählt. Der Probenabstand zwischen den Stanzen zweier verschiedener Patienten wurde mit drei Millimeter festgelegt (Abbildung 5).

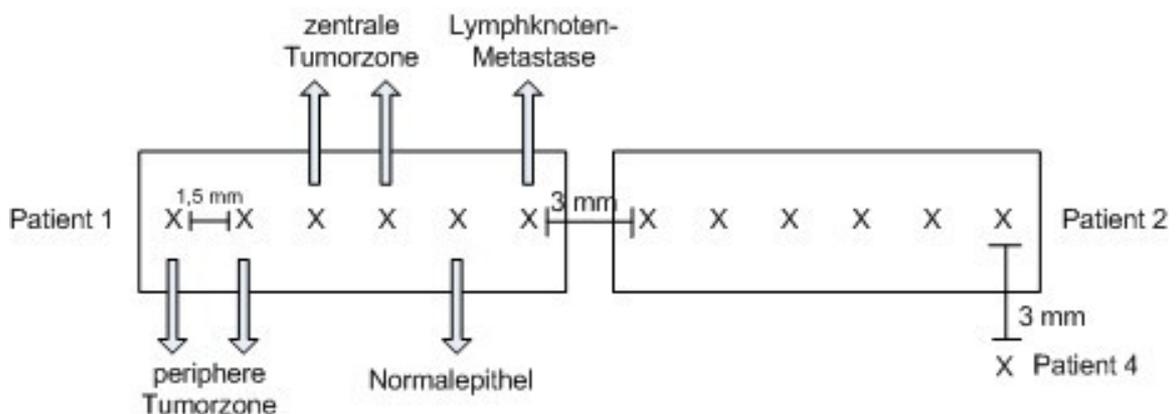


Abbildung 5: schematischer Aufbau eines TMA.

Zur späteren Identifikation der Proben auf dem TMA wurden die Nummern der Gewebeblöcke sowie die entnommene Region während des Stanzens auf dafür vorgefertigten Bögen schriftlich festgehalten (Abbildung 6). Es wurden in der rechten oberen Ecke jedes TMA jeweils drei Proben von Placenta und Schilddrüse eingebracht.

	Tumor				Normal- gewebe	Lymphknoten- metastase
Fall- Nummer						
Block-Nr.						
Gewebe						
Region	Invasions- front	Invasions- front	Zentrum	Zentrum	Epithel	Lymphknoten
Koordinaten	1,1	2,1	3,1	4,1	5,1	6,1

Abbildung 6: Prinzip eines vorgefertigten Dokumentationsbogen.

Bei keinem der angefertigten Blöcke kam es zu Brüchen im Paraffin.

Nachdem das Raster für den Block mit Stanzen ausgefüllt war, wurden die Blöckchen zur Verbindung von Paraffin und Gewebe bei 56°C angeschmolzen. Die Blöckchen waren nun bereit zur Anfertigung von Schnitten mit Hilfe eines Mikrotoms. Zur Kontrolle der Schnittebene wurde vor dem Schneiden eine HE-Färbung durchgeführt.

Die Reaktionen des Gewebes bei Färbungen mit Antikörpern gegen EpCAM, beta-Catenin und E-Cadherin wurden in dieser Arbeit immunhistochemisch untersucht. Die Färbung wurde nach Protokoll mit der ABC-Methode durchgeführt.

2.4 Immunhistochemie

Schnittherstellung

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden zunächst Schnitte von den TMA hergestellt. Dies erfolgte mit einem Mikrotom, welches es erlaubt, Schnitte gleichbleibender, genau festgesetzter Schnittdicke zu erstellen. Beim Schlittenmikrotom bewegt sich die Klinge über den feststehenden Paraffinblock, der mit Hilfe von Schrauben festgeklemmt wird. Dabei ist es wichtig, darauf zu achten, dass die Schrauben nicht zu fest angezogen werden, da sonst das Paraffin brechen könnte. Der Block sollte vor Beginn des Schneidevorganges für mindestens eine halbe Stunde bei -20°C gelagert werden. Bei Raumtemperatur ist der Block zu weich.

Die Klinge wurde so eingestellt, dass man Schnitte mit gewünschter Schnittdicke von $4\ \mu\text{m}$ erhielt. Bei jeder Schnittbewegung wurde, durch die Kopplung mit dem Vorschubmechanismus, der Block um die eingestellte Schnittdicke angehoben, sodass diese absolut konstant blieb. Das Gewebe wurde geschnitten und mit einem glatten Papier in ein Warmwasserbad mit destilliertem Wasser der Temperatur 20°C eingebracht. Der Schnitt entfaltete sich dann vollständig und konnte über Adhäsionskräfte mit einem Objektträger aufgenommen werden. Der Objektträger bewegte sich dazu leicht unterhalb des Schnittes und hob diesen möglichst luftblasenfrei aus dem Wasser.

Die Klingen mussten während der Nutzung des Mikrotoms mit einem Pinsel von Gewebe- und Paraffinresten befreit werden, um eine gleich bleibende Schnittqualität zu gewährleisten. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Pinsel nicht gegen die Schnittfläche geführt wurde, um ein Stumpfwerden der Klinge zu vermeiden.

Damit sich das Gewebe während der Färbung nicht vom Objektträger löst, wurde es im Ofen erhitzt. Dies geschah über 20 Minuten mit einer Temperatur von 70°C Celsius und einer Temperatur von 56°C über Nacht. Danach war der Gewebeschnitt auf dem Objektträger fixiert und konnte für immunhistochemische Untersuchungen verwendet werden.

Färbungsreihe

Für die Antikörper gegen EpCAM und beta-Catenin lagen bereits Erfahrungen bezüglich der geeigneten Verdünnung vor. Für den Antikörper gegen E-Cadherin (Konzentration 155 µg/ml) lag die Verdünnungsempfehlung des Herstellers bei 1:50 bis 1:200. Um für unsere Untersuchungen die optimale Verdünnung zu bestimmen, wurde eine kontrollierte Färbungsreihe durchgeführt.

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden zunächst Schnitte von Colon-Paraffinblöcken der Dicke 4 µm hergestellt. Es wurden Proben von Kolonmucosa gewählt, da diese E-Cadherin exprimiert.

Es wurden jeweils drei Färbungen an unterschiedlichen Schnitten mit den Konzentrationen 1:50, 1:100 und 1:200 durchgeführt. Zu jedem Schnitt gab es eine Negativkontrolle. Die Färbung wurde nach Protokoll mit der ABC-Färbung durchgeführt.

Die Gewebe mit der Verdünnung 1:200 erschienen zu schwach gefärbt, bei der Verdünnung 1:50 erschien das Gewebe überfärbt.

Nach Durchführung der Färbungen erschien somit die Verdünnung 1:100 für den Antikörper gegen E-Cadherin als die geeignete.

Antikörper und ihre Konzentration

Letztendlich ergaben sich für die Antikörper gegen EpCAM, beta-Catenin und E-Cadherin jeweils unterschiedliche Konzentrationen (Tabelle 7), die bezüglich der Färbungsintensität zu gut vergleichbaren Färbungsergebnissen führten.

Antikörper	Konzentration	Färbungsmethode	Hersteller
Ber-EP4 EpCAM	2 µg/ml	ABC-Methode	DAKO
9E10.3 βCatenin	4 µg/ml	ABC-Methode	LabVision/NeoMarkers
NCH-38 ECadherin	1,55 µg/ml	ABC-Methode	DAKO

Tabelle 7: In unserer Arbeit verwendete Antikörper mit Konzentration, angewendeter Färbungsmethode und Hersteller.

Ber-EP4 gehört neben 323/A3 und KS1/4 zu den am häufigsten gegen EpCAM angewendeten Antikörpern [82].

Barrett-Epithel und Normalmucosa

Von den Biopsien des Barrett-Epithels und der Normalmucosa des Magens wurden nach der bereits beschriebenen Methode Schnitte angefertigt. Nachfolgend wurden sie wie die Schnitte des TMAs immunhistochemisch nach der ABC-Methode mit EpCAM gefärbt.

Avidin-Biotin-Komplex-Methode

Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode beruht auf einer starken Bindungsfähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin und dem wasserlöslichen Vitamin Biotin. Es kann sich ein Komplex von einem Avidin mit vier Biotinmolekülen bilden, wobei meist allerdings nicht alle Bindungsstellen besetzt werden.

Das nachzuweisende Gewebeantigen wird zunächst mit einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) markiert. Im nächsten Schritt wird ein biotinylierter

Sekundärantikörper zugegeben, der sich an den spezifischen Primärantikörper anlagert. Danach erfolgt die Bindung von einem Komplex aus biotinylierter Peroxidase und Avidin. Es sind dabei jeweils drei Peroxidasemoleküle über Biotin an Avidin gebunden. Die vierte Biotinbindungsstelle wird nun vom Biotin eines Sekundärantikörpers besetzt.

Die Peroxidase-Moleküle werden in Gegenwart von Diamino-Benzidin und Wasserstoffperoxid in Form einer Farbreaktion nachgewiesen. Es bildet sich ein brauner, schwer löslicher Niederschlag.

Unspezifische Färbereaktionen werden aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin und fehlenden endogenen Avidinbindungsstellen selten beobachtet [83]. Die Farbintensität ist dabei abhängig von der Menge des vorhandenen Antigens.

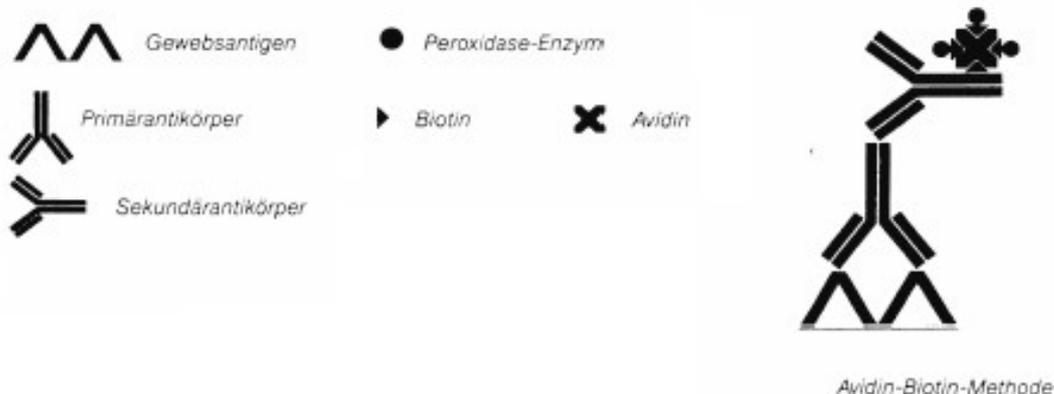


Abbildung 7: schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Methode (modifiziert nach DAKO Diagnostika GmbH Hamburg, Deutschland).

Durchführung der ABC-Färbung:

Die Schnitte wurden zunächst zur Entparaffinierung mit Xylol und Ethanol behandelt. Anschließend wurde eine Antigen-Demaskierung mit Retrieval-Solution-Lösung für 30 Minuten bei 95°C im Wasserbad vorgenommen. Man ließ die Schnitte bei Raumtemperatur abkühlen und spülte sie mit einer Pufferlösung (PBS). Zur Blockierung der endogenen Peroxidase, die im weiteren Verlauf der Färbung zu einer störenden, unspezifischen Hintergrundfärbung führen könnte, wurde 0,3% H₂O₂ auf das Gewebe pipettiert. Nach einer Einwirkzeit von 20 Minuten wurden die Träger erneut in PBS gewaschen. Der nächste Schritt umfasste die Inkubation mit einem Blockungsserum, das unspezifische Proteinbindungen der Antikörper abblockt. Nach 20 Minuten wurde der primäre Antikörper (monoklonaler Antikörper), der spezifisch an die nachzuweisenden Antigene bindet, in entsprechender Verdünnung auf das Gewebe appliziert.

Als Negativkontrolle wurde bei jeder Färbung eine Isotypkontrolle des Primärantikörpers mitgefärbt. Dieser wurde auf einem Folgeschnitt des zu färbenden Präparats als primärer Antikörper inkubiert. Die Negativkontrolle diente zum Nachweis unspezifischer Färbereaktionen des Detektionssystems. Nach erneuter Waschung mit einer Pufferlösung haben wir den Sekundärantikörper (Brückenantikörper) auf das Gewebe gegeben, der sich wie vorangehend beschrieben an den Fc-Teil des Primärantikörpers anlagerte.

Die Farbreaktion ergab sich nach Zugabe von 3,3-Diaminobenzidin, Substratpuffer und Chromogen entsprechend der Antigenverteilung im Gewebe. Zur besseren histologischen Beurteilung wurden die Kerne mit einer Hämalaun-Lösung nach Mayer angefärbt. Im letzten Schritt folgte das Eindeckeln, wobei die Schnitte zunächst mit Alkohol und Xylol behandelt wurden. Das Eindeckeln erfolgte mit Entellan.

Färbungsprotokoll:

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. Xylol | 3 mal 10 min |
| 2. Absteigende Alkoholreihe | |
| 99,5% Ethanol | 2 mal 5 min |
| 96% Ethanol | 2 mal 5 min |
| 80% Ethanol | 2 mal 5 min |
| 70% Ethanol | 1 mal 5 min |
| 3. Aqua dest. | 5 min |
| 4. Retrieval Solution (1:10 in Aqua dest.) | 30 min bei 95°C |
| 5. Retrieval Solution | 20 min bei Raumtemperatur |
| 6. Waschen in PBS | 5 min |
| 7. Blockierung der endogenen Peroxidase mit H ₂ O ₂
(1:100 in PBS) | 30 min |
| 8. Waschen in PBS | 3 mal 3 min |
| 9. Abblocken unspez. AK mit DNS (1Tropfen/3ml PBS) | 20 min |
| 10. Primärantikörper (in 10% AB-Serum) | 45 min |
| 11. Waschen in PBS | 3 mal 3 min |
| 12. Sekundärantikörper (1Tropfen/10ml PBS) | 30 min |
| 13. Waschen in PBS | 3 mal 3 min |
| 14. Inkubation mit ABC-Reagenz
(1Tropfen Reagenz A + 1Tropfen. Reagenz B/5ml PBS) | 30 min |
| 15. Waschen in PBS | 3 mal 3 min |
| 16. Farbentwicklung mit DAB-Substrat
(10 Tropfen Chromogen/10 ml Substratpuffer) | 10 min |
| 17. Waschen mit Leitungswasser | 2 mal 5 min |
| 18. Kerngegenfärbung mit Hämalaun-Lösung nach Mayer | 15 sek |
| 19. Waschen in fließendem Wasser | 20 min |
| 20. Aufsteigende Ethanolreihe | |
| 70% Ethanol, 80% Ethanol, 99%Ethano | jeweils 1 min |
| 21. Xylol | 2 min |
| 22. Eindeckeln mit Entellan | |

2.5 Auswertung

Da in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe das Auswertungsschema des HercepTests™ verwendet wurde, um die Expressionsstärke von EpCAM zu klassifizieren [70], wurde diese Auswertung für die vorliegende Arbeit ebenfalls angewendet. Ursprünglich diente der Test zur Bestimmung der Expression von p185Her2, welches ebenfalls membranär lokalisiert ist.

Das Auswertungssystem von DAKO hat eine Skala von 0 bis 3+ (Tabelle 8). Dabei bedeutet 0 keine Färbung oder eine Färbung bei weniger als 10 Prozent der Tumorzellen; bei 1+ sind mehr als 10 Prozent der Tumorzellen schwach angefärbt, wobei die Färbung nicht die gesamte Membran umgibt; 2+ bedeutet, dass bei mehr als 10 Prozent der Tumorzellen die gesamte Membran eine schwache oder moderate Färbung aufweist; bei 3+ zeigt sich eine starke Färbung der gesamten zellumgebenden Membran bei mehr als 10 Prozent der Tumorzellen (Abbildung 8). Für die Auswertung des HercepTests™ darf nur die Färbung der Zellmembran gewertet werden. Zytoplasmatische Färbung sollte als unspezifisch angesehen und für die Interpretation nicht berücksichtigt werden.

Auswertung nach DAKO: HercepTest™

	Färbungsintensität	Tumorzellzahl
0	Keine Färbung	>=90 Prozent
1+	Schwache Färbung, nicht ganz Membran umgebend	> 10 Prozent
2+	Gesamte Membran weist schwache bzw. moderate Färbung auf	> 10 Prozent
3+	Gesamte Membran weist starke Färbung auf	> 10 Prozent

Tabelle 8: Auswertung nach dem HercepTest™.

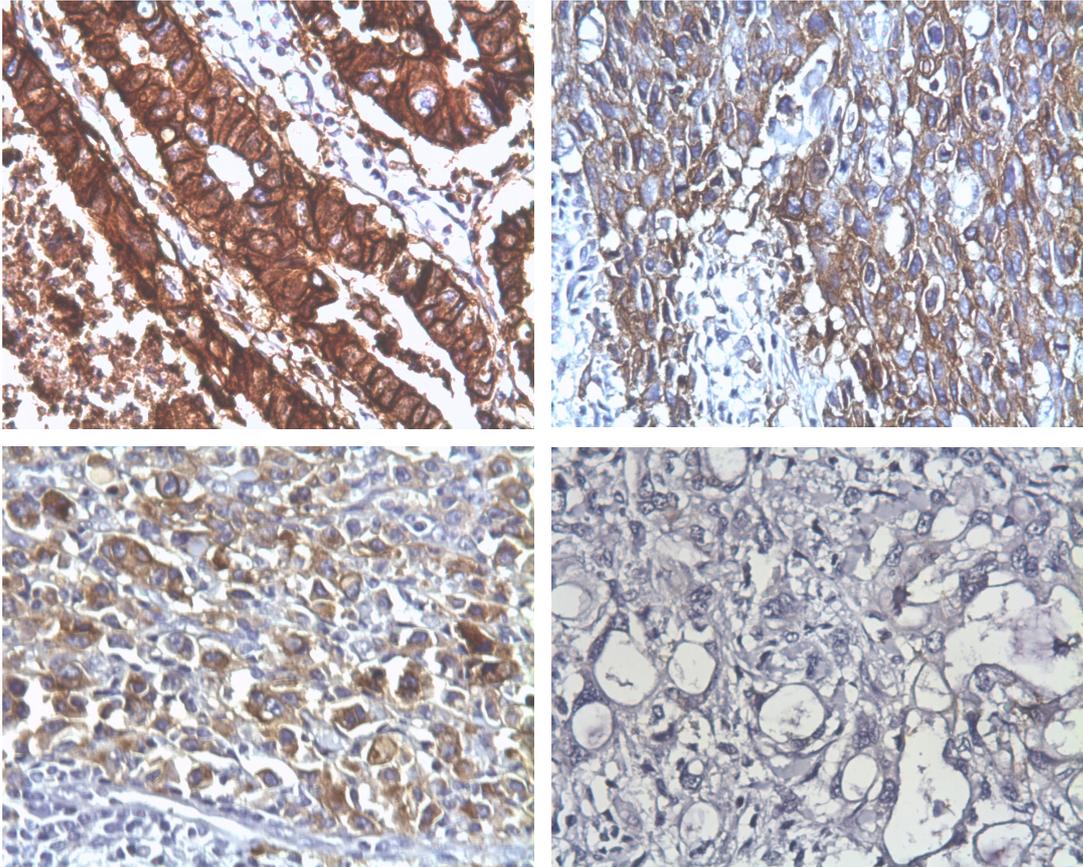


Abbildung 8: Beispiele für eine 3+- (oben links), 2+- (oben rechts), 1+- (unten links) und 0-Expression (unten rechts) Klassifikation nach dem HercepTest™.

