

Aus der
Klinik für Allgemein, Viszeral- und Kinderchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

Untersuchung zur EpCAM-Expression beim ösophagealen
Plattenepithelkarzinom mit Hilfe der TMA-Technologie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Judith Regina Wolters

2011

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

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

Referent: Prof. Dr. med. Nikolas Hendrik Stoecklein

Korreferent: Prof. Dr. med. Stephan Ernst Baldus

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Tumoren des Ösophagus	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	2
1.1.3 Klassifikation	6
1.1.4 Diagnostik und Therapie	9
1.1.5 Prognose	13
1.2 Das epitheliale Zell-Adhäsionsmolekül (EpCAM)	15
1.2.1 Nomenklatur und Struktur	15
1.2.2 Vorkommen und mögliche physiologische Bedeutung	16
1.2.2.1 Expression von EpCAM im gesunden Gewebe	17
1.2.2.2 Expression von EpCAM in humanen Karzinomen	17
1.2.3 Das EpCAM-Protein als Zielantigen für einen therapeutischen Ansatz	19
2 FRAGESTELLUNG	21
3 MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 Tumorproben	22
3.2 Material	23
3.2.1 Puffer und Lösungen	23
3.2.2 Substanzen und Geräte	23
3.3 Methoden	24
3.3.1 Tissue Micro Array (TMA)	24
3.3.2 Immunhistochemie	29
3.3.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung	33
3.3.4 Statistische Analyse	36

4	ERGEBNISSE	38
4.1	Patientenkollektiv	38
4.1.1	Geschlecht und Alter	38
4.1.2	Histopathologische Parameter	38
4.2	Überprüfung der Gewebestanden des TMA	39
4.3	Analyse der Expression von EpCAM	39
4.3.1	Analyse der EpCAM-Expression in gesundem Gewebe	39
4.3.2	Analyse der EpCAM-Expression im Karzinom	40
4.3.2.1	Analyse der EpCAM-Expression nach dem HercepTest™	40
4.3.2.2	Analyse der EpCAM-Expression nach dem Immunreaktiven Score (IRS)	41
4.3.2.3	Vergleichende Analyse zentraler und peripherer Tumoranteile	42
4.3.2.4	Analyse der EpCAM-Expression in Lymphknotenmetastasen	43
4.3.2.5	Heterogenität der EpCAM-Expression	44
4.4	Korrelation der EpCAM-Expression mit der TNM-Klassifikation	45
4.5	Korrelation der EpCAM-Expression mit Alter und Geschlecht der Patienten	49
4.6	Überlebensanalyse	50
4.6.1	Überleben in Abhängigkeit von der EpCAM Expression	50
4.6.2	Überleben in Abhängigkeit von histopathologischen Parametern	52
5	DISKUSSION	54
5.1	Prävalenz der EpCAM-Expression und Korrelation mit histopathologischen Parametern	55
5.2	EpCAM als prognostischer Faktor	56
5.3	Die mögliche Rolle von EpCAM bei der Tumorprogression von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus	59
5.4	EpCAM als mögliche therapeutische Zielstruktur beim Ösophaguskarzinom	61
6	ZUSAMMENFASSUNG	64
7	LITERATURVERZEICHNIS	66
8	ANHANG	76

8.1 Danksagung	77
8.2 Abbildungsverzeichnis	78
8.3 Tabellenverzeichnis	79
8.4 Abkürzungsverzeichnis	80
9 LEBENSLAUF	81
9.1 Veröffentlichungen	82

1 Einleitung

1.1 Tumoren des Ösophagus

1.1.1 Epidemiologie

Bei dem Ösophaguskarzinom handelt es sich um einen sehr aggressiven Tumor mit ausgesprochen schlechter Prognose. Diese beruht nicht zuletzt auf der meist späten Diagnosestellung, da diese Tumorerkrankung ein langes symptomfreies Intervall aufweist. Es liegt häufig bereits zum Diagnosezeitpunkt ein metastasiertes Stadium vor, das nach wie vor unheilbar ist. Jedoch kommt es auch bei Patienten mit klinisch lokalisierter Erkrankung und trotz kurativer Therapieansätze häufig zu Rezidiven.

Das Ösophaguskarzinom gehört insgesamt betrachtet zu den selteneren Tumorarten. Im internationalen Vergleich der Todesfälle durch Krebserkrankungen steht es an sechster Stelle [1, 2]. In Deutschland erkranken jährlich etwa 3.900 Männer und 1.050 Frauen an malignen Tumoren des Ösophagus. Dies entspricht einem Anteil von weniger als 2% an allen Malignomen bei Männern und einem halben Prozent bei Frauen. Derzeit erkranken Männer in Deutschland etwa drei Mal häufiger und im Median 4,5 Jahre früher als Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter bei Männern liegt bei 65 Jahren, das für Frauen bei 70 Jahren [3].

Im EU-Vergleich liegen die deutschen Erkrankungsraten im mittleren Bereich. Die höchsten Raten finden sich bei Männern in Frankreich, Ungarn und Großbritannien, bei Frauen in Großbritannien, Irland und den Niederlanden. Die niedrigsten Erkrankungsraten werden bei Männern in Finnland, Schweden und Griechenland, bei den Frauen in Estland, Griechenland und der Slowakei gefunden [4]. Männer haben ein 3-4fach höheres Risiko ein Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zu entwickeln als Frauen. Für US-Amerikaner afrikanischer Abstammung wurde ein mehr als 5fach höheres Risiko für die Erkrankung beschrieben als für Kaukasier [5]. Die mit 30-

800/100.000 höchsten Inzidenzen weltweit finden sich in Regionen des Nordiran, im Süden Russlands und Nordchina [6]. Insgesamt betrachtet tritt die Hälfte aller ösophagealen Plattenepithelkarzinome in China auf. In Teilen des Landes wurden jährliche Mortalitätsraten von 151/100.000 bei Männern und 115/100.000 bei Frauen verzeichnet [7].