Die Färbungen wurden ebenfalls mit Hilfe des Immunreaktiven Score (IRS), auch Remmele-Score genannt, kategorisiert. Diese Auswertungsmethode umfasst eine Expressionsskala von 0 bis 12. Der Immunreaktive Score wurde auch bereits von Gastl et al. in Bezug auf die EpCAM-Expression bei Brustkrebs verwendet [61]. Hiermit sollte versucht werden, eine eventuell noch feinere Aussage zu erhalten, um keine in unseren Färbedaten erhaltenen Informationen außer Acht zu lassen.

Bei dieser Auswertungsmethode ergibt sich der totale Auswertungsscore aus dem Produkt von Proportions-Score und Intensitäts-Score der angefärbten Tumorzellen. Der Proportionsscore gibt dabei den geschätzten Anteil der positiven Tumorzellen an, der Intensitätsscore die geschätzte Färbungsintensität (Tabelle 9).

Proportionsscore:

Intensitätsscore:

	Positive Tumorzellen in Prozent			Intensität der gefärbten Tumorzellen
0	Keine Färbung		0	Keine Färbung
1	< 10 Prozent		1	Schwache Färbung
2	10 bis 50 Prozent		2	Moderate Färbung
3	50 bis 80 Prozent		3	Starke Färbung
4	> 80 Prozent			

Tabelle 9: Auswertung auf einer Expressionsskala von 0 bis 12 nach dem IRS.

Aus dem Produkt ergibt sich ein absoluter Wert von 0 bis 12. Von einer Überexpression spricht man ab einem Wert von größer 4.

Die Auswertungen wurden unabhängig von zwei Personen durchgeführt. In 97% der Fälle kam es dabei zur Übereinstimmung. In den restlichen 3% der Fälle wurden die Proben noch einmal zusammen angeschaut und ein Konsens hergestellt.

2.6 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde das Statistikprogramm SPSS 16.0 eingesetzt.

2.6.1 Mann-Whitney-Test

Als nichtparametrischen Test haben wir den Mann-Whitney Test eingesetzt. Wir haben damit die vergleichende Analyse der EpCAM-Expression in peripherer und zentraler Tumorzone sowie den Lymphknoten durchgeführt. Nichtparametrische Tests zeichnen sich insgesamt dadurch aus, dass die Werte keiner normalverteilten Grundgesamtheit angehören müssen wie es zum

Beispiel für den T-Test notwendig ist. Der Mann-Whitney-Test zeigt, ob zwei unabhängige Stichproben derselben Grundgesamtheit entstammen. Letztendlich wird eine Signifikanz für die Nullhypothese berechnet. Als signifikant werten wir einen p-Wert von $\leq 0,05$. Die Nullhypothese, die davon ausgeht, dass die untersuchten Werte einer gleichen Grundgesamtheit angehören, kann somit bestätigt oder zurückgewiesen werden. Von einem Trend wurde bei einem p-Wert zwischen 0,1 und 0,05 ausgegangen.

2.6.2 Chi-Quadrat-Test

Für die statistische Berechnung einer möglichen Signifikanz zwischen der EpCAM-Expression und den histopathologischen Parametern wurde der Chi-Quadrat-Test eingesetzt. Die Nullhypothese geht davon aus, dass kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Variablen besteht. Bei einem p-Wert $\leq 0,05$ kann dies zurückgewiesen werden und man kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass ein Zusammenhang zwischen den Variablen, zum Beispiel der EpCAM-Expression und dem Lymphknotenstatus der Tumore, in dem untersuchten Kollektiv besteht.

2.6.3 Fisher`s exact test:

Dieser statistische Test kalkuliert anhand einer Vierfeldertafel einen Wahrscheinlichkeitswert für die Beziehung zwischen zwei dichotomisierten Variablen. Im Anwendungsgebiet entspricht der Fisher`s exact test dem Chi-Quadrat-Test. Der Chi-Quadrat-Test gibt jedoch nur eine Schätzung des wahren Wahrscheinlichkeitswertes, die bei einer Anzahl von weniger als fünf in einem Feld unsicherer wird. In einem solchen Fall wurde der Fisher`s exact test dem Chi-Quadrat-Test vorgezogen.

2.6.4 Kaplan-Meier-Methode und Log-Rang-Test

Die Überlebenszeit wurde im Hinblick auf Unterschiede bei der EpCAM-Expression sowie der histopathologischen Parameter miteinander verglichen. Es wurde zu diesem Zweck die Kaplan-Meier-Methode eingesetzt. Damit lässt sich die Wahrscheinlichkeit berechnen, mit welcher der Tod von Patienten bis zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt. Charakteristisch für die Überlebenszeitanalyse ist, dass zu Beginn der Studie unbekannt ist, wann ein bestimmtes Ereignis eintritt. In unserer Arbeit stellte der Tod der Tumorpatienten das untersuchte Ereignis dar. Es kann zu einer zensierten Beobachtung kommen, wenn das Ereignis bis zum Ende der Beobachtung nicht eingetreten ist. Aus der Kaplan-Meier-Kurve lassen sich die Überlebensraten sowie die Überlebenszeit ablesen.

Für die Überlebensanalysen wurden zunächst alle Variablen dichotomisiert. Dichotomie bedeutet dabei die Aufteilung der Variablen in zwei Mengen, die nicht miteinander vereinbar bzw. entgegengesetzt sind. Bei der Tumorgroße wurden die Gruppen pT1-2 und die Gruppen pT3-4 zusammengefasst, d.h. die kleineren Tumoren wurden mit den größeren verglichen. Die N-Kategorie wurde in die Gruppen pN0 und pN1-3 eingeteilt, sodass man die nichtmetastasierten Tumore den Tumoren mit Lymphknotenmetastasen gegenüberstellt. In Bezug auf den Differenzierungsgrad wurden G1 und G2 (low-grade) zusammengefasst und mit der Gruppe G3 und G4 (high-grade) verglichen.

Zur Berechnung der Signifikanz haben wir über die Kaplan-Meier-Kurve hinaus den Log-Rang-Test eingesetzt. Der Log-Rang-Test gehört zu den nichtparametrischen Verfahren und wird standardmäßig in der Überlebensanalyse für Gruppenvergleiche eingesetzt. Es wird damit in Bezug auf die EpCAM-Expression und die histopathologischen Parameter statistisch überprüft, ob sich das Mortalitätsrisiko in zwei Gruppen unterscheidet.

In die Überlebensanalyse konnten 72 der 98 Patienten (73%) einbezogen werden. Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Fernmetastasen

aufwiesen (n=10) sowie Patienten, die innerhalb von drei Monaten nach Operation starben (n=12) oder bei denen keine Follow-up-Daten vorhanden waren (n=4), konnten in der Analyse nicht berücksichtigt werden. Unter diesen Patienten befanden sich auch die vier Patienten, für die keine histopathologischen Daten verfügbar waren.

Zur Erhebung der postoperativen Entwicklung wurden von den Patienten Daten zum Verlauf der Krankheit erhoben und in halbjährlichen Abständen über Kontaktierung der weiterbehandelnden Ärzte aktualisiert. Es wurden hierbei Daten zum postoperativen Krankheitsverlauf mit Zeitpunkt und Lokalisation von Rezidiven und Metastasen sowie ggf. der Sterbefall mit Zeitpunkt des Todes dokumentiert. Die mediane Nachbeobachtungszeit der 72 Patienten betrug 32 Monate, wobei die Werte hier innerhalb des Patientengutes stark schwankten. Es zeigte sich eine Standardabweichung von 32 Monaten. Dabei waren für jeden der Patienten Daten zum klinischen postoperativen Verlauf über mindestens drei Monate vorhanden.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der TMA-Herstellung

Die Zuverlässigkeit der Stanzmethode zeigte sich in der Anzahl der Stanzen, die das gewünschte, zuvor markierte Tumorgewebe enthielten.

Bei einer Anzahl von zunächst 99 Patienten und einer zweifachen Gewebeentnahme aus Tumorzentrum und Peripherie ergab sich eine zu stanzende Anzahl von 396 Proben. In 22 Fällen (15 Proben aus der Peripherie, 7 Proben aus dem Tumorzentrum) konnten Stanzen aufgrund von Gewebemangel nicht entnommen werden. Dies entsprach 6% aller Gewebestanzen. Als Folge des Mangels an Tumorgewebe konnte ein Patient nicht für die Auswertung berücksichtigt werden, sodass sich für die vorliegende Arbeit letztendlich eine Zahl von 98 Patienten ergab. Weiterhin zeigte sich bei der Auswertung, dass von den gestanzten 377 Proben in 95% das gewünschte, vorher auf einem HE-Schnitt markierte, Tumorgewebe in den Stanzen enthalten war. Lediglich in 5% (19 Fälle) zeigte sich in der Stanze kein Tumorgewebe. Die 19 Fälle entfielen mit 15 Proben zum größten Teil auf die Peripherie. Gewebe aus dem Tumorzentrum war nur in 4 Fällen nicht in der Stanze enthalten.

Betrachtet man die Probenentnahme aus dem gesunden Plattenepithel, so war in 26 von 26 Fällen (100%) das gewünschte Gewebe enthalten.

3.2 Analyse der Expression von EpCAM

3.2.1 Analyse der EpCAM-Expression im gesunden Gewebe

3.2.1.1 Analyse der EpCAM-Expression im Plattenepithel des Ösophagus

Insgesamt konnten 26 Stenzen mit intakter Ösophagusschleimhaut hinsichtlich der EpCAM-Expression ausgewertet werden. Hierbei zeigte das gesunde Plattenepithel der Ösophagusschleimhaut keine EpCAM-Expression (Abbildung 9). Dieser Befund deckt sich mit Daten anderer Arbeitsgruppen [73].

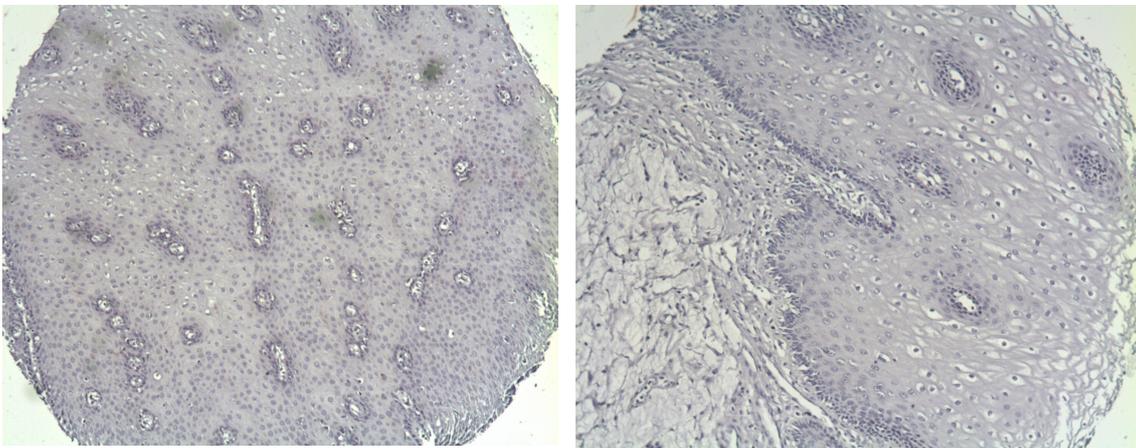


Abbildung 9: Beispiele für fehlende EpCAM-Expression im Normalepithel nach Immunhistochemie, 100-fache Vergrößerung.

3.2.1.2 Analyse der EpCAM-Expression in der gesunden Magenmucosa

Aufgrund der räumlichen Nähe zum Ösophagus und um die EpCAM-Expression bei Kardia-Karzinomen besser einordnen zu können, haben wir zehn Proben gesunder Magenmucosa in die Untersuchungen einbezogen. Wie bereits vorher das Plattenepithel des Ösophagus, zeigte auch die gesunde Magenmucosa keine EpCAM-Expression. Eine positive EpCAM-Expression war dagegen in allen Bereichen einer intestinalen Metaplasie mit Becherzellen nachweisbar (Abbildung 10).

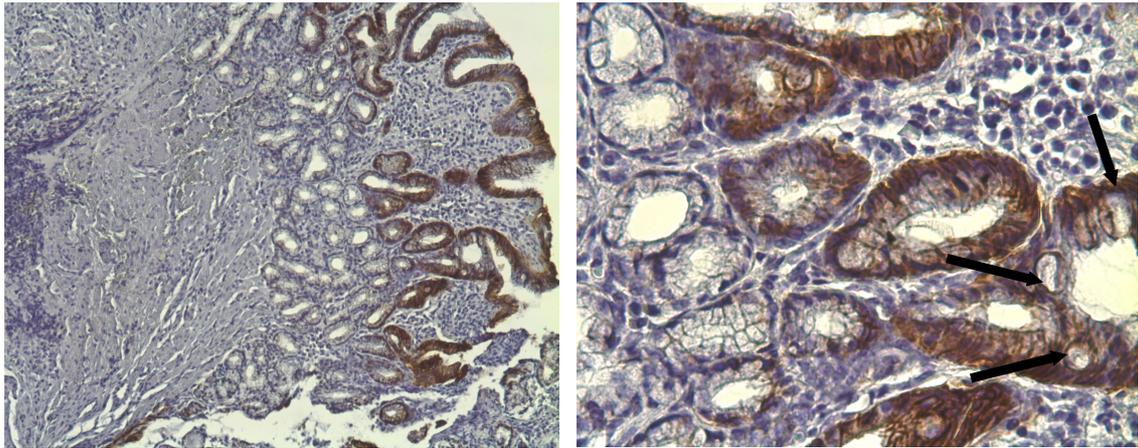


Abbildung 10: Beispiel für positive EpCAM-Expression in Bereichen der Intestinalen Metaplasie, 100-fache (links) und 400-fache (rechts) Vergrößerung, die Pfeile zeigen Becherzellen.

3.2.2 Analyse der EpCAM-Expression im Karzinom

3.2.2.1 Analyse der EpCAM-Expression nach HercepTest™

Zunächst wurde die immunhistochemische Färbung der EpCAM-Expression im Karzinom mittels des Scoringsystems des HercepTests™ klassifiziert (Abbildung 11).

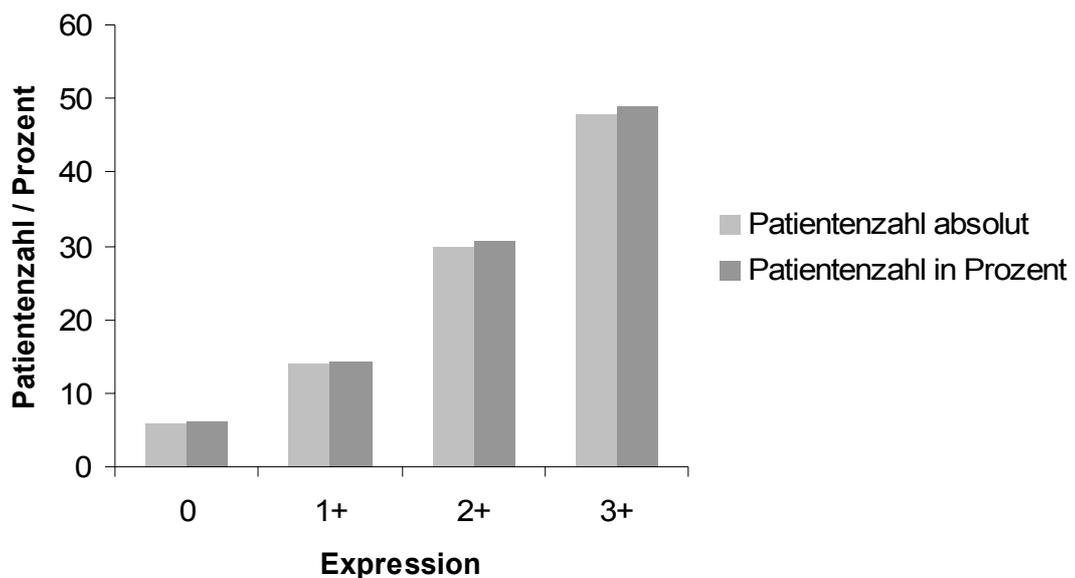


Abbildung 11: EpCAM-Expression im Tumorgewebe nach der Hercep-Klassifikation.

Bei sechs Proben (6%) war keine EpCAM-Expression nachweisbar, während 14 Proben (14%) eine 1+-Expression, sowie 30 Gewebeproben (31%) eine 2+-Expression aufwiesen (Abbildungen 12-15). Bei 48 Patienten (49%) wurde die EpCAM-Färbung in den Tumoren mit 3+ bewertet.

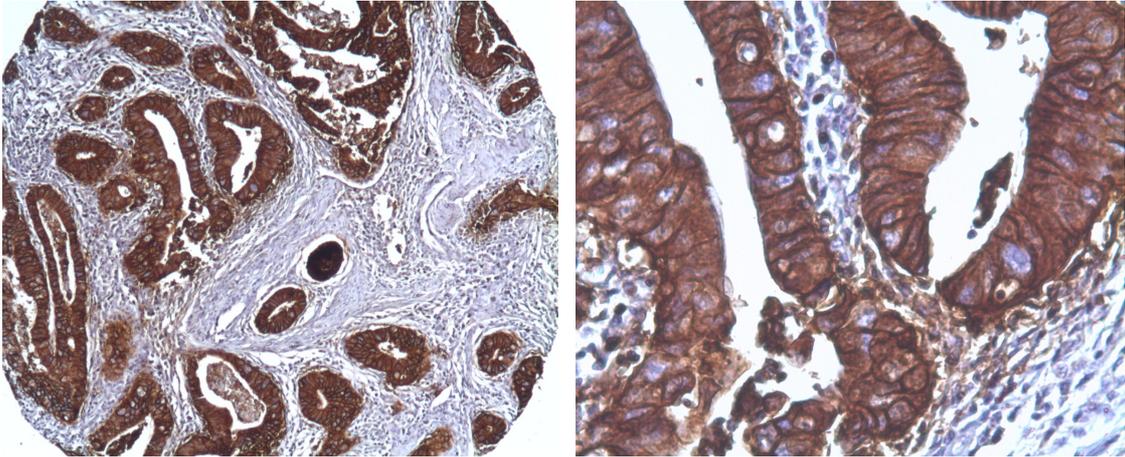


Abbildung 12: Beispiel für 3+-EpCAM-Expression im Tumor in 100-facher (links) und 400-facher (rechts) Vergrößerung.