Betrachtet man das Vorkommen der beiden wesentlichen Tumorentitäten, lassen sich ebenfalls geographische Unterschiede feststellen: In den Vereinigten Staaten liegt die Inzidenz des Ösophaguskarzinoms bei 6/100.000. Während dort in den siebziger Jahren noch 75% der Tumoren des Ösophagus den Plattenepithelkarzinomen zugerechnet wurden, hat die exponentielle Zunahme der Adenokarzinome diese zu den heute häufigsten Karzinomen der Speiseröhre in den Vereinigten Staaten werden lassen [8, 1, 9]. In Deutschland hingegen ist zwar ebenfalls eine Zunahme der Karzinomfälle der Speiseröhre zu verzeichnen, jedoch verhält sich der Anteil der Plattenepithelkarzinome mit 80% weitgehend konstant [10].

Benigne Tumoren der Speiseröhre sind eine Seltenheit. Sie machen lediglich 3% aller Neubildungen des Organs aus und es handelt sich in den meisten Fällen um Leiomyome, seltener um Fibrome oder Lipome.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Bei über 90% der Malignome des Ösophagus handelt es sich um Plattenepithelkarzinome oder Adenokarzinome. Neben den typischen ösophagealen Plattenepithelkarzinomen gibt es noch seltenere Varianten, wie die Spindelzellkarzinome, verukköse und basaloide Plattenepithelkarzinome.

Eine in der Gesamtheit der Ösophagustumoren untergeordnete Rolle spielen Melanome, Leiomyosarkome wie die GIST-Tumoren, Carcinoide und Lymphome, die anteilig 5% ausmachen [11]. Die Pathogenese von Malignomen der Speiseröhre ist als multifaktoriell zu betrachten und es gibt eine Vielzahl von Noxen, die mit Ihrer Entstehung assoziiert sind.

Plattenepithelkarzinome machen in Deutschland etwa 80% aller Tumoren der Speiseröhre aus und können entlang der gesamten Schleimhaut des Organs auftreten. Meist findet man diese Entität allerdings im oberen und mittleren Ösophagusdrittel, wobei die physiologischen Engen des Muskelschlauches Prädilektionsstellen darstellen [12]. Im Bereich von Strikturen, wie sie etwa nach Verätzungen entstehen, treten Plattenepithelkarzinome ebenso gehäuft auf wie bei Erkrankungen, die die Passage des Nahrungsbreies verzögern, beispielhaft bei der Achalasie [13, 14]. Divertikel der Speiseröhre prädisponieren ebenfalls für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms. Als Vorläuferläsion zeigen sich hier die flache (low-grade) und die „high-grade“ intraepitheliale Neoplasie, die bereits endoskopisch diagnostizierbar ist. Diese stellt den wichtigsten Risikofaktor für das ösophageale Plattenepithelkarzinom dar [15].

In den westlichen Ländern stellen chronischer Alkohol- und Nikotinabusus die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung des ösophagealen Plattenepithelkarzinoms dar [14, 16]. Daten aus Tierversuchen geben Hinweis darauf, dass Substanzen aus Zigarettenrauch und der gastroösophageale Reflux einen oxidativen Schaden am Epithel verursachen, der im Wesentlichen zu chronischer Inflammation und Ösophagitis führt und somit die Zellneubildungsrate steigert [17]. Dies wiederum erhöht die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung der Epithel- und der Drüsenzellen. Alkohol führt hierbei vermutlich zu einer Hyperregeneration des Epithels, wobei die beim Rauchen entstehenden Karzinogene, wie die Nitrosamine, mit dem Speichel auf das hyperregeneratorische Epithel einwirken. Die beiden Noxen potenzieren sich also gegenseitig.

Im Fernen Osten gehören hingegen heiße Getränke und Speisen sowie mit der Nahrung aufgenommene Pilztoxine zu den wichtigeren kanzerogenen Noxen [17]. Weitere Ursachen für eine chronische Schleimhautirritation der Speiseröhre stellen die Achalasie und ösophageale Divertikel dar, da hier durch Nahrungsretention und deren bakterielle Zersetzung die Epithelzellen chemisch gereizt werden [18]. Analog zur Entwicklung intraepithelialer Neoplasien der

Schleimhaut des Genitaltraktes, wird eine Beteiligung des humanen Papillomavirus (HPV) und des Epstein-Barr-Virus (EBV) bei der Entstehung des Ösophaguskarzinoms diskutiert [19, 20]. Die bislang einzige genetische Erkrankung, die nachgewiesenermaßen mit einem erhöhten Risiko für ein Plattenepithelkarzinom des Ösophagus einhergeht, ist das Nichtepidermolytische palmoplantare Keratoderm, auch Tylosis genannt. Charakterisiert durch eine druckunabhängige Verdickung der Hand- und Fußflächen sowie einer Verdickung der Mundschleimhaut, geht es zusätzlich mit einem 95%igen Risiko für ein Plattenepithelkarzinom des Ösophagus im durchschnittlichen Alter von 70 Jahren einher [21]. Zuletzt bleibt als pathogenetisch relevant ein geringer sozioökonomischer Status mit Mangelzuständen an Vitamin A, Folsäure und Spurenelementen zu nennen sowie das Plummer-Vinson-Syndrom, welches unter anderem durch Eisenmangelanämie und Dysphagie charakterisiert ist. Durch verbesserte Ernährungszustände ist dieses Krankheitsbild selten geworden. Die Radiotherapie des Mediastinums, wie sie zum Beispiel bei der Therapie des Mammakarzinoms und von Lymphomen angewandt wird, besitzt sowohl Relevanz für die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms als auch für das Adenokarzinom. Adenokarzinome machen etwa 20% der Tumoren des Ösophagus aus. Sie sind vor allem im unteren Drittel der Speiseröhre und in der Region des ösophagogastralen Überganges zu finden. Diese Tumoren entstehen meist auf dem Boden eines Barrett-Syndroms. Adenokarzinome weisen zurzeit die höchste Zuwachsrates aller bösartigen Tumoren auf [22].

Für die ösophagealen Adenokarzinome gilt eine völlig andere Pathogenese als für die Plattenepithelkarzinome. Hier spielt vor allem der gastroösophageale Reflux (GERD) von Gallensäuren eine Rolle, der das Risiko einer Karzinomentstehung um das Achtfache steigert [23]. Übergewicht stellt in der westlichen Welt aufgrund des gesteigerten intraabdominellen Druckes einen Risikofaktor für die Refluxerkrankung dar, wobei hiervon gemäß einiger Studien überwiegend Frauen betroffen sind [24]. Eine Refluxösophagitis entsteht häufig

auf dem Boden von Infektionen, Verätzungen oder einer Insuffizienz des unteren Ösophagussphinkters mit resultierendem Reflux. Die Relaxation dieses Muskels, verursacht durch Medikamente wie Anticholinergika und β -Blocker, trägt zu bis zu 10% der so entstehenden Adenokarzinome bei [23].