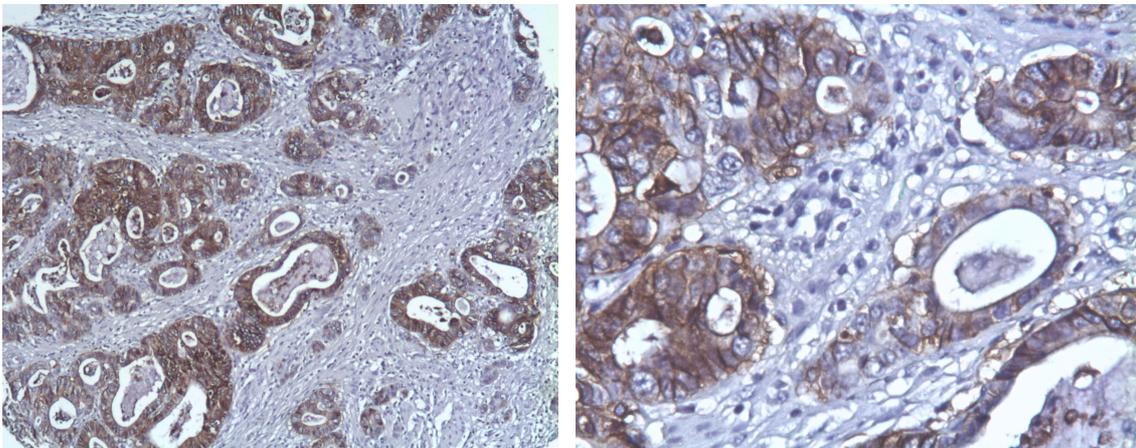


Abbildung 13: Beispiel für eine 2+-EpCAM-Expression im Tumor in 100-facher (links) und 400-facher (rechts) Vergrößerung.

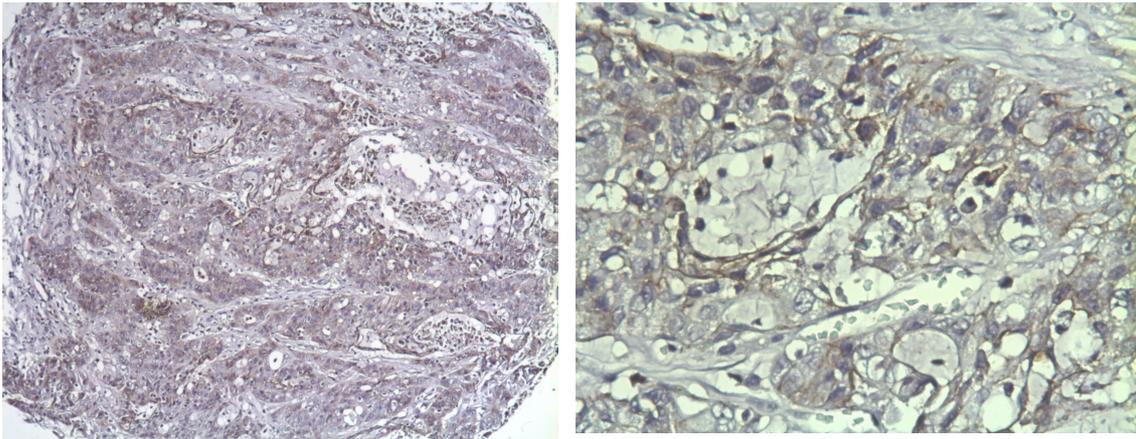


Abbildung 14: Beispiel für eine 1+-EpCAM-Expression im Tumor in 100-facher (links) und 400-facher (rechts) Vergrößerung.

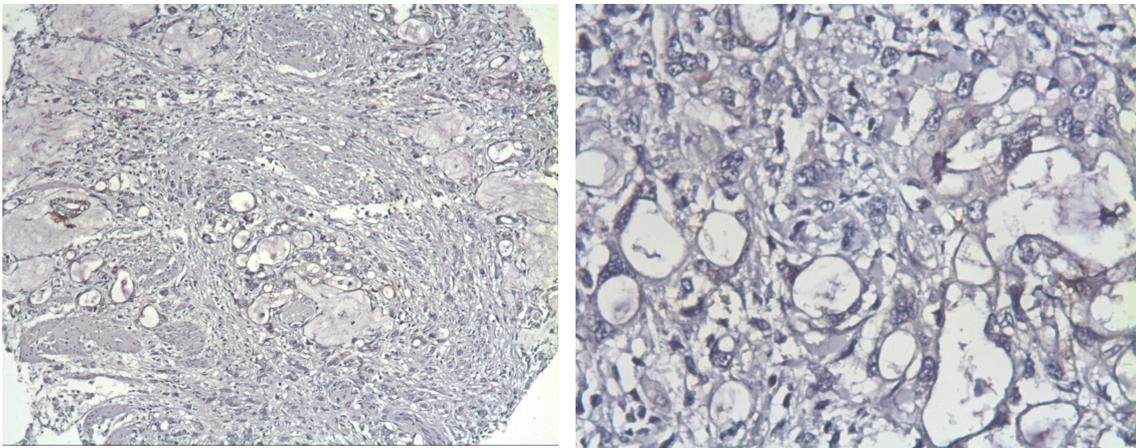


Abbildung 15: Beispiel für eine fehlende EpCAM-Expression im Tumorgewebe bei 100-facher (links) und 400-facher (rechts) Vergrößerung.

3.2.2.2 Analyse der EpCAM-Expression nach Immunreaktivem Score (IRS)

Um die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung noch einmal feiner zu klassifizieren, wurde zusätzlich der Immunreaktive Score eingesetzt. Dieser umfasst eine Skala von null bis zwölf.

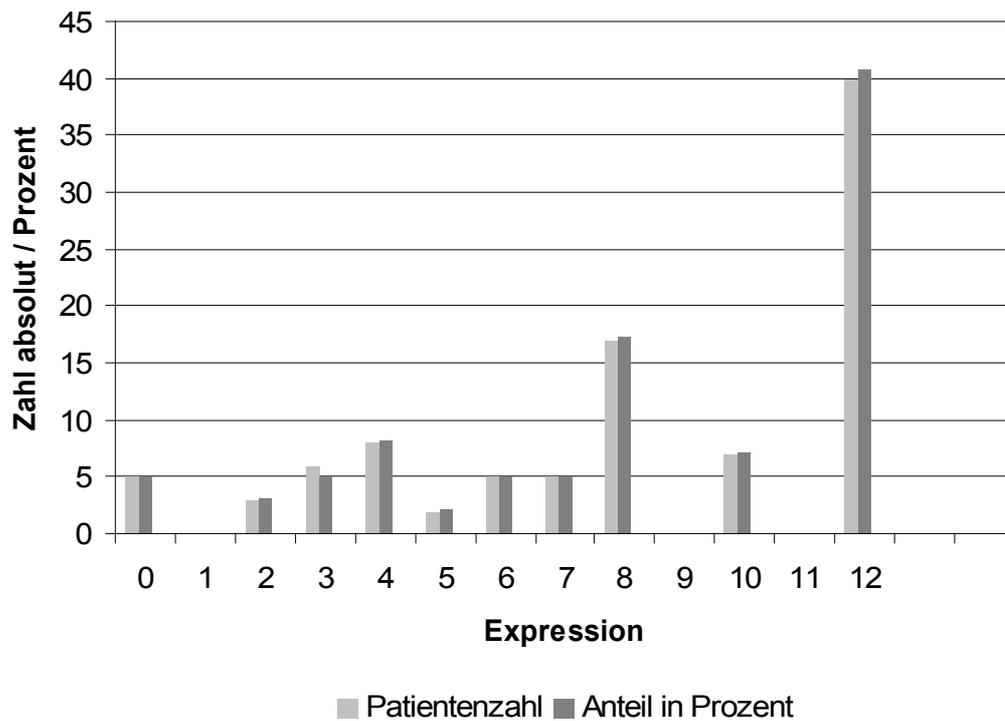


Abbildung 16: EpCAM-Expression im Tumorgewebe nach dem Immunreaktiven Score.

Mit 41% (n=40) ergab sich ein hoher Prozentsatz, der eine starke EpCAM-Expression (IRS=12) aufwies (Abbildung 16). Der Mittelwert der Expressionsstärken lag bei 8,34 ($\pm 3,8$).

3.2.2.3 Analyse der Expression von EpCAM in Verbindung mit Lymphozyteninfiltraten

Da in der Literatur eine Beziehung zwischen EpCAM und einer entzündlich bedingten Lymphozyteninfiltration beschrieben wurde [84], haben wir auch im Hinblick auf diesen Aspekt die Tumورproben untersucht. In nur zwei der von uns analysierten Proben konnten wir eine solche starke Lymphozyteninfiltration feststellen. In beiden Gewebeproben fand sich interessanterweise ebenfalls eine starke EpCAM-Expression (3+) (Abbildung 17). Bei dieser Untersuchung ist die sehr geringe Anzahl der Proben mit starker Lymphozyteninfiltration zu beachten.

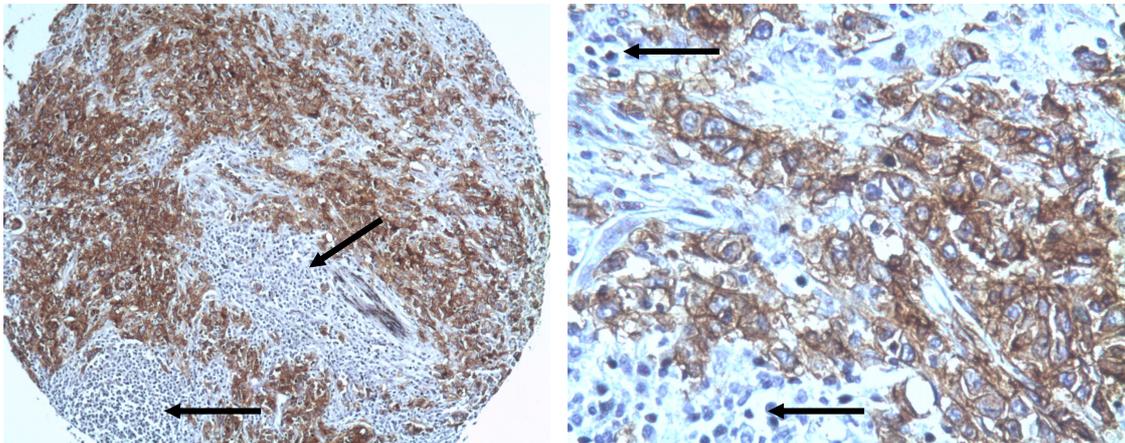


Abbildung 17: Beispiel für starke EpCAM-Expression (3+) neben starker Lymphozyteninfiltration, 100-fache (links) und 400-fache (rechts) Vergrößerung, Pfeile zeigen Stellen mit Lymphozyteninfiltrat.

3.2.2.4 Vergleichende Analyse zwischen peripheren und zentralen Tumoranteilen

Nachdem wir bisher die Gesamtheit des Tumors betrachteten, interessierte uns nun ob die EpCAM-Expression zwischen Tumorzentrum und Bereich der Tumorinvasion unterschiedlich ist.

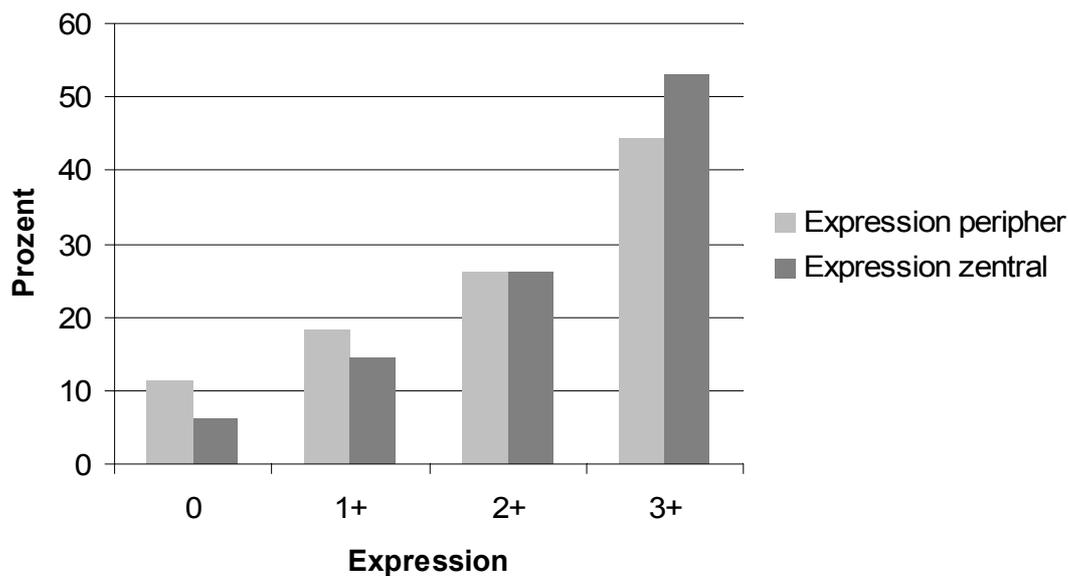


Abbildung 18: EpCAM-Expression in peripherer und zentraler Tumorzone.

Die getrennte Auswertung der peripheren und zentralen Tumorareale nach dem HercepTest™ zeigte eine insgesamt schwächere Expression von EpCAM im Bereich der Invasionsfront. Die peripheren Gewebeproben waren häufiger als die Proben aus dem zentralen Tumorbereich einer negativen EpCAM-Expression oder einer 1+-Expression zuzuordnen. Im Bereich der 3+-Expression waren die zentralen Gewebeproben stärker vertreten (Abbildung 18).

Nach dem Immunreaktiven Score zeigte sich in den peripheren Tumoranteilen ein Mittelwert der EpCAM-Expression von 7,74 ($\pm 4,5$), während sich zentral mit 8,79 (± 4) eine höhere mittlere EpCAM-Expression ergab (Abbildung 19).

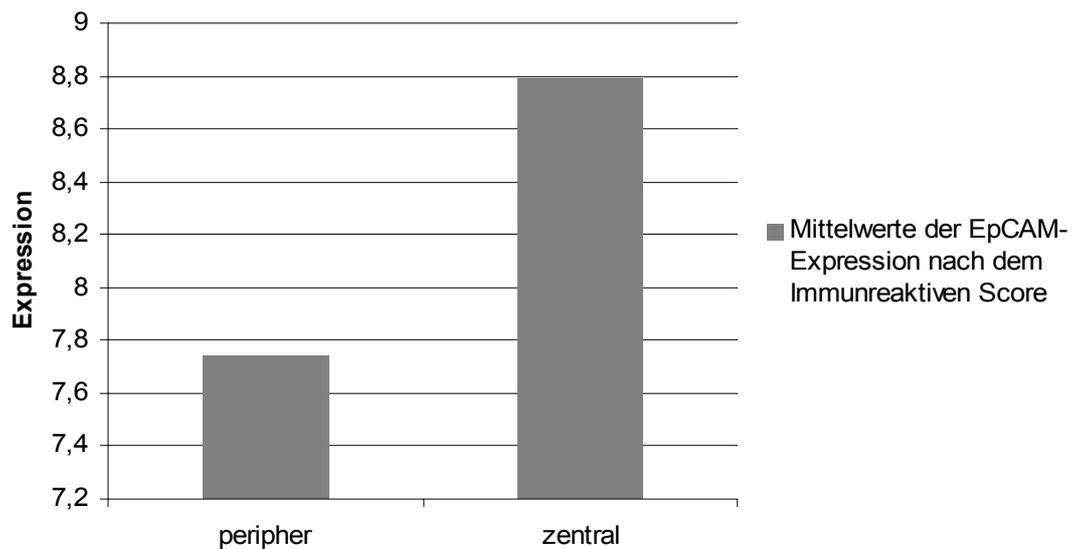


Abbildung 19: Mittelwerte der EpCAM-Expression nach dem Immunreaktiven Score.

In 88 der untersuchten Fälle waren sowohl Proben von peripheren wie auch zentralen Tumorarealen vorhanden, sodass diese direkt miteinander verglichen werden konnten. In 75% dieser Tumore (n=66) war die Stärke der EpCAM-Expression in peripherem und zentralem Tumorgewebe nicht unterschiedlich. In den restlichen 22 Fällen (25%) zeigte sich eine niedrigere Expression im peripheren Anteil (Abbildung 20). Der Unterschied zwischen der EpCAM-Expression der peripheren und zentralen Tumorzone war jedoch nicht statistisch signifikant.

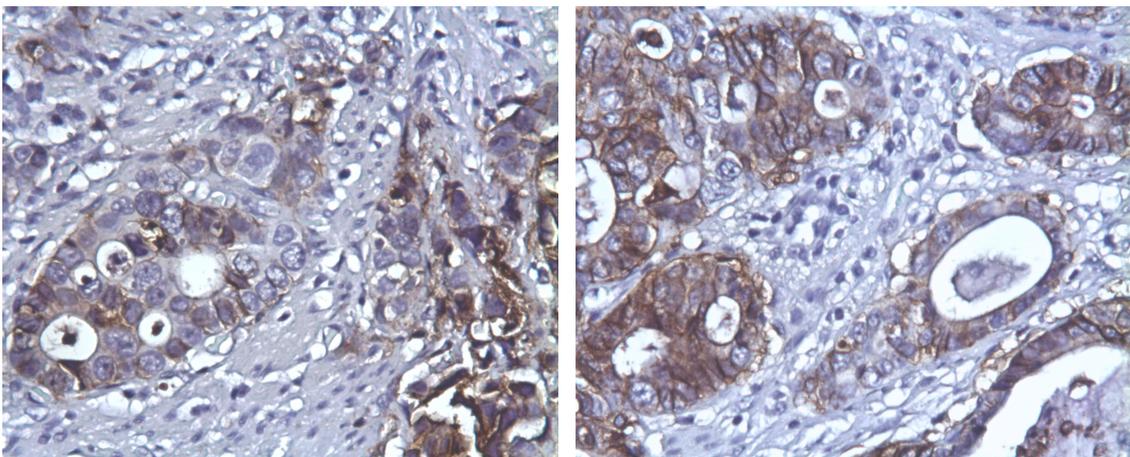


Abbildung 20: Beispiel für unterschiedliche EpCAM-Expression in peripherer (links, 1+) und zentraler (rechts, 2+) Tumorzone bei 400-facher Vergrößerung.