Die entstandene Refluxösophagitis kann in eine intestinale Metaplasie übergehen, bei der normales Plattenepithel durch intestinales Zylinderepithel, welches gastrale Foveolarzellen und Becherzellen aufweist, ersetzt wird. Diese Metaplasie wird Endobrachyösophagus oder Barrett-Syndrom genannt und gilt als Präkanzerose für das ösophageale Adenokarzinom [23]. Von den Patienten die ein Adenokarzinom entwickeln, weisen 77% eine Barrett-Mucosa auf [25]. Nachfolgende Mutationen können nun in eine Dysplasie übergehen. Mit dieser neoplastischen Transformation ist mit einer jährlichen Rate von 0,5% zu rechnen.

Tabelle 1-1: Übersicht der Risikofaktoren, die mit den beiden häufigsten Ösophaguskarzinom - Typen assoziiert sind

<i>Risikofaktor</i>	<i>Plattenepithelkarzinom</i>	<i>Adenokarzinom</i>
Nikotinabusus	+++	++
Alkoholabusus	+++	-
Barrett-Metaplasie	-	++++
Wöchentlicher Reflux	-	+++
Übergewicht	-	++
Armut	++	-
Achalasie	+++	-
Verätzung des Ösophagus	++++	-
Tylosis palmaris et plantaris	++++	-
Plummer-Vinson Syndrom	++++	-
Z.n. Kopf- und Halstumoren	++++	-
Z.n. Mammakarzinom und Radiotherapie	+++	+++
Häufige Zufuhr sehr heißer Getränke	+	-
β -Blocker-, Anticholinergika-Einnahme	-	+/-

Legende zu Tabelle 1-1:

- + Risikoanstieg um einen Faktor kleiner 2
- ++ Risikoanstieg um einen Faktor 2-4
- +++ Risikoanstieg um einen Faktor 4-8
- ++++ Risikoanstieg um einen Faktor größer 8

(Quelle: Enzinger et al. Review Article, N Engl J Med, 2003) [8]

1.1.3 Klassifikation

Die Klassifikation der Ösophaguskarzinome erfolgt typischerweise nach dem TNM-/ bzw. pTNM-System, welches seit 1950 von der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) weitergeführt wird und welches auch von dem *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) und der *International Society for Diseases of the Esophagus (ISDE)* verwendet wird. In die Beurteilung einbezogen werden die Lokalisation des Tumors, der histomorphologische Typ und der Differenzierungsgrad sowie die Tumorausbreitung und das Vorhandensein von Residualtumor nach chirurgischer Therapie. Die TNM-Klassifikation stellt die klinische Einordnung des Tumors gemäß der diagnostizierbaren Kriterien dar (cTNM), während die pTNM-Klassifikation nach der histologischen Aufbereitung und Untersuchung des Operationspräparates erfolgt. Aufgrund des fehlenden Serosaüberzuges des Ösophagus kommt es zu einem frühzeitigen, infiltrativen Wachstum der Karzinome in benachbarte Strukturen.

Tabellen 1-2: TNM - Klassifikation von Tumoren des Ösophagus (UICC 2002) und des American Joint Committee on Cancer Staging System [26]

<i>T/pT</i>	<i>Primärtumor</i>
TX	Der Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Es besteht kein Hinweis auf einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumorinfiltration in Lamina propria oder Submucosa

T2	Tumordinfiltration in Muscularis propria
T3	Tumordinfiltration in Adventitia
T4	Tumordinfiltration in Nachbarstrukturen

Durch die longitudinal verlaufenden intramuralen Lymphgefäße kann eine schnelle Ausdehnung des Tumors mit Lymphknotenmetastasen erfolgen.

N/pN	<i>Regionäre Lymphknotenmetastasen</i>
NX	Die regionären Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Es finden sich keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Es finden sich regionäre Lymphknotenmetastasen *

* In der neuen pTNM-Klassifikation (2002) der UICC werden die Tumoren des zervikalen und intrathorakalen Übergangs getrennt definiert:

Für Karzinome des unteren Ösophagus zählen die perigastrischen Lymphknoten, mit Ausnahme der zöliakalen Lymphknoten, noch zu den regionären Lymphknoten. Dahingegen zählen für Karzinome des oberen Ösophagus die zervikalen Lymphknoten zu den regionären Lymphknoten.

Fernmetastasen finden sich bei proximalen Tumoren vor allem in der Lunge, bei distalen Tumoren vor allem in der Leber. Skelettmetastasen treten erst in fortgeschrittenen Stadien auf. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren kommt es häufig zu einer Peritonealkarzinose.

M/pM	<i>Fernmetastasen</i>
MX	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Es finden sich keine Fernmetastasen
M1	Es liegen Fernmetastasen vor
<i>Tumoren des unteren thorakalen Ösophagus</i>	
M1a	Metastasen in zöliakalen Lymphknoten
M1b	Andere Fernmetastasen
<i>Tumoren des mittleren thorakalen Ösophagus</i>	
M1a	Nicht anwendbar
M1b	Befall nicht-regionaler Lymphknoten oder andere Fernmetastasen

<i>Tumoren des oberen thorakalen Ösophagus</i>	
M1a	Metastasen in zervikalen Lymphknoten
M1b	Andere Fernmetastasen

Das Ausmaß der Entdifferenzierung der Tumorzellen reicht von hoch differenzierten Tumoren mit Verhornung und niedrigem Proliferationsindex (G1) bis hin zu gering differenzierten Tumoren mit ausgeprägter Kernpolymorphie und hoher Mitoseaktivität (G3) [11].

G	<i>Grading</i>
G1	Gut differenziert
G2	Mäßiggradig differenziert
G3	Schlecht differenziert

Die vom AJCC etablierte klinische Stadieneinteilung fasst die TNM-Klassifikation zusammen und lässt die Prognose eines Patienten abschätzen.

Stadium	TNM-Klassifikation		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIA	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
Stadium III	T3	N1	M0
	T4	jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1
Stadium IVA	jedes T	jedes N	M1a
Stadium IVB	jedes T	jedes N	M1b

Bei Tumoren die ein lokal fortgeschrittenes Wachstum aufweisen werden drei Grundtypen unterschieden: Polypöses, ulzeröses und infiltratives Karzinom. Die *Japanese Society for Esophageal Diseases* unterteilt Tumoren deren Wachstum auf die Mukosa oder Submukosa beschränkt bleibt analog zum

Magenfrühkarzinom in flache, exophytisch oder exkaviert wachsende Karzinome. Diese Unterscheidung besitzt Relevanz in der Therapieplanung, da eine endoskopische Mukosaresektion exophytisch und exkaviert wachsender Karzinome zumeist nicht in Betracht kommt [27].

1.1.4 Diagnostik und Therapie

Leitsymptome des Ösophaguskarzinoms sind Dysphagie und Odynophagie. Die damit verbundene Gewichtsabnahme zeigt eine ungünstige Prognose an, besonders wenn der Gewichtsverlust mehr als 10% des Körpergewichts ausmacht [28]. Weitere Charakteristika der Erkrankung können Anämie, rezidivierende Aspiration von Speisen, sowie Pleuraerguss, Aszites und das Horner-Syndrom sein, die je nach Lokalisation des Tumors ein fortgeschrittenes Tumorstadium anzeigen [14].

Die Diagnostik beinhaltet eine strukturierte Staginguntersuchung, zu der neben einer eingehenden körperlichen Untersuchung, Röntgenübersichtsaufnahmen in zwei Ebenen, Kontrastmittelbreischluck, Endoskopie, Endosonographie, Computertomographie von Thorax und Abdomen und die Skelettszintigraphie, sowie Laboruntersuchungen gehören. Bei unklaren bildgebenden Befunden in Kombination mit verdächtigen Symptomen werden zytologische Abstriche und Biopsien der Ösophagusschleimhaut entnommen [29]. Sobald der Tumor lokalisiert und histopathologisch klassifiziert wurde, erfolgt die exakte Bestimmung der lokalen Ausdehnung. Dafür empfiehlt sich die transösophageale Endosonographie, mit der mit einer Sicherheit von 89% regionäre Lymphknotenmetastasen erfasst werden können [30]. Zur Identifikation von Lymphknoten- und Fernmetastasen ist nach wie vor die Computertomographie von Thorax und Abdomen Methode der Wahl. Die Positronenemissionstomographie (PET) befindet sich noch in klinischer Erprobung, wurde aber schon für das Staging von potenziell operablen Ösophaguskarzinomen verwendet, sowie für die Verlaufskontrolle nach Chemotherapie und Induktions-Radiotherapie [31]. Für Tumoren des unteren

Ösophagusdrittels gilt es besonders zöliakale, aortale und retroperitoneale Lymphknotenmetastasen auszuschließen, sowie mögliche Lebermetastasen. Bei Tumoren des oberen und mittleren Ösophagus sollte zusätzlich eine Bronchoskopie erfolgen, um eine tracheale Beteiligung auszuschließen. Die Laparoskopie und Mediastinoskopie stellen weitere Methoden dar um kleinere, mittels CT nicht detektierbare Lymphknotenmetastasen aufzuspüren [32]. Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen empfiehlt sich weiterhin eine HNO-ärztliche Untersuchung zum Ausschluss von Zweittumoren kranial der Speiseröhre durchzuführen. Als Verlaufsparemeter können die Tumormarker SCC, CA 19-9 (Adenokarzinom) und Zytokeratine (CYFRA 21-1, TPA, TPS) herangezogen werden. Insgesamt spielen diese Marker in der Diagnostik und im Management der Erkrankung eine untergeordnete Rolle [33].

In Zusammenschau mit Begleiterkrankungen des Patienten muss nun über einen primär kurativen oder primär palliativen Therapieansatz entschieden werden. Eine primär kurative Therapie wird bei lokal begrenzten Tumoren angestrebt, ohne das Vorliegen von Fernmetastasen. Diese Zielsetzung kommt lediglich in ca. 1/3 der Fälle in Frage. Hierbei wird versucht eine chirurgische R0-Resektion zu erzielen, wobei regionäre Lymphknoten mit entfernt werden. Bei Vorliegen einer ausgedehnten lokoregionären Tumorausbreitung muss von Fall zu Fall entschieden werden, ob eine R0-Resektion möglich erscheint. Die Möglichkeit zur neoadjuvanten Therapie bei organüberschreitendem Wachstum des Primarius, mit Infiltration angrenzender Strukturen zwecks Reduktion der Tumorgöße im Sinne eines Downstaging, stellt eine weitere Option dar. In 70-80% der Fälle eines fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinoms kann durch den präoperativen Einsatz einer Radiochemotherapie die Möglichkeit zur R0-Resektion geschaffen werden. Liegt eine Fernmetastasierung vor, ist zumeist eine kurative Zielsetzung nicht mehr möglich [28, 34].

Die thorako-abdominale en-bloc-Ösophagektomie stellt heute das Resektionsverfahren der Wahl dar. Dies beruht nicht zuletzt auf longitudinal verlaufenden Metastasierungswegen entlang der anatomischen Vorgabe der Lymphbahnen. Neben der Resektion der Speiseröhre wird bei Tumoren unterhalb der Trachealbifurkation der Rest-Ösophagus mit dem hochgezogenen

Magenschlauch anastomosiert. Liegt der Tumor oberhalb der Bifurkation der Carina, wird in einem so genannten Dreihöhleneingriff der zervikale Ösophagus freigelegt und es wird eine zervikale Anastomose geschaffen. Beiden Varianten schließt sich eine radikale abdominelle und mediastinale Dissektion der regionären Lymphknoten an, bei hohem Tumorsitz zusätzlich eine zervikale Lymphadenektomie (engl. *neck dissection*). In jedem Fall sollte der ösophageale Schnitttrand im intraoperativen Schnellschnitt tumorfrei sein, denn einen Konsens bezüglich eines Sicherheitsabstandes nach oral gibt es bis heute nicht [14].