3.3 Korrelation der EpCAM-Expression mit den histopathologischen Parametern

Wir konnten bereits zeigen, dass EpCAM bei einem Großteil der Tumore (n=92, 94%) exprimiert ist. Es stellte sich nun die Frage, ob die Stärke der Expression mit den histopathologischen Parametern der Tumore in direktem Zusammenhang steht. Dazu haben wir die EpCAM-Expression mit der T- und N-Kategorie sowie dem Differenzierungsgrad verglichen. Vier der 98 Patienten konnten aufgrund fehlender Daten zur T- und N-Kategorie sowie dem Differenzierungsgrad nicht berücksichtigt werden, sodass die Berechnungen mit 94 Patienten durchgeführt wurden.

Entsprechend unserer Vorarbeiten [70] haben wir die Proben mit einer starken EpCAM-Expression (3+) getrennt von den Expressionen 0, 1+ und 2+ betrachtet. Die histopathologischen Daten wurden ebenfalls dichotomisiert (Tabelle 10).

Es ergab sich ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen der EpCAM-Expression und der N-Kategorie ($p < 0,001$, Chi-Quadrat-Test) sowie ein signifikanter Zusammenhang zwischen der EpCAM-Expression und dem Differenzierungsgrad ($p = 0,009$, Chi-Quadrat-Test). Im Stadium pN0 und dem Differenzierungsgrad G1/G2 kam eine starke EpCAM-Expression (3+) weitaus häufiger vor als im Stadium pN1 bis pN3 sowie dem Differenzierungsgrad G3 und G4 (Tabelle 10). Es zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der T-Kategorie und der EpCAM-Expression ($p = 0,967$, Chi-Quadrat-Test).

		<u>EpCAM-Expression</u>		<u>Signifikanz</u>
		<u>0/1+/2+</u>	<u>3+</u>	
<u>N-Kategorie</u>	pN0	7 (24%)	22 (76%)	< 0,001
	pN1/N2/N3	40 (62%)	25 (38%)	
<u>Differenzierungsgrad</u>	G1/G2	7 (28%)	18 (72%)	0,009
	G3/G4	40 (58%)	29 (42%)	

Tabelle 10: Korrelation der EpCAM-Expression mit histopathologischen Parametern.

3.4 Überlebensanalyse

Mittels Kaplan-Meier-Überlebensanalyse und Log-Rang-Test haben wir den Einfluss der EpCAM-Expression, der T-Kategorie, der N-Kategorie und des Differenzierungsgrades auf das Gesamtüberleben getestet.

In die Analyse wurden 72 Patienten einbezogen, deren Überlebenszeit nach der operativen Tumorentfernung länger als 3 Monate betrug. Dies lässt sich dadurch begründen, dass bei einer Überlebenszeit unter 3 Monaten nach Operation die Wahrscheinlichkeit sehr hoch ist, dass die Patienten nicht an den direkten Folgen der Tumorerkrankung verstorben sind.

Bei der Überlebensanalyse zeigte sich eine signifikante Beziehung zwischen einer längeren Gesamtüberlebenszeit und einer stark positiven EpCAM-Expression ($p=0,042$, Log-Rang-Test) sowie zwischen einer längeren Gesamtüberlebenszeit und einer Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen ($p=0,027$, Log-Rang-Test). Die T-Kategorie und der Differenzierungsgrad hatten dagegen keine prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben.

3.4.1 Überleben in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression

Eine signifikant längere Überlebenszeit in Bezug auf die EpCAM-Expression zeigte sich, wenn man die Patienten mit einer moderaten (2+) und starken EpCAM-Expression (3+) den Patienten mit einer schwachen (1+) oder fehlenden Expression (0) gegenüberstellte. Bei einer 3+- oder 2+-Expression von EpCAM ergab sich eine mediane Überlebenszeit von 43 Monaten, verglichen mit einer medianen Überlebenszeit von 15 Monaten bei einer EpCAM-Expression im Bereich 0 bis 1+. Die Analyse ergab einen statistisch signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von $p=0,042$ (Abbildung 21). Stellte man die Patienten mit starker EpCAM-Expression (3+) allen anderen Patienten gegenüber, zeigte sich keine statistische Signifikanz mehr. Es ergab sich jedoch mit einem Wert von $p=0,063$ ein statistischer Trend (Abbildung 22).

Abbildung 21: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die EpCAM-Expression
(0/1+ versus 2+/3+, Log-Rang-Test: $p=0,042$).

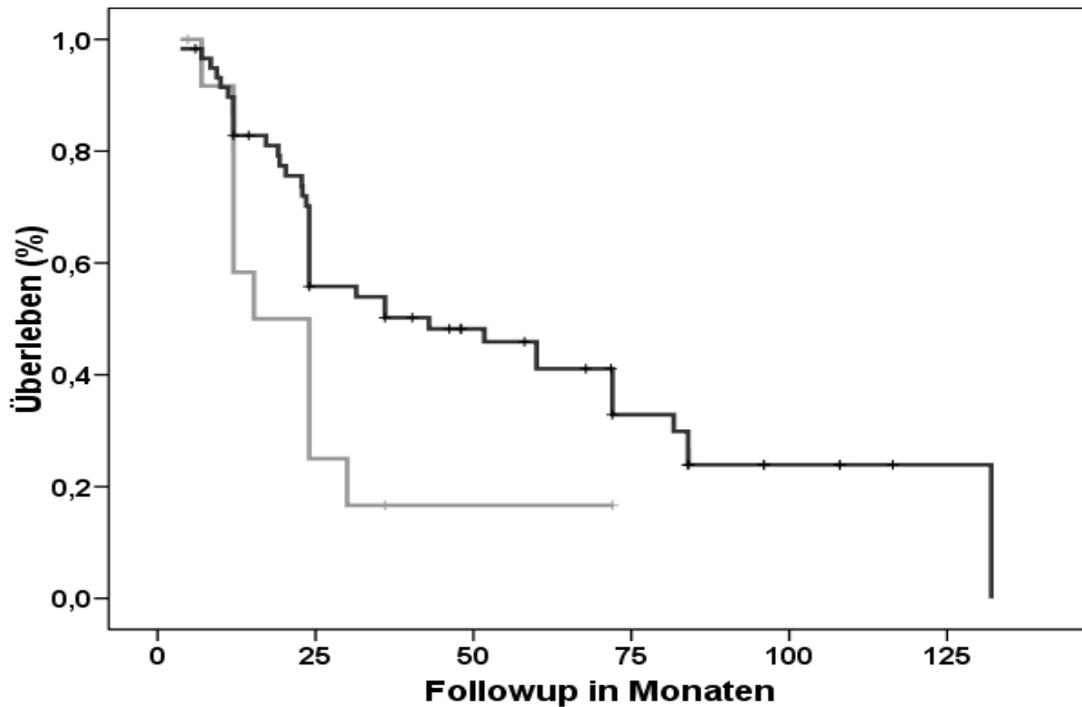
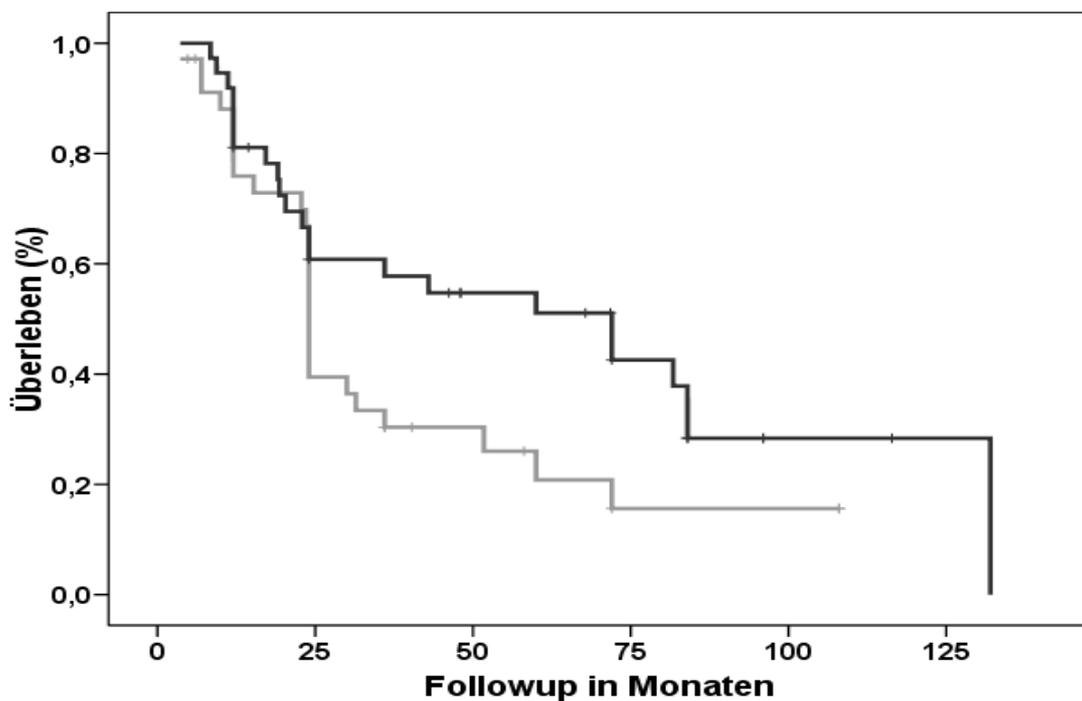


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die EpCAM-Expression
(0/1+/2+ versus 3+, Log-Rang-Test: $p=0,063$).



3.4.2 Überleben in Abhängigkeit von der T-Kategorie

Verglich man die früheren Tumorstadien mit geringeren Invasionsstufen (pT1 und pT2) mit den fortgeschritteneren Stadien pT3 und pT4 zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0,435$, Log-Rang-Test). In den Tumorstadien pT1 und pT2 zeigte sich zwar mit 43 Monaten im Vergleich zu 24 Monaten in den Stadien pT3 und pT4 ein deutlich höheres medianes Überleben. Jedoch fand sich hier auch eine hohe Standardabweichung von 19 Monaten und dass der Unterschied nicht statistisch signifikant war.

3.4.3 Überleben in Abhängigkeit von der N-Kategorie

Verglich man Tumore ohne Lymphknotenmetastasen mit den Tumoren, die bereits Metastasen aufwiesen, zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil bei Tumoren der Kategorie pN0. Bei bereits metastasierten Tumoren zeigte sich ein medianes Überleben nach Operation von 24 Monaten. Trotz einer hohen Standardabweichung (17 Monate) zeigte sich mit 72 Monaten ein signifikant besseres medianes Überleben bei Tumoren ohne Metastasen ($p=0,0266$, Log-Rang-Test).

3.4.4 Überleben in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad

Beim Vergleich von gut und mittel differenzierten Tumoren (G1/G2) mit schlecht differenzierten oder anaplastischen Tumoren (G3/G4) ergab sich keine Signifikanz ($p=0,2103$, Log-Rang-Test) bezüglich des Überlebens. Bei den Tumoren mit den Differenzierungsgraden G1 und G2 zeigte sich zwar mit 84 Monaten eine vergleichsweise sehr lange Überlebenszeit, hier fiel jedoch eine hohe Standardabweichung (46 Monate) auf.

3.5 EpCAM-Expression in der Progression des Adenokarzinoms

3.5.1 Analyse der EpCAM-Expression im Barrett-Epithel

Es ist wichtig festzuhalten, dass sich das Adenokarzinom des Ösophagus im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom nicht direkt aus dem gesunden Plattenepithel, sondern in fast allen Fällen (mehr als 90%) aus einer Metaplasie mit drüsiger Morphologie, dem Barrett-Epithel, entwickelt [16]. Da bereits in mehreren Studien festgestellt worden ist, dass das Barrett-Epithel EpCAM-positiv ist [72, 73, 85], wollten wir auch mit unserer Methode die EpCAM-Expression überprüfen. Wir haben daher zehn Biopsate mit diagnostisch gesicherter Barrett-Mucosa analysiert. Bei den Barrett-Proben zeigte sich in allen Fällen im Gegensatz zum negativen gesunden Plattenepithel eine starke EpCAM-Expression. Alle Proben wurden nach der Hercep-Klassifikation als 3+ klassifiziert (Abbildung 23).

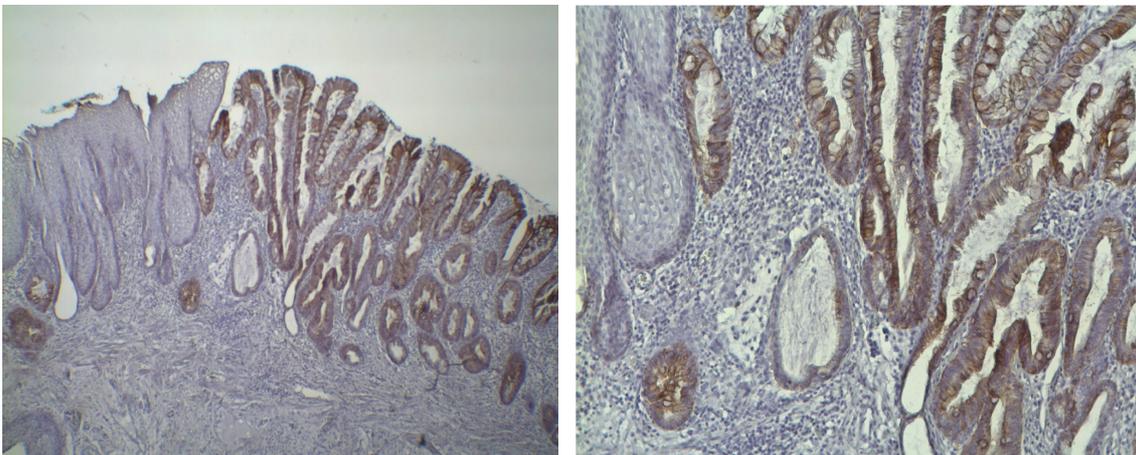


Abbildung 23: Beispiel für die EpCAM-Expression im Übergang Normalepithel zu Barrett in 100-facher (links) und 400-facher (rechts) Vergrößerung.

Jedoch war die EpCAM-Expression nicht homogen. Durchschnittlich wiesen 61% der Zellen im Barrett-Epithel eine 3+-Expression auf.

In der Auswertung nach dem Immunreaktiven Score ergab sich für acht Proben des Barrett-Epithel eine Expression von 12 sowie für zwei Proben eine Expression von 9. Es ergab sich somit ein Mittelwert von 11,4 (± 0).

3.5.2 Analyse der Expression von EpCAM in Lymphknotenmetastasen

Betrachtet man die zentrale und periphere Tumorzone, ist wie auf Seite 46 dargestellt, eine schwächere EpCAM-Expression im peripheren Tumorgebiet feststellbar. Simultan ergab sich für das Adenokarzinom eine inverse Korrelation mit den Lymphknotenmetastasen. Daher haben wir auch die Expression in einigen autologen Lymphknotenmetastasen untersucht.

Bei 13 der 98 Patienten (13%) standen zusätzlich zum Primärtumorgewebe Lymphknotenmetastasen zur Verfügung.

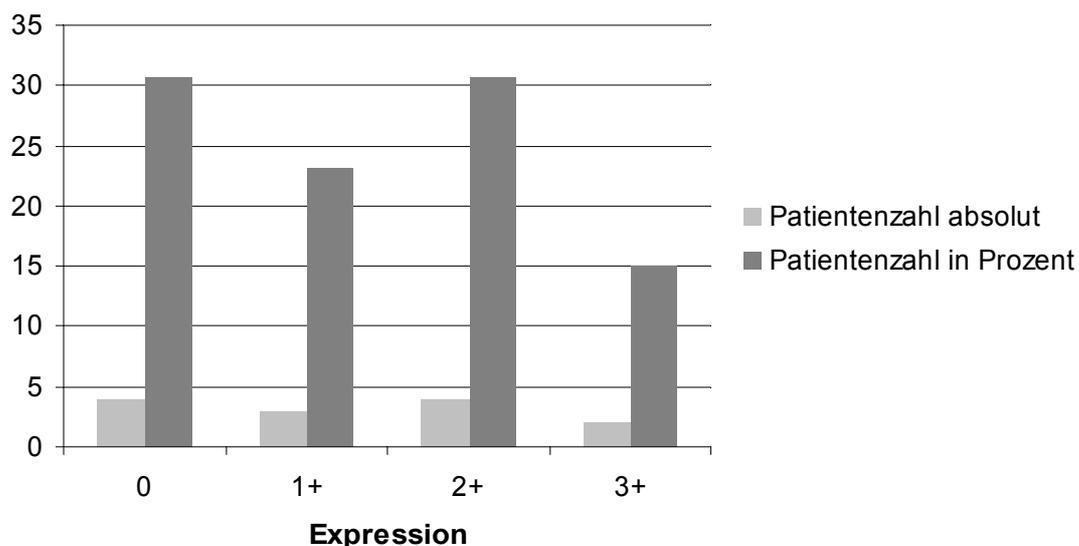


Abbildung 24: EpCAM-Expression in Lymphknotenmetastasen nach der Hercep-Klassifikation.

Die EpCAM-Expression in den Lymphknotenmetastasen war über die vier Auswertungsstufen (0 bis 3+) verteilt (Abbildungen 24 und 25). Die Expression war im Mittel schwächer ausgeprägt als im Tumorgewebe.

Nach dem Immunreaktiven Score zeigte sich ein Mittelwert von 5,33 ($\pm 4,5$).

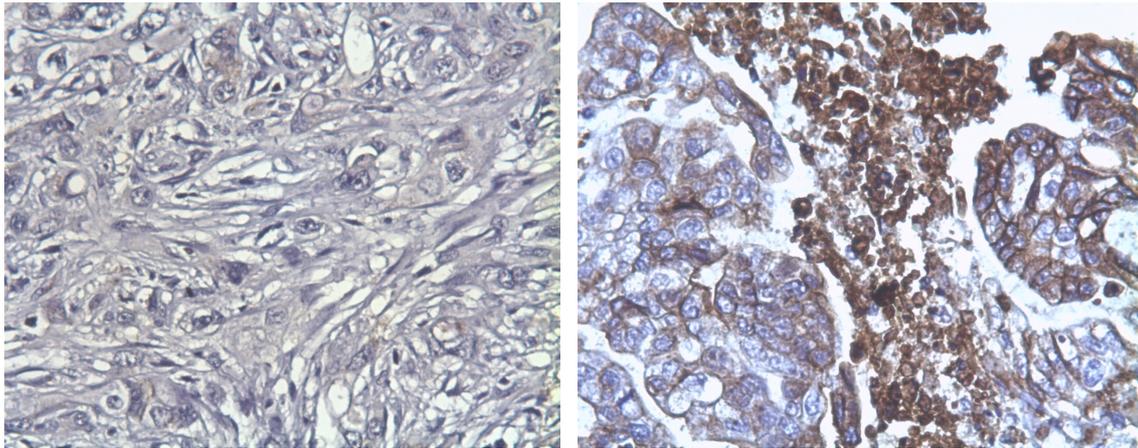


Abbildung 25: Beispiele für eine fehlende (links) und eine 2+-EpCAM-Expression (rechts) in Lymphknotenmetastasen bei 400-facher Vergrößerung.

3.5.3 Vergleichende Analyse zwischen Barrett-Epithel, Tumor und Lymphknotenmetastasen

Die EpCAM-Expression im Barrett-Epithel und den autologen Lymphknotenmetastasen war besonders im Vergleich zur EpCAM-Expression im Tumorgewebe interessant (Abbildung 26).

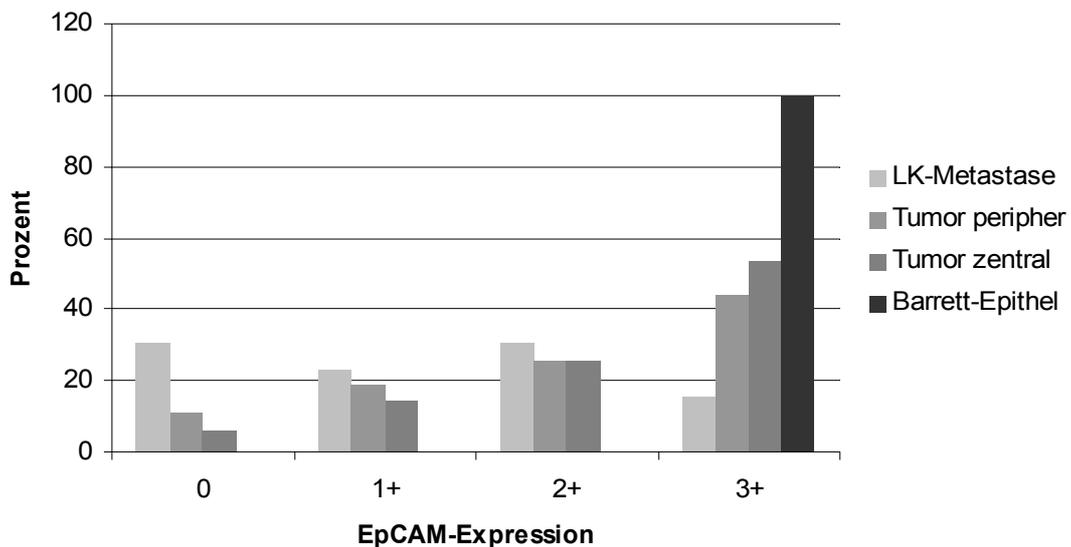


Abbildung 26: Vergleich der EpCAM-Expression von Lymphknotenmetastase, Barrett-Epithel und Tumor nach der Hercep-Klassifikation.

3.5.3.1 Vergleichende Analyse zwischen Tumor und Barrett-Epithel

Wir fanden im Vergleich zum gesunden Plattenepithel bei der Barrett-Metaplasie eine Neuexpression von EpCAM. Vergleich man die EpCAM-Expression im Barrett-Epithel mit der Expression peripherer und zentraler Tumorzonen zeigte sich, dass die EpCAM-Expression im Barrett-Epithel wesentlich stärker war als im Tumorgewebe. Im Barrett-Epithel konnten durchschnittlich 61% der Zellen eines Tumors der EpCAM-Expression 3+ zugeordnet werden. Im Tumor war dies nur bei 25% im peripheren bzw. 31% im zentralen Bereich der Fall.

Verwendete man den Immunreaktiven Score, so zeigte sich im Barrett-Epithel mit einem Mittelwert von 11,4 (± 0) eine höhere EpCAM-Expression im Vergleich zu den zentralen und peripheren Tumoranteilen mit Mittelwerten von 8,79 (± 4) und 7,74 ($\pm 4,5$).

3.5.3.2 Vergleichende Analyse zwischen Tumorgewebe und autologen Lymphknotenmetastasen

Nachdem wir gesundes Epithel und Barrett-Epithel mit dem Karzinom verglichen hatten, interessierte uns der Vergleich mit den autologen Lymphknotenmetastasen. Wir haben die EpCAM-Expression der Lymphknotenmetastasen zum Einen mit der durchschnittlichen Expression aller 98 Adenokarzinomproben verglichen, dann in einer zweiten Untersuchung nur die zu den Lymphknotenmetastasen gehörenden Primärtumore ($n=13$) einbezogen.

3.5.3.2.1 Vergleichende Analyse zwischen Tumorgewebe und autologen Lymphknotenmetastasen unter Einbeziehung aller Primärtumore (n=98)

Abbildung 26 zeigt die EpCAM-Expression in den untersuchten Lymphknotenmetastasen und der zentralen Tumorzone sowie der

Invasionsfront nach der Hercep-Klassifikation. Hier zeigte sich deutlich, dass die EpCAM-Expression in den Lymphknotenmetastasen eher schwächer ausgeprägt oder negativ war, während EpCAM im Primärtumor häufig stark exprimiert wurde (Abbildung 26).

Verwendete man den Immunreaktiven Score (IRS 0 bis 12), so ergab sich mit einem Mittelwert von 5,33 ($\pm 4,5$) in den Lymphknotenmetastasen eine signifikant niedrigere EpCAM-Expression im Vergleich zur EpCAM-Expression der zentralen Tumoranteile mit einer mittleren Expression von 8,79 (± 4) ($p=0,019$, Mann-Whitney-Test). Betrachtete man den Mittelwert von 8,34 ($\pm 3,8$) aus peripherer und zentraler Tumorzone, zeigte sich im Vergleich mit der Expression in den Lymphknotenmetastasen (5,33 ($\pm 4,5$)) eine signifikant höhere Expression ($p=0,046$, Mann-Whitney-Test). In den peripheren Tumoranteilen ergab sich mit einer mittleren Expression von 7,74 ($\pm 4,5$) im Vergleich zur mittleren Expression in den Lymphknotenmetastasen (5,33 ($\pm 4,5$)) kein statistisch signifikanter Unterschied.

Bei der Verteilung der Expressionsstärken in den Gruppen der Lymphknotenmetastasen und der Primärtumore fiel auf, dass im zentralen Tumorbereich mit 52% ($n=51$) signifikant ($p=0,01$, Mann-Whitney-Test) häufiger eine starke EpCAM-Expression (IRS=12) im Vergleich zu den Lymphknotenmetastasen (15%, $n=2$) zu finden war. Analog wurden die Lymphknotenmetastasen mit 31% ($n=4$) signifikant häufiger ($p=0,009$, Mann-Whitney-Test) als EpCAM-negativ (IRS=0) klassifiziert als der zentrale Tumorbereich (5%, $n=5$).

3.5.3.2 Vergleichende Analyse zwischen Tumorgewebe und autologen Lymphknotenmetastasen unter Einbeziehung der zu den Lymphknotenmetastasen gehörenden Primärtumore (n=13)

Für diese Analyse verwendeten wir zunächst die Hercep-Klassifikation. Abbildung 27 zeigt die Verteilung der Expressionsstärken in der Gruppe der autologen Lymphknotenmetastasen ($n=13$) und der dazugehörigen Primärtumore ($n=13$).

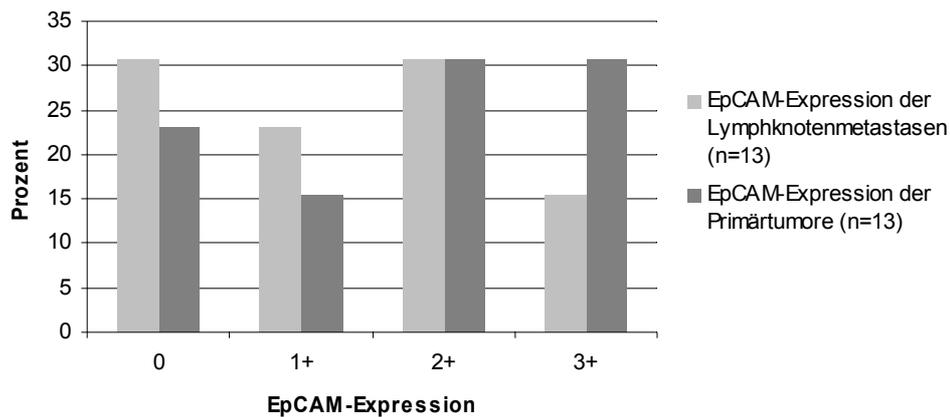


Abbildung 27: Verteilung der Expressionsstärken in der Gruppe der Lymphknotenmetastasen und der dazugehörigen Primärtumore.

Wir haben nun die einzelnen Lymphknotenpräparate mit dem dazugehörigen zentralen und peripheren Tumorgewebe verglichen. Bei Gegenüberstellung der einzelnen Lymphknotenpräparate mit dem zentralen Tumorgewebe zeigte sich in sieben Fällen eine gleiche EpCAM-Expression nach Hercep-Klassifikation. In sechs Fällen war die Expression in den Lymphknotenmetastasen schwächer ausgeprägt. Bei Vergleich der Expression in den Lymphknotenmetastasen mit der Expression in der peripheren Tumorzone zeigte sich, dass nur in drei Proben die EpCAM-Expression im Tumorbereich stärker ausgeprägt war (Abbildung 28).

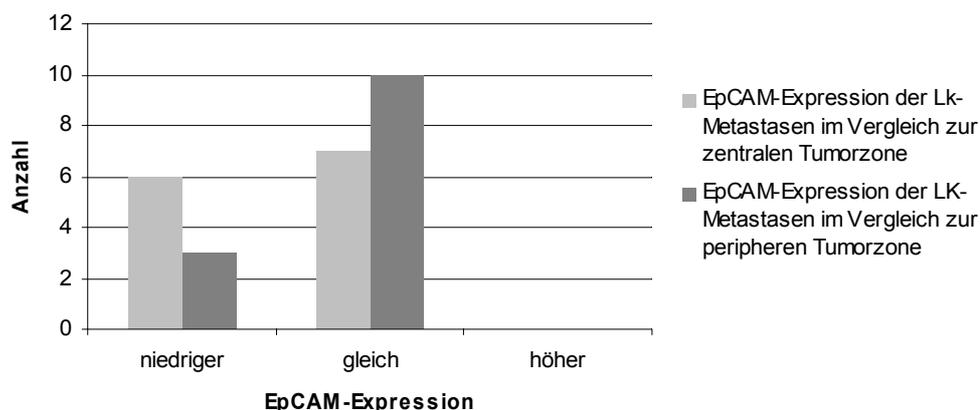


Abbildung 28: EpCAM-Expression in den Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Primärtumor.

Um dies noch einmal genauer zu untersuchen, betrachteten wir, wieviel Prozent der Zellen in den Lymphknotenmetastasen und den Primärtumoren den entsprechenden Expressionsstärke zuzuordnen waren.

Hierbei zeigte sich, dass bei den Lymphknotenmetastasen im Vergleich zur peripheren Tumorzone die EpCAM-Expression in acht Fällen schwächer, jedoch in drei Fällen auch zwischen 10% und 25% stärker war. Im Vergleich zur zentralen Zone zeigten sieben Lymphknotenmetastasen eine, zum Teil, starke Abweichung der Expressionsstärke in den schwächeren Bereich. In vier Fällen war die Expression in den Lymphknotenmetastasen jedoch auch zwischen 10% und 25% stärker als in der zentralen Tumorzone (Abbildung 29).

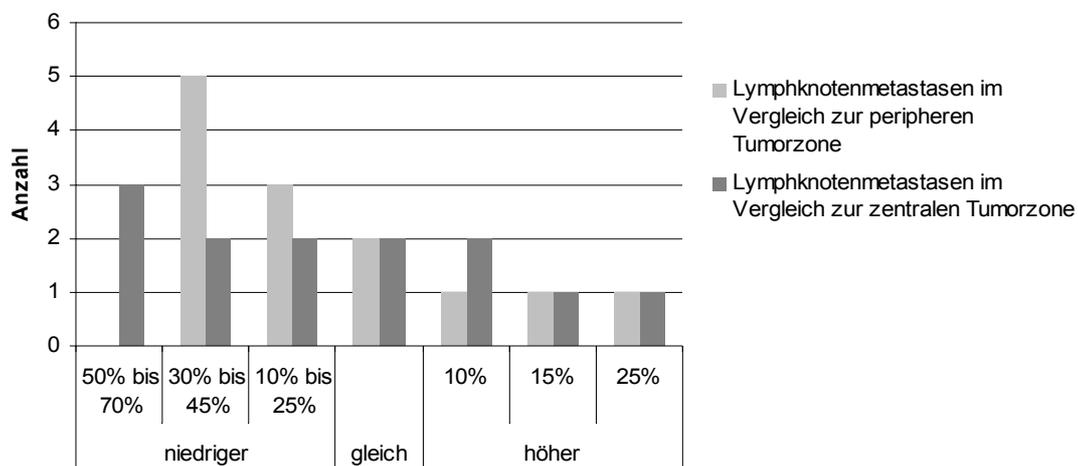


Abbildung 29: EpCAM-Expression im Vergleich zwischen Lymphknotenmetastasen und Tumor.

Nach dem Immunreaktiven Score ergab sich für die Primärtumore (n=13) ein Mittelwert der EpCAM-Expression von 7,15 ($\pm 4,6$). Im Vergleich zur EpCAM-Expression der Lymphknotenmetastasen (5,33 ($\pm 4,5$)) zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Nach genauerer Betrachtung stellte sich das Ergebnis also nicht mehr so deutlich dar wie zu Beginn unter Einbeziehung aller Tumorproben. Dennoch zeigte sich auch hier, dass in den meisten Fällen die EpCAM-Expression in den Lymphknotenmetastasen schwächer als im Primärtumor ausgeprägt war.

3.6 Analyse der Expression von beta-Catenin

Wie in der Einleitung dargestellt, scheint EpCAM nicht nur Funktionen als Adhäsionsmolekül zu haben, sondern auch als Signalgeber. Mehrere Forschungsarbeiten der letzten Zeit beobachteten in diesem Zusammenhang eine Verbindung zum WNT-Signalweg [78, 79]. Um zu testen, ob beim Adenokarzinom des Ösophagus ein Zusammenhang zwischen dem WNT-Signalweg und EpCAM besteht, haben wir die Expression von nukleärem beta-Catenin ermittelt und mit der EpCAM-Expression korreliert. Beta-Catenin stellt die Endstrecke der WNT-Signalkette dar. Eine nukleäre beta-Catenin-Expression könnte Hinweis auf einen aktivierten WNT-Signalweg sein.

3.6.1 Expression von beta-Catenin im gesunden Gewebe

Alle Gewebeproben des gesunden Plattenepithels zeigten eine membranäre beta-Catenin-Expression mit Betonung der basalen Bereiche (Abbildung 30). Ein nukleäres Farbmuster war nicht nachweisbar.

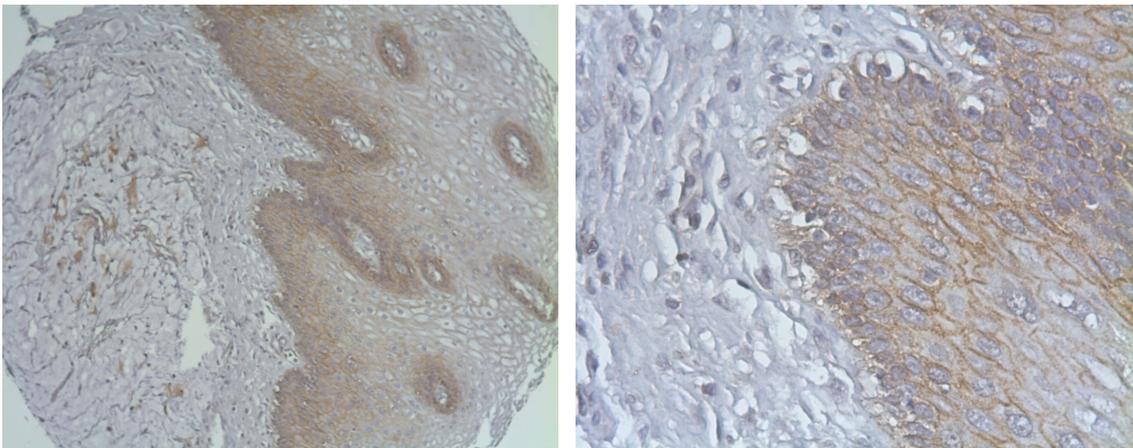


Abbildung 30: 2+-beta-Catenin-Expression im Normalepithel, 100-fache (links) und 400-fache (rechts) Vergrößerung.

3.6.2 Nukleäre Expression von beta-Catenin im Tumorgewebe

Die Auswertung erfolgte nach positiver und negativer Kernfärbung. Die Kernfärbung wurde als negativ gewertet, wenn weder Invasionsfront noch Tumorzentrum gefärbte Kerne aufwies.

Fast zwei Drittel aller Tumorproben (66%, n=65) wiesen keine beta-Catenin-Expression innerhalb der Kerne auf. Bei einem Drittel (34%, n=33) ließ sich ein nukleäres Farbmuster nachweisen (Abbildung 31).

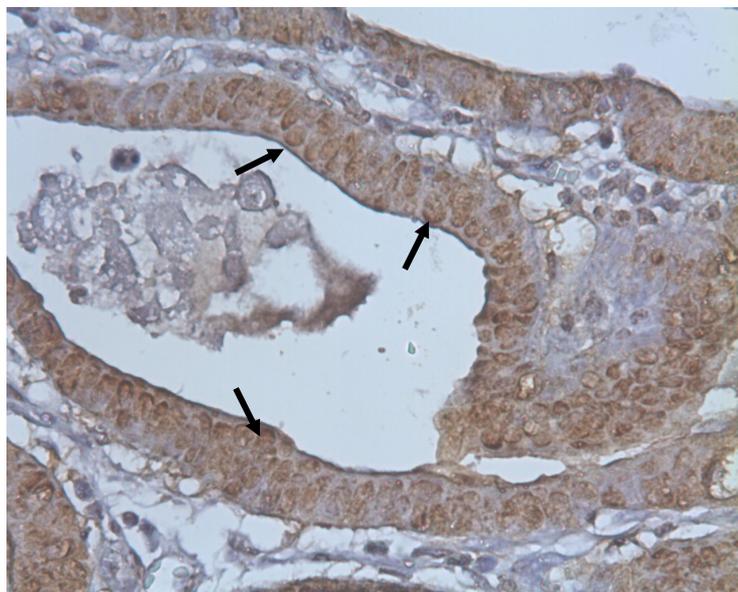


Abbildung 31: beta-Catenin-Kernfärbung, 400-fache Vergrößerung, Pfeile zeigen Beispiele für positiv gefärbte Kerne.