Alternative Resektionsverfahren, zum Beispiel bei Kontraindikationen zur Thorakotomie, stellen die Transmediastinale stumpfe Ösophagektomie dar, sowie, bei extrem hoch sitzendem Karzinom mit Übergriff auf den Larynx, die pharyngo-ösophageale Segmentresektion mit Laryngektomie, bleibendem Tracheostoma und Jejunuminterponat. Diesem Verfahren geht eine neoadjuvante Radiochemotherapie voraus. Insgesamt liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate nach alleiniger chirurgischer Therapie insgesamt bei 15-20% [8]. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befinden sich mehr als 80% der Patienten bereits in fortgeschritteneren Stadien der Erkrankung. Es zeigen sich nach alleiniger chirurgischer Therapie im Stadium IIB und III Fünf-Jahres-Überlebensraten von 20-40% und im Stadium IV von weniger als 10% [34, 35]. Die beiden weiteren wesentlichen Therapieoptionen, Strahlentherapie und Chemotherapie, wiesen sowohl als Monotherapien, als auch in Kombination miteinander, keine Verbesserung gegenüber den operativen Konzepten auf [36]. Die Chemotherapie allein zeigte zwar ein gutes Ansprechen der Tumore, jedoch blieben die Fünf-Jahres-Überlebensraten davon unbeeinflusst [34]. Durch kombinierte adjuvante oder neoadjuvante Anwendung einer Radiochemotherapie mit chirurgischer Intervention konnte im Vergleich zur alleinigen Resektion bei Patienten mit lokoregionärer Erkrankung keine eindeutige Prognoseverbesserung nachgewiesen werden [25, 35, 37]. Zu beachten bleibt weiterhin die erhebliche Toxizität der Radiochemotherapien [36]. Bezüglich einer präoperativen Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und Fluorouracil und nachfolgender Resektion gibt es Daten, die eine Verbesserung

der Überlebensraten zeigen, im Gegensatz zur alleinigen Resektion [38]. Für einen bedeutsamen prognostischen Einfluss einer präoperativen Strahlentherapie gibt es in der Literatur aktuell keinen Hinweis [39].

Ist ein primär kurativer Therapieansatz aufgrund eines fortgeschrittenen Erkrankungsstadiums nicht möglich, werden multimodale Therapiekonzepte herangezogen, wobei eine Vielzahl von Faktoren bei der Konstruktion des Therapieregimes einbezogen werden müssen. Die Erhaltung eines größtmöglichen Maßes an Lebensqualität für den Patienten an erster Stelle genannt, spielen die Charakteristika des Tumors ebenso eine Rolle, wie die Kapazitäten der jeweiligen medizinischen Einrichtung und die Kosten der Behandlung. Das vornehmliche Ziel ist die Erhaltung oder Wiederherstellung der ösophagogastralen Kontinuität. Hierfür stehen, je nach Obstruktionsgrad, unter anderem die intraluminale Radiotherapie (Brachytherapie), ösophageale Dilatationsverfahren, das Einsetzen eines Stents, sowie die chirurgische Resektion zur Verfügung. In manchen Fällen kann eine perkutane endoskopische Gastrostomie (PEG) die Nahrungszufuhr sicherstellen. Obwohl die chirurgische Intervention in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung kontrovers diskutiert wird, konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Patienten nachhaltig von Dysphagie befreit werden konnten und wieder eine normale Nahrungsaufnahme möglich war [18].

Besonders das Plattenepithelkarzinom hat sich als strahlensensibel erwiesen, mit verstärkendem Effekt durch zusätzliche Applikation von Chemotherapeutika, die die lokale Strahlenwirkung zu verstärken vermögen. Obwohl hohe Remissionsraten mittels entsprechender Strahlendosen (kumulativ 50-60Gy) erzielt werden können, ist eine Kontrolle der Erkrankung hierdurch bisher nicht möglich.

Insgesamt betrachtet jedoch ist das Ösophaguskarzinom nur mäßig sensibel gegenüber Chemotherapeutika. Monotherapien haben hierbei die Überlebenszeiten im Vergleich zu alleiniger Supportivtherapie nicht gesteigert. Jedoch wiesen bislang Kombinationen aus Cisplatin und Fluorouracil im fortgeschrittenen Krankheitsstadium Ansprechraten von bis zu 35% auf und bei lokoregionär begrenzten Tumoren sogar bis zu 75% [34]. Jüngste Daten deuten

darauf hin, dass neuere Substanzen wie Vincaalkaloide (Vinorelbin) und Taxane auf effektivere Therapieregimes hoffen lassen [40-42].

1.1.5 Prognose

Insgesamt betrachtet gehört das Ösophaguskarzinom mit einer durchschnittlichen Fünf-Jahres-Überlebensrate von unter 20-25%, zu den Malignomen mit der schlechtesten Prognose. Dies beruht nicht zuletzt auf einer meist späten Diagnosestellung, da erkrankte Patienten ein langes symptomfreies Intervall aufweisen und zum Zeitpunkt der Diagnose in mehr als 50% der Fälle ein metastasiertes Stadium vorliegt [8].

Die Prognose des Ösophaguskarzinoms korreliert eng mit dem Tumorstadium. Als wesentlicher prognostischer Faktor ist neben Blutgefäßinvasion und Lymphangiosis Carcinomatosa, das Vorliegen von Lymphknoten- oder Fernmetastasen zu nennen, was sich in Fünf-Jahresüberlebensraten von weniger als 5% bei Patienten im Stadium IV der Erkrankung widerspiegelt.

Tabelle 1-3: 5 - Jahresüberlebensraten von Patienten mit Ösophaguskarzinomen nach Resektion (Stadien I bis III) bzw. palliativer Chemotherapie (Stadium IVB) gemäß der AJCC - Stadieneinteilung.