Es zeigte sich dabei, dass der prozentuale Anteil der beta-Catenin-positiven Kerne in der peripheren Tumorzone geringgradig höher war als im zentralen Bereich. Abbildung 32 zeigt den durchschnittlichen Anteil der Kerne eines Tumors mit positiver beta-Catenin-Expression. Zum Einen haben wir dabei alle 98 Tumore einbezogen, zum Anderen nur die 33 Tumore mit nachgewiesener nukleärer beta-Catenin-Kernfärbung (Abbildung 32).

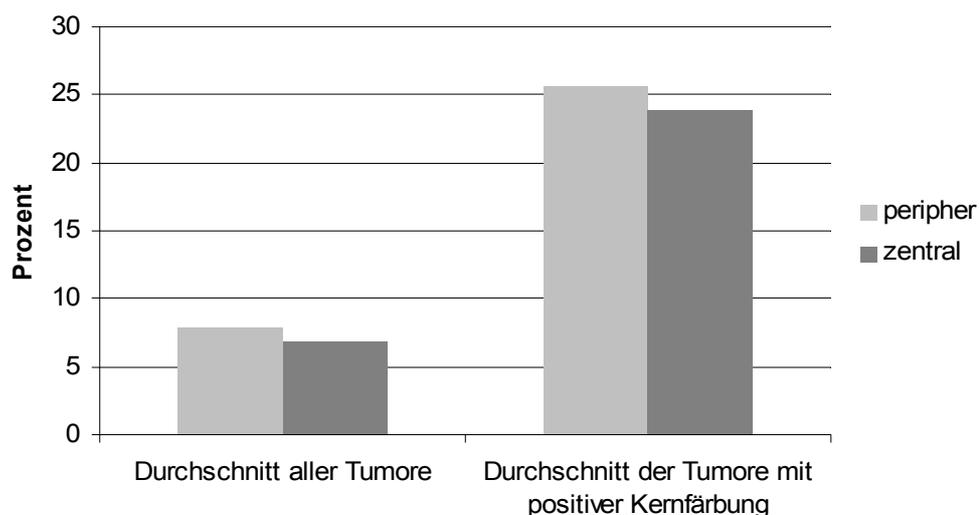


Abbildung 32: Durchschnittlicher Anteil der beta-Catenin-positiven Kerne im Tumor (bei Betrachtung aller 98 Tumore und bei Betrachtung der 33 Tumore mit positiver beta-Catenin-Kernfärbung).

Betrachtete man die beta-Catenin-Kernfärbung in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression der Tumore, zeigte sich, dass die Kernfärbung sowohl bei fehlender als auch bei 1+- bis 3+-Expression auftrat. Korrelierte man nun die beta-Catenin-Kernfärbung mit den dichotomisierten EpCAM-Werten (0 und 1+ sowie 2+ und 3+), zeigte sich, dass Tumore mit einer fehlenden oder 1+-EpCAM-Expression häufiger eine positive beta-Catenin-Kernfärbung aufwiesen als Tumore mit einer 2+-oder 3+-Expression (p=0,089, Chi-Quadrat-Test) (Tabelle 11). Es ergab sich in der Analyse ein statistischer Trend.

		<u>EpCAM-Expression</u>		<u>Signifikanz</u>
		0/1+	2+/3+	
<u>β-Catenin-Kernfärbung</u>	positiv	10 (30%)	23 (70%)	0,089
	negativ	10 (15%)	55 (85%)	

Tabelle 11: Korrelation der EpCAM-Expression im Tumor mit der beta-Catenin-Kernfärbung.

3.7 Analyse der Expression von E-Cadherin

EpCAM scheint laut Literatur bei einigen Tumoren gegensätzlich zu E-Cadherin exprimiert zu sein [82, 86]. Es wurden dabei nähere Hinweise auf eine direkte Verbindung zwischen EpCAM und E-Cadherin nachgewiesen [87]. Aus diesem Grund interessierte uns auch hier die E-Cadherin-Expression im gesunden, sowie im entarteten Ösophagusgewebe.

Im gesunden Plattenepithel zeigte sich eine durchweg moderate E-Cadherin-Expression (2+). In der Literatur ist es üblich, die E-Cadherin-Expression im Tumorgewebe nicht nach der Hercep-Klassifikation einzuteilen, sondern sich an den am stärksten gefärbten Zellen zu orientieren. Wir haben uns in dieser Arbeit an den bereits publizierten Auswertungsskalen orientiert [88]. Ab einer Zellzahl von weniger als 20% im Bereich der starken Expression (3+) gingen wir hier von einer verminderten E-Cadherin-Expression aus. Nach dieser Klassifikation zeigte sich in 96% (n=94) eine Downregulation verglichen mit der Expression im gesunden Plattenepithel. Bei 4% der Tumore (n=4) war eine erhaltene E-Cadherin-Expression nachweisbar.

Die E-Cadherin-Expression war somit im Tumorgewebe wesentlich niedriger als die EpCAM-Expression, ein signifikanter Zusammenhang zur EpCAM-Expression ließ sich in unserer Analyse jedoch nicht nachweisen.

4 Diskussion

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM wird von vielen Karzinomen stark exprimiert. In verschiedenen Studien zeigte sich bei Mamma-, Magen-, Lungen-, Colon- und Nierenzellkarzinomen, dass 85% der Adenokarzinome und 72% der Plattenepithelkarzinome eine starke EpCAM-Expression aufwiesen [89-91].

Bei Adenokarzinomen des Ösophagus wurde die Expression von EpCAM bislang noch nicht untersucht. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die EpCAM-Expression bei dieser Entität zu untersuchen und zu überprüfen, ob dieses Molekül als prognostischer Faktor und als geeignete therapeutische Zielstruktur dienen könnte.

Zur Durchführung der Studie wurde die Tissue Microarray-Methode (TMA) gewählt. Hierfür wurden zunächst aus in Paraffin eingebetteten Geweben der Routinediagnostik TMAs hergestellt. Diese Methode ermöglicht, ein großes Kollektiv unter möglichst einheitlichen Bedingungen zu analysieren. Dies führt zu einer insgesamt guten Vergleichbarkeit der untersuchten Proben untereinander. Darüber hinaus ist diese Methode bei der Anwendung von immunhistochemischen Färbungen im Vergleich schneller und effizienter [78].

Um nun die mögliche Heterogenität der Primärtumore zu berücksichtigen, wurden bei unserem TMA-Design Proben aus unterschiedlichen Zonen des Tumors entnommen. Zur Auswertung kamen dabei jeweils zwei Proben aus der peripheren und zentralen Tumorzone. Die Validität der TMA-Methode wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht [92, 93]. Dabei zeigte sich, dass das Problem der intratumoralen Heterogenität bei Entnahme von mindestens 2 bis 3 Stenzen zu vernachlässigen ist [92]. Da wir auch daran interessiert waren, mögliche Unterschiede zwischen der Invasionszone des Tumors und dem Tumorzentrum aufzudecken, wurden je zwei Stenzen aus diesen beiden Lokalisationen zu gewonnen.

Im Rahmen der Immunhistochemie zur Untersuchung der EpCAM-Expression haben wir uns für den anti-EpCAM-Antikörper Ber-EP4 entschieden. Dieser

monoklonale Antikörper wurde bereits in einer Studie der Arbeitsgruppe für das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus verwendet [70]. Ber-EP4 gehört neben 323/A3 und KS1/4 zu den am häufigsten gegen EpCAM angewendeten Antikörpern [82].

Unsere Ergebnisse zeigten, dass das Adenokarzinom des Ösophagus in 94% der untersuchten Karzinomfälle EpCAM-positiv war. Wir haben die Expression entsprechend des Hercep-Scores in drei Gruppen eingeteilt. In 14% war eine schwache (1+), in 31% eine moderate (2+) und in 49% eine starke EpCAM-Expression (3+) nachweisbar. Lediglich in 6% der Fälle zeigte sich keine Expression von EpCAM. Im Vergleich zu den Ergebnissen bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus zeigte sich somit eine stärkere EpCAM-Expression. Die Arbeitsgruppe um Stoecklein et al. [70] untersuchte anhand von Proben von 70 Patienten die EpCAM-Expression beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Hierbei wurde in 79% der Fälle eine positive EpCAM-Expression festgestellt. 41% der Gewebeproben zeigten dabei eine starke Expression; beim Adenokarzinom fielen 49% in diese Gruppe. Immerhin wiesen 21% der untersuchten Plattenepithelkarzinome keine EpCAM-Expression auf, während es nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit weniger als zehn Prozent waren.

Die Unterschiede in der EpCAM-Expression könnten im unterschiedlichen histologischen Ursprung der Karzinome zu suchen sein. Das Plattenepithelkarzinom entsteht direkt aus dem Plattenepithel des Ösophagus. Im gesunden Plattenepithel ließ sich in unserer Studie keine EpCAM-Expression nachweisen. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Studien [72, 73]. Beim Plattenepithelkarzinom scheint es also im Verlauf der Karzinogenese von einem EpCAM-negativen Plattenepithel ausgehend zu einer Neuexpression von EpCAM im Karzinom zu kommen.

Viele Adenokarzinome im unteren Drittel des Ösophagus entwickeln sich aus Barrett-Epithel [16]. Als Barrett-Epithel bezeichnet man die Umwandlung des Plattenepithels in ein einschichtiges Zylinderepithel des intestinalen Typs, welches mit Becherzellen durchsetzt sein kann. Das Zylinderepithel entwickelt sich als Reaktion auf die andauernden Noxen während einer Refluxkrankheit.

Unsere Untersuchungen konnten in allen Barrett-Epithel-Proben eine starke EpCAM-Expression (3+) nachweisen. Eine solche hohe EpCAM-Expression wurde auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen [72, 85]. Die EpCAM-Expression wurde daher von einer Arbeitsgruppe als diagnostischer Marker für das Barrett-Epithel bezeichnet [73]. Da es sich beim Barrett-Epithel um ein einschichtiges drüsiges Epithel handelt, könnte die starke EpCAM-Expression „physiologisch“ für diesen Epitheltyp sein. Die Expression von EpCAM bei einigen Adenokarzinomen stellt sich nach unseren Ergebnissen schwächer dar als im Barrett-Epithel. In der Progression vom Barrett-Epithel zum Karzinom müsste dies demnach als Verlust oder verminderte Expression interpretiert werden. Es stellte sich nun die Frage, ob die Expression von EpCAM im Zusammenhang mit der Differenzierung steht. Die Vermutung wurde dadurch bestärkt, dass EpCAM nach unseren Ergebnissen in der peripheren Tumorzone schwächer ausgeprägt war als im zentralen Tumorbereich. An den Invasionsrändern werden häufig schlechter differenzierte Zellen gefunden. Ein möglicher, zu Grunde liegender, Mechanismus ist die Epitheliale Mesenchymale Transition. Hierbei handelt es sich um inter- und intrazelluläre Prozesse, bei denen Epithelzellen ihre epithelialen Eigenschaften weitgehend verlieren und typische mesenchymale Charakteristika annehmen. Die Polarisierung der Zellen wird aufgehoben und typische Adhäsionsmoleküle herabreguliert. Es kann somit zu einem invasiveren, migratorischen Phänotyp kommen [94]. Tatsächlich zeigte sich bei unseren Untersuchungen ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer schlechten Zelldifferenzierung und einer niedrigen EpCAM-Expression.

Aus den bisherigen Daten können wir vermuten, dass EpCAM während der Progression von Adenokarzinomen des Ösophagus offenbar verloren gehen kann und dies mit einer geringeren Differenzierung verbunden war. Wir waren nun daran interessiert, ob noch weitere wichtige Indikatoren für die Progression mit dem EpCAM-Status assoziiert waren. Wir haben in diesem Zusammenhang die lymphatische Metastasierung und das Langzeitüberleben der Patienten einbezogen. Zunächst haben wir die EpCAM-Expression in den Primärtumoren

mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korreliert. Hierbei zeigte sich, dass eine verminderte EpCAM-Expression direkt mit einem positiven Lymphknotenstatus einhergeht. Bei fehlender oder geringer EpCAM-Expression waren wesentlich häufiger Lymphknotenmetastasen vorhanden als bei starker EpCAM-Expression. Bei Betrachtung der einzelnen Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum korrespondierenden Karzinom konnten wir feststellen, dass die EpCAM-Expression in diesen häufig niedriger war als im Karzinom. Das Ergebnis war unabhängig davon, ob die periphere oder die zentrale Tumorzone in den Vergleich einbezogen wurde.

Auch in Bezug auf den zweiten Indikator für die Progression, dem Überleben der Patienten, zeigte sich ein in diese Richtung weisendes Ergebnis. In der Überlebensanalyse war eine starke EpCAM-Expression mit einem verbesserten Überleben assoziiert. Eine schwache EpCAM-Expression war mit einem verschlechterten Überleben verbunden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Erkenntnissen im Plattenepithelkarzinom. In Studien zum Plattenepithelkarzinom konnte gezeigt werden, dass eine starke EpCAM-Expression (3+) im Karzinom zu einer schlechteren Prognose führt. Dies traf sowohl im Hinblick auf eine rezidivfreie Periode wie auch auf das Gesamtüberleben zu [70]. Multivariate Überlebensanalysen konnten zeigen, dass die EpCAM-Expression dabei ein unabhängiger prognostischer Faktor ist [70].

Unsere Ergebnisse der Überlebensanalyse sind nicht nur gegensätzlich zu den Erkenntnissen beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, sondern auch zu denen einer Vielzahl anderer Karzinome. So zeigte sich z.B. bei den Karzinomen von Mamma [95], Ovarien [65] und Gallenblase [64], dass eine starke EpCAM-Expression mit einem schlechteren Überleben einhergeht. Eine verminderte Expression von EpCAM war mit einem besseren Überleben assoziiert. Jedoch war bei Nierenzellkarzinomen und bei Magenkarzinomen ebenfalls die schwache Expression von EpCAM mit schlechtem Überleben verbunden.

Songun et al. konnten bei der Untersuchung von 280 Magenkarzinomproben in 93% eine EpCAM-Expression feststellen. Die EpCAM-Expression war in 19%

einer starken Expression zuzuordnen. In den Bereich der starken Expression wurden alle Proben eingeteilt, die eine EpCAM-Expression von 100% aufwiesen. Die geringe EpCAM-Expression führte in dem Kollektiv von 280 Patienten zu einem signifikant schlechteren 10-Jahres-Überleben. Eine starke EpCAM-Expression führte dementsprechend zu einem signifikant besseren Überleben. EpCAM als prognostischer Faktor schien dabei unabhängig von der TNM-Kategorie zu sein [67].

Beim Nierenzellkarzinom gibt es bislang Daten, die gezeigt haben, dass ein Verlust von EpCAM in Verbindung mit einer höheren T-Kategorie, vermehrten Lymphknotenmetastasen und einem signifikant schlechteren Überleben stehen könnte [66]. Zu diesen Ergebnissen kamen Seligson et al. in einer Studie mit 417 Patienten. In dieser Studie wurde ebenfalls die TMA-Methode angewendet. Das Ursprungsgewebe vom Magenkarzinom stellte sich, sowohl nach unseren Daten wie auch nach den Ergebnissen früherer Studien [85], im Gegensatz zum Vorläufergewebe des von uns untersuchten ösophagealen Adenokarzinoms als negativ dar. Nur in Bereichen einer Intestinalen Metaplasie konnte man eine positive EpCAM-Expression nachweisen. Es kommt hier also im Verlauf der Karzinogenese scheinbar zu einer Neuexpression von EpCAM. Das Normalepithel der Niere wird, zumindest in den Tubulusanteilen, als positiv eingestuft [66]. Gemeinsam ist den Karzinomen von Magen, Niere und Ösophagus jedoch, dass EpCAM im Rahmen der Entdifferenzierung verloren zu gehen scheint.

Ein weiterer Hinweis für einen Zusammenhang mit der Entdifferenzierung ergab sich bei der Untersuchung der beta-Catenin-Expression im Tumorgewebe. Beta-Catenin ist Teil des WNT-Signalweges und spielt eine wichtige Rolle in dessen Aktivierung. Der Verlust der ursprünglichen Differenzierung bei einigen Tumoren könnte mit einer vermehrten Expression und nukleären Tumorlokation von beta-Catenin und damit einer verstärkten Aktivierung des WNT-Signalweges einhergehen. Studien konnten bereits zeigen, dass beta-Catenin in die kolorektale Karzinogenese involviert ist [96, 97]. Bei kolorektalen Karzinomen beobachtet man häufig Mutationen im APC-Gen. Diese Mutationen führen zu einer verminderten Phosphorylierung von beta-Catenin. Beta-Catenin

wird somit in geringerem Maße abgebaut und es kommt zu einer verstärkten Aktivierung des WNT-Signalweges. Eine Überexpression von beta-Catenin war assoziiert mit einem fortschreitenden Krankheitsverlauf und einer schlechten Prognose. Es hat sich hier allerdings nicht um einen unabhängigen Faktor gehandelt [96]. Über den WNT/beta-Catenin-Signalweg können Zellen angeregt werden, sich aus dem Zellverband zu lösen und mesenchymale Eigenschaften anzunehmen, also die Epitheliale-Mesenchymale Transition zu durchlaufen.

Für uns stellte sich an dieser Stelle die Frage, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen EpCAM und beta-Catenin gibt. Yamashita et al. [78] haben sich bereits mit dem Zusammenhang zwischen EpCAM und dem WNT-Signalweg beim hepatozellulären Karzinom beschäftigt. Hier zeigte sich, dass die nukleäre Akkumulation von beta-Catenin die EpCAM-Expression in normalen Hepatozyten sowie in HCC-Zelllinien fördert [78]. In unseren Ergebnissen zeigte sich in der Korrelation zwischen der beta-Catenin-Kernfärbung (Zeichen für aktivierten WNT-Signalweg) und der EpCAM-Expression, dass bei fehlender (0) oder schwacher EpCAM-Expression (1+) häufiger ($p=0,089$) eine positive beta-Catenin-Kernfärbung gefunden wurde als bei Tumoren mit moderater (2+) oder starker (3+) EpCAM-Expression. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein aktivierter WNT-Signalweg mit einer verminderten EpCAM-Expression einhergeht. Dies scheint umso wahrscheinlicher, da in den von uns untersuchten ösophagealen Adenokarzinomen eine schlechte Differenzierung sowohl mit einer positiven nukleären beta-Catenin-Expression als auch mit einer schwachen EpCAM-Expression signifikant korreliert war. Ob es sich hierbei um eine direkte Wirkung auf die EpCAM-Expression oder ein Epiphänomen im Rahmen der Entdifferenzierung handelt, bleibt unklar. Auch haben wir keine direkten zellulären Zusammenhänge zwischen EpCAM und beta-Catenin darstellen können, da wir keine Doppelmarkierung verwendeten, sondern serielle Einzelfärbungen auf verschiedenen Schnitten. Dies bedeutet, dass es durchaus nukleär beta-Catenin positive Zellen mit EpCAM-Expression geben kann.