0 (Tis)	> 95%
I	50-80%
IIA	30-40%
IIB	10-30%
III	10-15%
IVA	< 5%
IVB	< 1%

(Quelle: Enzinger et al., N Engl J Med, 2003) [8]

Die Überlebensraten bei Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen verhalten sich weitgehend äquivalent [1], wobei gezeigt werden konnte, dass Patienten mit Adenokarzinomen bessere Langzeitüberlebensraten nach

Resektion aufweisen, als solche mit Plattenepithelkarzinomen [43]. Dies lässt sich unter anderem auf das Spektrum an Begleiterkrankungen von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen zurückführen. Entsprechend der ätiologischen Faktoren liegen hier häufiger kardiale und respiratorische Komorbiditäten vor, während Patienten mit Adenokarzinomen oftmals Übergewicht als Risikofaktor für eine Operation zeigen [44]. Des Weiteren finden sich bei 10% der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen Zweittumoren, oft der Atemwege und Lungen. Dank verbesserter Operationstechniken und einem optimierteren perioperativen Management liegt die Mortalitätsrate der Ösophagektomie bei circa 3 %. Ein entscheidender Schritt zur Prognoseverbesserung ösophagealer Karzinome wäre eine Früherkennung. Aufgrund der verhältnismäßigen Seltenheit dieser Tumoren, wird ein solches Unterfangen unter ökonomischen Gesichtspunkten voraussichtlich keine Bedeutung erlangen. Daher liegt die Perspektive in einer Verbesserung der derzeitigen Therapieregimes und der Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen, um die Überlebensraten von Patienten mit Ösophaguskarzinomen in Zukunft zu steigern.

1.2 Das epitheliale Zell-Adhäsionsmolekül (EpCAM)

1.2.1 Nomenklatur und Struktur

EpCAM („epithelial cell adhesion molecule“) ist ein 40 kD großes Typ 1 Transmembranglykoprotein, welches calciumunabhängige, homophile Zell-Zell-Adhäsionen vermitteln kann [45]. Es wird auf dem EPCAM-Gen kodiert [46], welches sich auf Chromosom 2p21 befindet [47]. EpCAM wurde aufgrund seiner mehrfachen, voneinander unabhängigen Entdeckung, unter den Synonymen DIAR5, EGP-2, EGP314, EGP40, ESA, GA733-2, HNPCC8, KSA, M4S1, MIC18, MK-1, TACSTD1 und KS1/4 geführt, wobei kürzlich der Name EpCAM mit einer definierten Schreibweise als allgemeingültige Nomenklatur, etabliert wurde. Als weiteres Synonym wurde ein Marker für die zelluläre Differenzierung vorgestellt, mit der Bezeichnung CD326 [46]. Aufgrund von strukturellen Unterschieden zu anderen transmembranen Adhäsionsmolekülen, wie den Cadherinen, Integrinen, Selektinen und der Immunglobulin Superfamilie, wird EpCAM keiner dieser Familien zugerechnet [47]. Jedoch verfügt EpCAM, wie viele andere Transmembranproteine die in die Zelladhäsion und Signaltransduktion involviert sind, über eine extrazelluläre Domäne mit zwei EGFR-ähnlichen Domänen. Neben der extrazellulären Domäne verfügt EpCAM über einen transmembranen Anteil, bestehend aus 23 Aminosäuren und eine kurze zytoplasmatische Domäne, die mehrere Bindungsstellen für α -Aktinin beinhaltet [47, 48]. Die zytoplasmatische Domäne von EpCAM kann über spezifische Bindungsstellen direkt mit α -Aktinin interagieren [49]. Des Weiteren ist die zytoplasmatische Domäne an der Regulierung von Cadherin-vermittelten Adhäsionen beteiligt [47].

1.2.2 Vorkommen und mögliche physiologische Bedeutung

EpCAM wurde bereits 1979 auf der Oberfläche von Karzinomzellen des Gastrointestinaltraktes detektiert und wurde als eines der ersten tumorassoziierten Antigene beschrieben [50, 51].

Das Molekül wird physiologischerweise beim Menschen an der basolateralen Zelloberfläche der meisten Gewebe epithelialer Herkunft exprimiert. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Heraufregulation von EpCAM mit einer Herabregulierung von E-Cadherin-vermittelten Zellkontakten einhergehen kann und es zu einer gesteigerten Proliferation von Tumorzellen kommt [52]. Sowohl E-Cadherin als auch EpCAM vermitteln Adhäsionen an unterschiedlichen Strukturen der Zelle. Während EpCAM an der Basalseite der Zelle flexible Zellverbindungen gewährleistet, stellt E-Cadherin stabile Strukturkomplexe apikal her [47]. Bei hoher EpCAM-Expression kommt es durch die Wechselwirkung von EpCAM mit α -Aktinin zur Störung der α -Aktin-F-Actin Wechselwirkung [53] und somit zu einer Reduktion der E-Cadherin-vermittelten Adhäsion von Zellen [54]. In Epithelzellen könnte somit der Ersatz von E-Cadherin-vermittelten Zellkontakten durch EpCAM zur Umwandlung von benignen Zellen zu invasiven Karzinomzellen, mit der Möglichkeit zur Metastasierung beitragen [55].

Neben der Wechselwirkung mit α -Aktinin sind weitere Interaktionspartner bekannt, wie Tetraspanin D6.1A und Claudin-7, wodurch EpCAM nicht nur die Adhäsion, sondern auch Apoptose-Resistenz und vermutlich die Metastasierung auf unterschiedliche Weise beeinflussen könnte [48, 56]. In jüngsten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass EpCAM direkt onkogene Signalfunktionen aufweist, also in der Lage ist, selbst Signale in den Zellkern zu vermitteln und somit die Expression von Genen zu regulieren [57] [58]. Eine zusätzliche Rolle in der Funktionsweise von EpCAM spielt wahrscheinlich der Grad der Glykosylierung des Moleküls im Tumorgewebe. Aus Untersuchungen

an Geweben des Kopf-Hals-Bereiches ist bekannt, dass EpCAM in gesundem Epithel hauptsächlich schwach glykosyliert, im Tumorgewebe dagegen hyperglykosyliert vorliegt [59]. Die biologische Bedeutung dieses Phänomens ist bislang jedoch weitgehend ungeklärt.

1.2.2.1 Expression von EpCAM im gesunden Gewebe

EpCAM ist ein epitheliales Protein. Sein Expressionsmuster in ausdifferenzierten epithelialen Geweben ist jedoch unterschiedlich. In der Magenschleimhaut findet sich eine geringe Expression des Moleküls lediglich im Bereich der Krypten, wohingegen diese im Dünndarm stärker ausgeprägt ist und sich im Colon als die stärkste Expression von EpCAM überhaupt darstellt. Deutlich EpCAM-positiv sind weiterhin die Organe des endokrinen Systems wie Schilddrüse, Nebenschilddrüse und Hypophyse sowie die Brustdrüse, Thymus und die Tonsillen [60]. Endozervikales Drüsenepithel des Uterus zeigt ebenfalls eine hohe EpCAM-Expression, wohingegen das ektozervikale Plattenepithel EpCAM-negativ ist. Auch weist normales Plattenepithelgewebe keine Expression von EpCAM auf [47]. Interessanterweise zeigen sowohl embryonale Stammzellen, als auch adulte Vorläuferzellen der Leber, Lunge, Haut und Pankreas, sowie Keimzellen eine starke EpCAM-Expression [48, 61, 62]. Gewebe in denen die EpCAM-Expression völlig fehlt sind die Milz, Skelettmuskel, Gehirn, Gefäße, Bindegewebe und Lymphknoten, sowie vom Knochenmark entstammende Zellen [47].

1.2.2.2 Expression von EpCAM in humanen Karzinomen

Die Funktion von EpCAM in der Tumorentstehung ist noch weitgehend unverstanden. Im Gegensatz zu anderen Zelladhäsionsmolekülen die meist ubiquitär vorkommen, ist EpCAM in gesunden humanen Geweben im Wesentlichen auf einfachen drüsigen Epithelien zu finden. In Tumoren bzw. im Verlauf der Karzinogenese und auch bei inflammatorischen Zuständen kommt

es zu einer Veränderung des ursprünglichen Expressionsmusters. Bei malignen Tumoren findet sich häufig eine *de novo*- oder Überexpression von EpCAM [47]. Die Veränderung des Expressionsmusters in Zusammenhang mit dem Verlauf der Karzinogenese ist unter anderem für Tumore des Kolons und der Zervix beschrieben [47, 52, 63]. Bei letzteren wurde unter anderem eine *de novo*-Expression von EpCAM in verschiedenen Dysplasiestadien von Plattenepithel der Zervix (CIN) nachgewiesen, wobei das normale Zervixepithel strikt EpCAM-negativ ist. Dabei wurde festgestellt, dass der Expressionsgrad von EpCAM proportional zum Grad der Neoplasien von CIN I bis CIN III, ansteigt [52].

Sowohl in Polypen des Colon, als auch in kolorektalen Karzinomen wurde eine vermehrte EpCAM-Expression gegenüber der bereits EpCAM-positiven Darmschleimhaut beobachtet [64, 65].

Immunhistochemische Untersuchungen an Adenokarzinomen und dysplastischem Gewebe des Magens zeigten im Vergleich zur gesunden Magenschleimhaut eine signifikant erhöhte Expression von EpCAM in Stadien maligner Transformation. Bezüglich der untersuchten gastralen Adenokarzinome fand sich eine Korrelation mit der Lauren Klassifikation und dem histologischen Grading, nicht jedoch mit dem Tumorstadium. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen EpCAM-Expression und Metastasierung ergaben sich in diesen Fällen nicht [66]. Jedoch zeigte sich, dass ein Verlust der EpCAM-Expression als unabhängiger Prognosefaktor für eine schlechte Überlebensrate zu werten ist [67]. Dieses Ergebnis steht jedoch im Gegensatz zu verschiedenen anderen Tumorentitäten, bei denen gezeigt werden konnte, dass eine starke EpCAM-Expression mit schlechtem Überleben einhergeht [47, 68-73].

Bisherige Untersuchungen zur EpCAM-Expression beim Ösophaguskarzinom zeigten eine diffuse Expression in der Barrett-Dysplasie und eine hohe Expressionsrate in Adenokarzinomen [74]. Das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zeigt in der Mehrzahl der Fälle eine EpCAM-Expression. Hier wurde ein Zusammenhang vom Grad der Expression mit einem kürzeren rezidivfreien

Intervall und verminderter Überlebenszeit beobachtet. Diese Ergebnisse wiesen EpCAM eine Rolle als unabhängiger Prognosefaktor für das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zu [75].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in Geweben, die per se über die Expression von EpCAM verfügen, sich oft eine Steigerung dessen Expression im Verlauf einer neoplastischen Veränderung zeigt. Dahingegen findet sich bei EpCAM-negativen Geweben nach der malignen Transformation häufig eine *de novo*-Expression des Moleküls.

1.2.3 Das EpCAM-Protein als Zielantigen für einen therapeutischen Ansatz

Für einige Tumorentitäten lässt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen EpCAM-Überexpression und der Prognose der Erkrankung herstellen. In Studien zu Karzinomen der Mamma, der Gallenblase und des Ovar, wurde EpCAM als unabhängiger prognostischer Faktor für ein kürzeres rezidivfreies Überleben und für das Gesamtüberleben identifiziert [71, 72, 76, 77].

In den letzten Jahren kamen monoklonale Antikörper gegen EpCAM als therapeutischer Ansatz in verschiedenen klinischen Studien zum Einsatz. Seit 1994 war Edrecolomab (Panorex®) in Deutschland für die adjuvante Therapie von Kolonkarzinomen Stadium III zugelassen. In einer Studie an Patienten mit kolorektalen Karzinomen des Stadiums Dukes C konnte eine signifikante Reduktion der Sterblichkeit sowie der Rezidivrate nach adjuvanter Gabe von Edrecolomab gezeigt werden [78, 79]. Darüber hinaus zeigte sich eine gute Verträglichkeit des therapeutischen Antikörpers. In Kombination mit anderen Chemotherapeutika trug es nur in geringem Maße zu Nebenwirkungen bei [80]. Nachfolgende Phase-III-Studien an Patienten mit Colonkarzinomen von Grad III ergaben jedoch, dass der Antikörper in Addition zur herkömmlichen Therapie mit 5-FU/Folinsäure keinen zusätzlichen Überlebensvorteil bietet und keine besseren Ergebnisse als die Therapie mit 5-FU zeigt [81, 82]. Dies führte letztlich zur Marktrücknahme des Antikörperpräparates. Die Diskrepanz

zwischen einem hohen Maß an antikörperabhängiger Zytotoxizität in vitro und den vorliegenden klinischen Ergebnissen wird kontrovers diskutiert. Als muriner Antikörper induziert Ederecolomab eine humorale Immunantwort beim Menschen, die zu einer kurzen Halbwertszeit im Serum führt. Eine reduzierte Kompatibilität mit humanen Effektorzellen wird ebenfalls diskutiert [83]. Es wurden und werden nunmehr humanisierte Antikörper entwickelt, die beim Menschen aufgrund verbesserter Halbwertszeiten einen größeren Effekt versprechen [84].