Ein interessanter Zusammenhang zwischen der EpCAM-Expression und der beta-Catenin-Expression ergibt sich auch auf Grundlage einer Arbeit von

Maetzel et al. [79]. In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären EpCAM-Domäne EplCD und dem WNT-Signalweg gezeigt werden. EpCAM kann demnach als Signalmolekül funktionieren. Dies erfordert eine regulierte intramembranäre Proteolyse (RIP), die EpCAM in eine extrazelluläre (EpEX) sowie eine intrazelluläre Domäne (EplCD) spaltet. EplCD kann dabei über einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, der nicht mit EpEX reagiert. An diesem Vorgang der RIP scheinen die beiden Proteasen TACE und PS-2 beteiligt zu sein. Die Spaltung von EpCAM scheint im ersten Schritt über TACE zu erfolgen. Im zweiten Schritt wird mit Hilfe von PS-2 die intrazelluläre Domäne freigesetzt. In der Folge kommt es zu einer nukleären Translokation von EplCD. In der Studie von Maetzel et al. [79] war EplCD in allen Kernen innerhalb der untersuchten Tumore nachweisbar, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Im Normalgewebe zeigte sich dagegen kein EplCD im Zellkern. Es liegt hier nahe, dass normalen Zellen der essenzielle Faktor für die nukleäre Translokation von EplCD fehlt. Damit wäre vereinbar, dass u.a. TACE und PS-2 in Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe stärker exprimiert werden. Nach den Untersuchungen von Maetzel et al. [79] bildet EplCD im Zellkern einen Komplex mit FHL2, einem Co-Aktivatoren von beta-Catenin. Dies führt zur Aktivierung des WNT-Signalweges. Es ergibt sich hier also mit der regulierten intrazellulären Proteolyse ein neuer Ansatz für die durch EpCAM ausgelöste nukleäre Signaltransduktion.

Durch diese kürzlich veröffentlichten Daten ergibt sich nun eine weitere, von der bisherigen Annahme des alleinigen Verlustes von EpCAM im Rahmen der Entdifferenzierung abweichende Interpretation unserer Ergebnisse. In der hier vorliegenden Arbeit haben wir mit dem Antikörper Ber-EP4, der gegen die Extrazelluläre Domäne von EpCAM gerichtet ist, das Protein nachgewiesen. EplCD wurde damit jedoch nicht erfasst. Man könnte hier also auch durchaus überlegen, dass bei den von uns untersuchten Tumoren, die eine schwächere EpCAM-Expression aufwiesen, eine vermehrte regulierte intramembranäre Proteolyse stattgefunden hat. EpCAM als ganzes Protein lag seltener vor und die Spaltprodukte, insbesondere EplCD, konnten durch unseren Assay möglicherweise nicht effektiv nachgewiesen werden. Diese Annahme würde

auch einen Erklärungsansatz für die in unserer Arbeit gezeigte höhere nukleäre beta-Catenin-Expression bei Tumoren mit niedriger EpCAM-Expression bieten. EpCAM könnte bei diesen Tumoren vermehrt im Zellkern vorkommen und auf diese Weise gemeinsam mit nukleärem beta-Catenin das genetische Programm des aktivierten WNT-Signalweges umsetzen. Um hier nähere Aussagen treffen zu können, müsste man jedoch in weiteren Versuchen EpICD im Kern und gleichzeitig nukleäres beta-Catenin nachweisen, die ko-lokalisieren sollten. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Promotionsarbeit gab es jedoch keinen Antikörper gegen EpICD, der für formalin-fixiertes und paraffiniertes Gewebe geeignet gewesen wäre.

Da es in der verfügbaren Literatur auch Hinweise auf eine direkte Verbindung zwischen EpCAM und E-Cadherin gibt, wollten wir diese mögliche Verbindung bei Adenokarzinomen des Ösophagus untersuchen. Eine solche Verbindung ließ sich jedoch an Hand unserer Daten nicht feststellen. Insgesamt war die Immunreaktivität der anti-E-Cadherin-Antikörper im Tumorgewebe wesentlich geringer ausgeprägt als die der anti-EpCAM-Antikörper. Interessanterweise zeigten 96% der von uns untersuchten Tumore eine im Vergleich zum gesunden Plattenepithel verminderte E-Cadherin-Expression. Jedoch fanden wir keine signifikante Korrelation zwischen E-Cadherin und der Stärke der EpCAM-Expression.

Die Frage, wie die EpCAM Expression reguliert wird, ist zurzeit sowohl in gesunden wie auch in Tumorgeweben unklar. In einer ersten Annäherung an diese Problematik gab es Studien, die die Methylierung des EpCAM Promoters untersuchten. Auch wenn die gewebespezifische Expression von EpCAM unwahrscheinlich ist, konnte bei Mamma-Karzinom Zelllinien eine gewisse Verbindung der Promotermethylierung zur EpCAM-Expression festgestellt werden [68]. Bei Tumorproben war jedoch kein Zusammenhang zwischen Promotermethylierung und EpCAM-Expression ersichtlich [68]. In einer Studie zum oralen Plattenepithelkarzinom konnte festgestellt werden, dass die EpCAM-Expression signifikant mit der Promotermethylierung assoziiert war ($p=0,008$) [69]. Es wurden in der Studie die EpCAM-Expression und Methyltransferase in 112 Fällen untersucht sowie die EpCAM-

Promotermethylierung in 72 Fällen per Polymerase-Ketten-Reaktion. In jeweils 51% der Tumorproben zeigten sich eine hohe EpCAM-Expression sowie die Methylierung des Promoters. Ein hoher Anteil methylierter Allele war dabei assoziiert mit einer schwachen EpCAM-Expression im Tumor. Bei einer geringen Promotermethylierung fand sich dagegen eine hohe EpCAM-Expression. Die Ergebnisse legen eine epigenetisch regulierte EpCAM-Expression nahe. EpCAM-Expression und Promotermethylierung korrelierten allerdings nicht mit den klinisch-pathologischen Eigenschaften der Tumore [69].

Zusammenfassend zeigen die hier erarbeiteten Daten, dass Adenokarzinome des Ösophagus häufig EpCAM exprimieren. Hierbei unterscheiden sie sich in ihrem Expressionsprofil von den Plattenepithelkarzinomen. Plattenepithelkarzinome exprimieren EpCAM in niedriger Frequenz und weisen auch häufiger keine EpCAM-Expression auf [70]. Während man bei Plattenepithelkarzinomen von einer EpCAM-Neo-Expression ausgeht und die starke Expression als unabhängiger negativer prognostischer Faktor identifiziert wurde, ist bei den primären Adenokarzinomen eher von einem Verlust von EpCAM bei der Dedifferenzierung auszugehen. Hier war die schwache EpCAM-Expression mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Auf die Bedeutung von EpCAM bei der systemischen Progression kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen nicht geschlossen werden. Es ist anzumerken, dass bei Ösophaguskarzinomen beider histologischer Typen disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten über EpCAM detektiert werden können und als starker prognostischer Faktor gelten [98]. Da mittlerweile gezeigt werden konnte, dass Primärtumoren des Ösophagus als Surrogatmarker der systemischen Erkrankung eher ungeeignet sind [99], ist die wichtige Frage nach der möglichen therapeutischen Nutzung von EpCAM beim Adenokarzinom des Ösophagus nicht so einfach zu beantworten. Im Hinblick auf eine gegen EpCAM gerichtete Immuntherapie ist zu bedenken, dass eine hohe EpCAM-Expression mit einer guten Differenzierung einhergeht. Es könnte sein, dass aggressive Zellklone nicht bekämpft und stattdessen selektiert würden. Um diese Problemstellung klären zu können, müsste man zunächst systematisch die Vorläuferzellen von

Metastasen (z.B. disseminierte Tumorzellen in Knochenmark und Lymphknoten) im Vergleich zu deren autologen Primärtumoren und ggf. zu Metastasen bezüglich EpCAM analysieren. Hierbei könnte ein umfassenderes Bild über die Dynamik der EpCAM-Expression während der systemischen Progression entstehen. Es könnte überprüft werden, ob die eigentlichen Zielzellen adjuvanter Therapien tatsächlich die angezielte Zielstruktur exprimieren. Ein weiterer wichtiger Schritt wären zellbiologische Experimente, um die Funktion von EpCAM bei Ösophaguskarzinomen bestimmen zu können. Entsprechende Untersuchungen wurden als Folge der Ergebnisse dieser Promotionsarbeit von der Arbeitsgruppe begonnen.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Ziel der Arbeit war es, die Expression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls (EpCAM) bei Adenokarzinomen des Ösophagus und ösophagogastralem Übergang darzustellen, sowie die klinische Signifikanz und die Möglichkeit für eine gegen EpCAM gerichtete Therapie zu untersuchen. Im Hinblick auf einen möglichen Regulationsmechanismus wurde beta-Catenin als Endstrecke des WNT-Signalwegs einbezogen.

Methoden: Es wurde die Methode des Tissue Mikroarray (TMA) gewählt. Die EpCAM-Expression wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Ber-EP4 immunhistochemisch an den Proben von 98 Patienten dargestellt. Zur Interpretation der Färbungsergebnisse haben wir den Hercep-Test (0 bis 3+) sowie den Immunreaktiven Score (0 bis 12) eingesetzt. In die Überlebensanalyse konnten 72 Patienten einbezogen werden.

Ergebnisse: Eine EpCAM-Expression im Vergleich zum Normalepithel war in 94% der Fälle mit unterschiedlicher Expressionsstärke nachweisbar. Die Hälfte der Fälle zeigte eine starke Expression (3+). In den peripheren Tumorbereichen war EpCAM insgesamt schwächer ausgeprägt als in den zentralen Anteilen. In der statistischen Analyse konnte eine Signifikanz zwischen einer starken EpCAM-Expression und fehlender Lymphknotenmetastasierung ($p < 0,001$), sowie einem hohen Differenzierungsgrad ($p = 0,009$) nachgewiesen werden. Die Überlebensanalyse zeigte bei Tumoren mit einer starken und moderaten EpCAM-Expression ein signifikant besseres Überleben ($p = 0,042$). Bei der Untersuchung der Karzinomprogression zeigte das Barrett-Epithel eine stärkere, die Lymphknotenmetastasen dagegen eine schwächere EpCAM-Expression als das Karzinom. Eine nukleäre beta-Catenin-Expression war häufiger in Karzinomen mit fehlender oder schwacher EpCAM-Expression nachweisbar ($p = 0,089$).

Diskussion: Im Gegensatz zu vielen anderen Tumoren zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen einer starken EpCAM-Expression und einem verbesserten Überleben der Patienten. Aufgrund einer hohen EpCAM-Expression in einem Großteil der Karzinome erscheint eine gegen EpCAM gerichtete Therapie sinnvoll. Da die Expression in den gut differenzierten Zellen besonders hoch ist, muss jedoch bedacht werden, dass es zu einer Selektion aggressiver Zellklone kommen könnte. In dieser Hinsicht sind präklinische und klinische Studien in Zukunft notwendig.

6 Literaturverzeichnis

1. DeMeester, S.R., *Adenocarcinoma of the esophagus and cardia: a review of the disease and its treatment*. Ann Surg Oncol, 2006. **13**(1): p. 12-30.
2. Ruf, P., et al., *Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer*. Br J Cancer, 2007. **97**(3): p. 315-21.
3. Balzar, M., et al., *The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)*. J Mol Med, 1999. **77**(10): p. 699-712.
4. Flieger, D., et al., *Influence of cytokines, monoclonal antibodies and chemotherapeutic drugs on epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and LewisY antigen expression*. Clin Exp Immunol, 2001. **123**(1): p. 9-14.
5. Thurmond, L.M., et al., *Adenocarcinoma cells exposed in vitro to Navelbine or Taxol increase Ep-CAM expression through a novel mechanism*. Cancer Immunol Immunother, 2003. **52**(7): p. 429-37.
6. Chaudry, M.A., et al., *EpCAM an immunotherapeutic target for gastrointestinal malignancy: current experience and future challenges*. Br J Cancer, 2007. **96**(7): p. 1013-9.
7. Kirman, I. and R.L. Whelan, *Drug evaluation: adecatumumab, an engineered human anti-EpCAM antibody*. Curr Opin Mol Ther, 2007. **9**(2): p. 190-6.
8. Koprowski, H., et al., *Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies*. Somatic Cell Genet, 1979. **5**(6): p. 957-71.
9. Baeuerle, P.A. and O. Gires, *EpCAM (CD326) finding its role in cancer*. Br J Cancer, 2007. **96**(3): p. 417-23.
10. Mitas, M., et al., *Accurate discrimination of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma using a quantitative three-tiered algorithm and multimarker real-time reverse transcription-PCR*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(6): p. 2205-14.
11. Jankowski, J.A., et al., *Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus*. Am J Pathol, 1999. **154**(4): p. 965-73.
12. Bareiss, D., et al., *[Current epidemiology of carcinoma of the esophagus and cardia in Germany]*. Dtsch Med Wochenschr, 2002. **127**(25-26): p. 1367-74.

13. Enzinger, P.C. and R.J. Mayer, *Esophageal cancer*. N Engl J Med, 2003. **349**(23): p. 2241-52.
14. Ribeiro, U., Jr., et al., *Risk factors for squamous cell carcinoma of the oesophagus*. Br J Surg, 1996. **83**(9): p. 1174-85.
15. Lagergren, P., et al., *Health-related quality of life among patients cured by surgery for esophageal cancer*. Cancer, 2007. **110**(3): p. 686-93.
16. Bollschweiler, E. and A.H. Holscher, *[Carcinoma of the esophagus--actual epidemiology in Germany]*. Onkologie, 2001. **24**(2): p. 180-4.
17. Paulson, T.G. and B.J. Reid, *Focus on Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma*. Cancer Cell, 2004. **6**(1): p. 11-6.
18. Kulke, M.H., et al., *Microsatellite instability and hMLH1/hMSH2 expression in Barrett esophagus-associated adenocarcinoma*. Cancer, 2001. **91**(8): p. 1451-7.
19. Cai, J.C., et al., *Microsatellite alterations in phenotypically normal esophageal squamous epithelium and metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(25): p. 4070-6.
20. Cai, H., et al., *A micromachined tunable coupled-cavity laser for wide tuning range and high spectral purity*. Opt Express, 2008. **16**(21): p. 16670-9.
21. Solaymani-Dodaran, M., et al., *Risk of oesophageal cancer in Barrett's oesophagus and gastro-oesophageal reflux*. Gut, 2004. **53**(8): p. 1070-4.
22. DeMeester, S.R. and T.R. DeMeester, *Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy*. Ann Surg, 2000. **231**(3): p. 303-21.
23. Rudolph, R.E., et al., *Effect of segment length on risk for neoplastic progression in patients with Barrett esophagus*. Ann Intern Med, 2000. **132**(8): p. 612-20.
24. Conio, M., et al., *Secular trends in the epidemiology and outcome of Barrett's oesophagus in Olmsted County, Minnesota*. Gut, 2001. **48**(3): p. 304-9.
25. Goldblum, J.R., et al., *Helicobacter pylori infection, not gastroesophageal reflux, is the major cause of inflammation and intestinal metaplasia of gastric cardiac mucosa*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(2): p. 302-11.
26. Goldblum, J.R., *The significance and etiology of intestinal metaplasia of the esophagogastric junction*. Ann Diagn Pathol, 2002. **6**(1): p. 67-73.

27. DeMeester, S.R., et al., *Cytokeratin and DAS-1 immunostaining reveal similarities among cardiac mucosa, CIM, and Barrett's esophagus*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(10): p. 2514-23.
28. Balaji, N.S., et al., *Etiology of intestinal metaplasia at the gastroesophageal junction*. Surg Endosc, 2003. **17**(1): p. 43-8.
29. Bowrey, D.J., G.W. Clark, and G.T. Williams, *Patterns of gastritis in patients with gastro-oesophageal reflux disease*. Gut, 1999. **45**(6): p. 798-803.
30. Couvelard, A., et al., *Cytokeratin immunoreactivity of intestinal metaplasia at normal oesophagogastric junction indicates its aetiology*. Gut, 2001. **49**(6): p. 761-6.
31. Dolan, K., et al., *New classification of oesophageal and gastric carcinomas derived from changing patterns in epidemiology*. Br J Cancer, 1999. **80**(5-6): p. 834-42.
32. Nigro, J.J., et al., *Node status in transmural esophageal adenocarcinoma and outcome after en bloc esophagectomy*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1999. **117**(5): p. 960-8.
33. Wijnhoven, B.P., et al., *Adenocarcinomas of the distal oesophagus and gastric cardia are one clinical entity. Rotterdam Oesophageal Tumour Study Group*. Br J Surg, 1999. **86**(4): p. 529-35.
34. Stahl, A., et al., *FDG PET imaging of locally advanced gastric carcinomas: correlation with endoscopic and histopathological findings*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2003. **30**(2): p. 288-95.
35. Liu, L., et al., *Significance of the depth of tumor invasion and lymph node metastasis in superficially invasive (T1) esophageal adenocarcinoma*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(8): p. 1079-85.
36. Nigro, J.J., et al., *Prevalence and location of nodal metastases in distal esophageal adenocarcinoma confined to the wall: implications for therapy*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1999. **117**(1): p. 16-23; discussion 23-5.
37. Wittekind, C., et al., *TNM residual tumor classification revisited*. Cancer, 2002. **94**(9): p. 2511-6.
38. Patel, A.N., et al., *Surgical management of esophageal carcinoma*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2003. **16**(3): p. 280-4.
39. Low, D.E., et al., *Esophagectomy--it's not just about mortality anymore: standardized perioperative clinical pathways improve outcomes in patients with esophageal cancer*. J Gastrointest Surg, 2007. **11**(11): p. 1395-402; discussion 1402.

40. Internullo, E., et al., *Outcome after esophagectomy for cancer of the esophagus and GEJ in patients aged over 75 years*. Eur J Cardiothorac Surg, 2008.
41. Malthaner, R.A., et al., *Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis*. BMC Med, 2004. **2**: p. 35.
42. McCulloch, P., J. Ward, and P.P. Tekkis, *Mortality and morbidity in gastro-oesophageal cancer surgery: initial results of ASCOT multicentre prospective cohort study*. Bmj, 2003. **327**(7425): p. 1192-7.
43. Birkmeyer, J.D., et al., *Hospital volume and surgical mortality in the United States*. N Engl J Med, 2002. **346**(15): p. 1128-37.
44. Karl, R.C., et al., *Factors affecting morbidity, mortality, and survival in patients undergoing Ivor Lewis esophagogastrectomy*. Ann Surg, 2000. **231**(5): p. 635-43.
45. Johansson, J. and B. Walther, *Clinical outcome and long-term survival rates after esophagectomy are not determined by age over 70 years*. J Gastrointest Surg, 2000. **4**(1): p. 55-62.
46. Herskovic, A., et al., *Combined chemotherapy and radiotherapy compared with radiotherapy alone in patients with cancer of the esophagus*. N Engl J Med, 1992. **326**(24): p. 1593-8.
47. Teniere, P., et al., *Postoperative radiation therapy does not increase survival after curative resection for squamous cell carcinoma of the middle and lower esophagus as shown by a multicenter controlled trial. French University Association for Surgical Research*. Surg Gynecol Obstet, 1991. **173**(2): p. 123-30.
48. Zieren, H.U., et al., *Adjuvant postoperative radiation therapy after curative resection of squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus: a prospective randomized study*. World J Surg, 1995. **19**(3): p. 444-9.
49. Fok, M., et al., *Postoperative radiotherapy for carcinoma of the esophagus: a prospective, randomized controlled study*. Surgery, 1993. **113**(2): p. 138-47.
50. Stahl, M., et al., *Clinical response to induction chemotherapy predicts local control and long-term survival in multimodal treatment of patients with locally advanced esophageal cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2005. **131**(1): p. 67-72.
51. Bosset, J.F., et al., *Chemoradiotherapy followed by surgery compared with surgery alone in squamous-cell cancer of the esophagus*. N Engl J Med, 1997. **337**(3): p. 161-7.

52. Nygaard, K., et al., *Pre-operative radiotherapy prolongs survival in operable esophageal carcinoma: a randomized, multicenter study of pre-operative radiotherapy and chemotherapy. The second Scandinavian trial in esophageal cancer.* World J Surg, 1992. **16**(6): p. 1104-9; discussion 1110.
53. Urba, S.G., et al., *Randomized trial of preoperative chemoradiation versus surgery alone in patients with locoregional esophageal carcinoma.* J Clin Oncol, 2001. **19**(2): p. 305-13.
54. Burmeister, B.H., et al., *Surgery alone versus chemoradiotherapy followed by surgery for resectable cancer of the oesophagus: a randomised controlled phase III trial.* Lancet Oncol, 2005. **6**(9): p. 659-68.
55. Le Prise, E., et al., *A randomized study of chemotherapy, radiation therapy, and surgery versus surgery for localized squamous cell carcinoma of the esophagus.* Cancer, 1994. **73**(7): p. 1779-84.
56. Apinop, C., P. Puttisak, and N. Preecha, *A prospective study of combined therapy in esophageal cancer.* Hepatogastroenterology, 1994. **41**(4): p. 391-3.
57. Walsh, T.N., et al., *A comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma.* N Engl J Med, 1996. **335**(7): p. 462-7.
58. Greer, S.E., et al., *Neoadjuvant chemoradiotherapy for esophageal carcinoma: a meta-analysis.* Surgery, 2005. **137**(2): p. 172-7.
59. Cooper, J.S., et al., *Chemoradiotherapy of locally advanced esophageal cancer: long-term follow-up of a prospective randomized trial (RTOG 85-01). Radiation Therapy Oncology Group.* Jama, 1999. **281**(17): p. 1623-7.
60. Tepper, J., et al., *Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781.* J Clin Oncol, 2008. **26**(7): p. 1086-92.
61. Gastl, G., et al., *Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival.* Lancet, 2000. **356**(9246): p. 1981-2.
62. Spizzo, G., et al., *Prognostic significance of Ep-CAM AND Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer.* Int J Cancer, 2002. **98**(6): p. 883-8.
63. Osta, W.A., et al., *EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy.* Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5818-24.
64. Varga, M., et al., *Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(9): p. 3131-6.

65. Spizzo, G., et al., *Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2006. **103**(2): p. 483-8.
66. Seligson, D.B., et al., *Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(8): p. 2659-69.
67. Songun, I., et al., *Loss of Ep-CAM (CO17-1A) expression predicts survival in patients with gastric cancer*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(9): p. 1767-72.
68. Spizzo, G., et al., *Methylation status of the Ep-CAM promoter region in human breast cancer cell lines and breast cancer tissue*. *Cancer Lett*, 2007. **246**(1-2): p. 253-61.
69. Shiah, S.G., et al., *The involvement of promoter methylation and DNA methyltransferase-1 in the regulation of EpCAM expression in oral squamous cell carcinoma*. *Oral Oncol*, 2008.
70. Stoecklein, N.H., et al., *Ep-CAM expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker*. *BMC Cancer*, 2006. **6**: p. 165.
71. Kimura, H., et al., *Prognostic significance of EpCAM expression in human esophageal cancer*. *Int J Oncol*, 2007. **30**(1): p. 171-9.
72. Kumble, S., et al., *Multifocal heterogeneity in villin and Ep-CAM expression in Barrett's esophagus*. *Int J Cancer*, 1996. **66**(1): p. 48-54.
73. Wong, N.A., et al., *EpCAM and gpA33 are markers of Barrett's metaplasia*. *J Clin Pathol*, 2006. **59**(3): p. 260-3.
74. Trzpis, M., et al., *Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule*. *Am J Pathol*, 2007. **171**(2): p. 386-95.
75. Lustig, B. and J. Behrens, *The Wnt signaling pathway and its role in tumor development*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003. **129**(4): p. 199-221.
76. Behrens, J., *The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis*. *Biochem Soc Trans*, 2005. **33**(Pt 4): p. 672-5.
77. Behrens, J. and B. Lustig, *The Wnt connection to tumorigenesis*. *Int J Dev Biol*, 2004. **48**(5-6): p. 477-87.
78. Yamashita, T., et al., *Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma*. *Cancer Res*, 2007. **67**(22): p. 10831-9.

79. Maetzel, D., et al., *Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(2): p. 162-71.
80. Eisenmann, D.M., *Wnt signaling*. WormBook, 2005: p. 1-17.
81. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 844-7.
82. Winter, M.J., et al., *The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology*. Am J Pathol, 2003. **163**(6): p. 2139-48.
83. Boenisch, T., *Formalin-fixed and heat-retrieved tissue antigens: a comparison of their immunoreactivity in experimental antibody diluents*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2001. **9**(2): p. 176-9.
84. Agace, W.W., et al., *T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin alpha(E) (CD103)beta(7), LEEP-CAM and chemokines*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(5): p. 563-8.
85. Anders, M., et al., *Expression of EpCam and villin in Barrett's esophagus and in gastric cardia*. Dis Markers, 2008. **24**(6): p. 287-92.
86. Litvinov, S.V., et al., *Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins*. J Cell Biol, 1997. **139**(5): p. 1337-48.
87. Winter, M.J., et al., *Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase*. Mol Cell Biochem, 2007. **302**(1-2): p. 19-26.
88. Walgenbach, S., et al., *[Prognostic value of e-cadherin in papillary thyroid carcinoma]*. Chirurg, 1998. **69**(2): p. 186-90.
89. Went, P.T., et al., *Frequent EpCam protein expression in human carcinomas*. Hum Pathol, 2004. **35**(1): p. 122-8.
90. Went, P., et al., *Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCam) in renal epithelial tumors*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(1): p. 83-8.
91. Went, P., et al., *Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers*. Br J Cancer, 2006. **94**(1): p. 128-35.
92. Camp, R.L., L.A. Charette, and D.L. Rimm, *Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma*. Lab Invest, 2000. **80**(12): p. 1943-9.

93. Peters, S., et al., [*Tissue microarrays. Value of immunohistochemical proliferation markers for serial investigations of head and neck cancer*]. Hno, 2004. **52**(5): p. 409-12.
94. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
95. Spizzo, G., et al., *High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **86**(3): p. 207-13.
96. Baldus, S.E., et al., *MUC1 and nuclear beta-catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(8): p. 2790-6.
97. Holcombe, R.F., et al., *Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma*. Mol Pathol, 2002. **55**(4): p. 220-6.
98. Scheunemann, P., et al., *Occult disseminated tumor cells in lymph nodes of patients with gastric carcinoma. A critical appraisal of assessment and relevance*. Langenbecks Arch Surg, 2009. **394**(1): p. 105-13.
99. Stoecklein, N.H., et al., *Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(5): p. 441-53.

7 Anhang

7.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich auf vielfältige Weise bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas sowie die intensive Betreuung während der Arbeit danke ich ganz herzlich meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Nikolas H. Stoecklein. Seine Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft und seine vielfältigen Anregungen und Ratschläge haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfram T. Knoefel, dem Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, bedanken, der mich bei den klinische Aspekten und Fragen der Arbeit unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. Stephan E. Baldus aus dem Institut für Pathologie danke ich für die freundliche Hilfe bei der Auswertung und Nachbegutachtung der Schnittpräparate sowie für das Überlassen von Tumormaterial und Tumordaten aus den Universitätskliniken Düsseldorf und Köln. An dieser Stelle Dank für Ihre Mühe auch an Frau Prof. Dr. Bollschweiler von der Universitätsklinik Köln.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich ebenfalls Herrn Prof. Dr. Baldus.

Für die Übernahme der Aufgabe des Drittprüfers danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Bauerschmitz.

Für eine gute Zusammenarbeit im Labor und ihre praktischen Hilfestellungen möchte ich mich bei Imke Hoffmann sowie dem gesamten Laborteam bedanken.

Immer wieder gefreut habe ich mich über die stets freundliche und schnelle Hilfe bezüglich Patientendaten und regelmäßiger Follow-ups. Hier ein Dank an Frau Brandt.

Für die kritische Lektüre und die damit verbundenen wertvollen Anregungen sowie die Unterstützung bei der Veröffentlichung möchte ich mich bei Herrn Dr. Christian Vay bedanken.

Ein besonders lieber Dank gilt meinem Freund und meinem Bruder, die beide auf ihre wertvolle Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein letzter, ganz besonderer Dank gilt jenen, denen ich diese Arbeit gewidmet habe, meinen Eltern. Sie haben mir diesen Lebensweg erst ermöglicht und mich mit grenzenloser und uneingeschränkter Unterstützung, Kraft und Liebe begleitet. Dafür danke ich ihnen von ganzem Herzen.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der identifizierten Liganden von EpCAM und deren mögliche Funktionen.

Abbildung 2: Schema des WNT-Signalweg (in Abwesenheit (a) und in Anwesenheit (b) des spezifischen Liganden WNT). Entnommen aus Eisenmann et al 2005..

Abbildung 3: zwei Beispiel für TMAs mit Patientenproben und Orientierungspunkten.

Abbildung 4: Stanzgerät.

Abbildung 5: schematischer Aufbau eines TMA.

Abbildung 6: Prinzip eines vorgefertigten Dokumentationsbogen.

Abbildung 7: schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Methode.

Abbildung 8: Beispiele für eine 3+- (oben links), 2+- (oben rechts), 1+- (unten links) und 0-Expression (unten rechts) Klassifikation nach dem HercepTest™.

Abbildung 9: Beispiele für fehlende EpCAM-Expression im Normalepithel nach Immunhistochemie, 100-fache Vergrößerung.

Abbildung 10: Beispiel für positive EpCAM-Expression in Bereichen der Intestinalen Metaplasie, 100-fache (links) und 400-fache (rechts) Vergrößerung, die Pfeile zeigen Becherzellen.

Abbildung 11: EpCAM-Express. im Tumorgewebe nach der Hercep- Klassifikation.

Abbildung 12: Beispiel für 3+-EpCAM-Expression im Tumor in 100-facher (links) und 400-facher (rechts) Vergrößerung.

Abbildung 13: Beispiel für eine 2+-EpCAM-Expression im Tumor in 100-facher (links) und 400-facher (rechts) Vergrößerung.

Abbildung 14: Beispiel für eine 1+-EpCAM-Expression im Tumor in 100-facher (links) und 400-facher (rechts) Vergrößerung.

Abbildung 15: Beispiel für eine fehlende EpCAM-Expression im Tumorgewebe bei 100-facher (links) und 400-facher (rechts) Vergrößerung.

Abbildung 16: EpCAM-Expression im Tumorgewebe nach dem IRS.

Abbildung 17: Beispiel für EpCAM-Überexpression (3+) neben starker Lymphozyteninfiltration, 100-fache (links) und 400-fache (rechts) Vergrößerung, Pfeile zeigen Stellen mit Lymphozyteninfiltrat.

Abbildung 18: EpCAM-Expression in peripherer und zentraler Tumorzone.

Abbildung 19: Mittelwerte der EpCAM-Expression nach dem Immunreaktiven Score.

Abbildung 20: Beispiel für unterschiedliche EpCAM-Expression in peripherer (links, 1+) und zentraler (rechts, 2+) Tumorzone bei 400-facher Vergrößerung.

Abbildung 21: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die EpCAM-Expression, (fehlende Expression sowie Expression 1+ (n=35) versus Expression 2+ und 3+ (n=36).

Abbildung 22: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die EpCAM-Expression, (fehlende Expression sowie Expression 1+ (n=35) versus Expression 2+ und 3+ (n=36).

Abbildung 23: Beispiel für die EpCAM-Expression im Übergang Normalepithel zu Barrett in 100-facher (links) und 400-facher (rechts) Vergrößerung.

Abbildung 24: EpCAM-Expression in Lymphknotenmetastasen.

Abbildung 25: Beispiele für eine fehlende (links) und eine 2+-EpCAM-Expression (rechts) in Lymphknotenmetastasen bei 400-facher Vergrößerung.

Abbildung 26: Vergleich der EpCAM-Expression von Lymphknotenmetastasen, Barrett-Epithel und Tumor nach der Hercep-Klassifikation.

Abbildung 27: EpCAM-Expression der zu den Lymphknotenmetastasen gehörenden Tumore und im gesamten Tumorkollektiv.

Abbildung 28: EpCAM-Expression im Vergleich zwischen Lymphknotenmetastasen und Tumor.

Abbildung 29: EpCAM-Expression im Vergleich zwischen Lymphknotenmetastasen und Tumor.

Abbildung 30: 2+-beta-Catenin-Expression im Normalepithel, 100-fache (links) und 400-fache (rechts) Vergrößerung.

Abbildung 31: beta-Catenin-Kernfärbung, 400-fache Vergrößerung, Pfeile zeigen Beispiele für positiv gefärbte Kerne.

Abbildung 32: Durchschnittlicher Anteil der beta-Catenin-positiven Kerne im Tumor (bei Betrachtung aller 98 Tumore und bei Betrachtung der 33 Tumore mit positiver beta-Catenin-Kernfärbung).

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung in verschiedene Differenzierungsgrade.

Tabelle 2: Staging der Ösophagustumore.

Tabelle 3: Staging der Magentumore.

Tabelle 4: Prozentuale Zuteilung der entdeckten Ösophaguskarzinome nach Stadium.

Tabelle 5: 5-Jahres-Überlebensraten in verschiedenen Tumorstadien nach Resektion.

Tabelle 6: Verteilung des Patientenkollektivs gemäß TNM-Klassifikation.

Tabelle 7: In unserer Arbeit verwendete Antikörper mit Konzentration, angewendeter Färbungsmethode und Hersteller.

Tabelle 8: Auswertung nach dem HercepTest™.

Tabelle 9: Auswertung auf einer Expressionsskala von 0 bis 12 nach dem IRS.

Tabelle 10: Korrelation der EpCAM-Expression mit histopathologischen Parametern (Einzelbetrachtung der 3+- EpCAM-Expression).

Tabelle 11: Korrelation der EpCAM-Expression im Tumor mit der beta-Catenin-Kernfärbung.

7.4 Abkürzungsverzeichnis

ABC: Avidin-Biotin-Complex

CDKN2a: Cyclin Dependent Kinase2a

CIM: Cardiale Intestinale Metaplasie

CIN: Cervikale Intraepitheliale Neoplasie

E-FABP: Epidannel Fatty Acid Binding Protein

EpCAM: Epithelial-cellular adhesion molecule (epitheliales Zell-Adhäsions-Molekül)

EpEX: extrazelluläre EpCAM-Domäne

EpICD: intrazelluläre EpCAM-Domäne

HE: Hämatoxylin-Eosin

IRS: Immunreaktiver Score

PBS: „Phosphated buffered saline“ (Phosphatgepufferte Natriumchloridlösung)

PET: Positronen-Emissions-Tomographie

RIP: regulierte intrazelluläre Proteolyse

TACSTD1: tumor-associated calcium-signal-transducer

TMA: Tissue Microarray

UICC: Union International Contre Cancer

Die Symbole physikalischer und chemischer Größen bzw. ihre Einheiten und allgemeingebäuchliche Abkürzungen der deutschen Sprache sind in diesem Verzeichnis aus Platzgründen nicht enthalten.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nina Lindenlauf
Geburtsdatum	28. Juli 1983
Geburtsort	Düren
Familienstand	ledig

Schulbildung

1990 – 1994	Grundschule in Kempen-St.Hubert
1994 – 2003	Gymnasium Thomaeum in Kempen Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

2003 – 2009	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Herbst 2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Erstes Staatsexamen)
Herbst 2009	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Zweites Staatsexamen)

Promotion

06/2006 – 01/2011	experimentielle Doktorarbeit, Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Kinder- chirurgie, Universitätsklinik Düsseldorf Betreuer: Priv.-Doz. Dr. med. N. H. Stoecklein
-------------------	--

Veröffentlichungen

1. N. Lindenlauf, C. Vay, S.A. Topp, C.F. Eisenberger, S.E. Baldus, A. H. Hölscher, W.T. Knoefel, and N.H. Stoecklein: Down-Regulation of EpCAM correlates with an unfavorable Prognosis in the Metaplasie-Carcinoma-Sequenz of Barrett's Carcinoma. CHIRURGISCHES FORUM UND DAGV FORUM 2009, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie , 2009, Volume 38, IX, 125-126,DOI: 10.1007/978-3-642-00625-8_48.

2. Moritz Schmelzle, Levent Dizdar, Hanno Matthaei, Stephan E. Baldus, Judith Wolters, Nina Lindenlauf, Ingmar Bruns, Ron-Patrick Cadeddu, Feride Kröpil, Stefan A. Topp, Jan Schulte am Esch, Claus F. Eisenberger, Wolfram T. Knoefel, Nikolas H. Stoecklein: Esophageal cancer proliferation is mediated by cytochrome P450 2C9 (CYP2C9). Prostaglandins and Other Lipid Mediators (2011), doi: 10.1016/j.prostaglandins. 2010.12.001

Düsseldorf, den 25.01.2011