2 Fragestellung

Malignome des Ösophagus weisen eine extrem schlechte Prognose auf. Mangels Optionen zur gezielten Früherkennung werden diese Tumorerkrankungen meist erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Mit den zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten lässt sich aktuell keine längerfristige Heilung der betroffenen Patienten erzielen. Die Suche nach neuen therapeutischen Zielstrukturen für die adjuvante Therapie ist daher dringend notwendig.

In diesem Zusammenhang scheint das Molekül EpCAM ein interessantes Ziel für molekulare Therapien zu sein. In einer Pilotstudie zeigte sich bereits, dass es beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus häufig zu einer Neo-Expression des Moleküls kommt und dass eine stärkere EpCAM-Expression mit einer schlechten Prognose der Patienten assoziiert war. Dies ist ein Hinweis dafür, dass EpCAM zur Prognose von Ösophaguskarzinomen beitragen könnte.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines größeren und unabhängigen Kollektivs die Frequenz und den Grad der Expression von EpCAM im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zu untersuchen. Um möglichst gleiche Untersuchungsbedingungen für die Analyse zu bieten, wurde für diese Arbeit ein Tissue Micro Array der ösophagealen Plattenepithelkarzinome hergestellt und mit immunhistochemischen Methoden auf die Expression von EpCAM untersucht.

Es sollte eine Korrelation der Ergebnisse mit histopathologischen Parametern erfolgen, sowie die Frage nach einer prognostischen Bedeutung von EpCAM in der vorliegenden Tumorentität evaluiert werden mit dem Ziel die Ergebnisse der Pilotstudie zu validieren.

3 Material und Methoden

3.1 Tumorproben

In das Kollektiv wurden 120 Patienten aufgenommen, die in den Jahren 1986 bis 2006 in den chirurgischen Kliniken der Universitätsklinik Düsseldorf und der Universitätsklinik Köln mit der Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus operiert wurden. Dabei erhielten sie eine potenziell kurative Tumorsektion. Das Tumorgewebe war formalinfixiert und routinemäßig histologisch aufgearbeitet worden. Es lag in Paraffinblöcken eingebettet vor. In allen 120 Fällen wurde histologisch ein Plattenepithelkarzinom des Ösophagus diagnostiziert. Von den ausgewählten Patienten erhielten fünf eine neoadjuvante Radio-, bzw. Chemotherapie.

Die weiteren Auswahlkriterien bestanden in einem M0R0-Status gemäß der für Ösophaguskarzinome gültigen TNM-Klassifikation, basierend auf den Kriterien der UICC [85]. Eine Übersicht der Patientendaten befindet sich im **Anhang (Tabelle 3-1)**. In zwei Fällen zeigte sich eine M1-Situation, sodass für die Überlebenszeitanalyse ein Kollektiv von 118 Patienten zur Verfügung stand. Proben von Lymphknotenmetastasen konnten in 15 Fällen untersucht werden. Ebenfalls wurde normale Ösophagusschleimhaut der Patienten einbezogen. Hierfür fanden sich in 75 Fällen Gewebe, wobei nach Herstellung des Tissue Micro Array und der immunhistochemischen Färbung 60 Proben für die Auswertung zur Verfügung standen.

3.2 Material

3.2.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 3-2: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Rezept
Peroxidase-Block-Lösung	1 ml H ₂ O ₂ 30% ad 100 ml Methanol
PBS (Phosphate Buffered Saline)	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ 0,24 g KHPO ₄ ad 800 ml A. dest pH 7,4 mit HCl, H ₂ O bis 1 Liter
Hämalaun nach Mayer	Gebrauchslösung 109249.2500 Merck, Darmstadt
Eosin G 1%	1 g Eosin Merck, Darmstadt ad 100 ml A. dest 1-2 Tropfen Eisessig

3.2.2 Substanzen und Geräte

Tabelle 3-3: Substanzen und Geräte

Substanzen	Firma
ABC-Kit : Mouse IgG Blocking Serum, Biotinylierter Sekundär-AK, Reagenz A (Avidin), Reagenz B (Biotinylierte Meerrettichperoxidase)	Vectastain® , Vector Laboratories
AB-Serum	Biotest, Dreieich
Aqua dest	
DAB + Substratpuffer; Chromogen	DAKO, Hamburg
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Entellan®	Merck, Darmstadt
EpCAM-Antikörper (Ber-EP4)	DAKO, Hamburg (M0804)
Ethanol 70%, 80%, 96%, 99,5%	Merck, Darmstadt

Fettstift	DAKO, Hamburg
Färbekammer	
Gefrierschrank	Thermo electron corporation, Forma 905
Kamera	Leica DFC 280, 49658
Leitungswasser	
Micro Tissue Arrayer (MTA1)	Beecher Instruments Inc.©, USA
Mikroskop	Leica DMIL, 49775
Mikrotom	Leica SM2000R, 50749
Mouse IgG1 (MOPC-21)	Sigma, Deisenhofen
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel, Braunschweig
Pipettenspitzen	Eppendorf VWR
Pipetten	Eppendorf <i>Reference, Research</i>
SPSS 16.0	SPSS INC.Chicago, USA
Target Retrieval Solution 10x	DAKO, Hamburg
Wärmeschrank	Memmert
Wasserbad	Memmert
Xylol	Merck, Darmstadt

3.3 Methoden

3.3.1 Tissue Micro Array (TMA)

Um ein Patientenkollektiv von 120 Fällen möglichst effektiv auf einen bestimmten immunhistochemischen Parameter hin zu untersuchen, bietet sich die TMA-Technologie an [86]. Hierbei werden Gewebestanzungen aus dem den Primärtumor enthaltenden Paraffinblock gewonnen und in einen Paraffin-Leerblock überführt, der frei von Gewebe ist. Der Vorteil der TMA-Methode ist darin zu sehen, dass viele Proben zur gleichen Zeit und unter identischen Bedingungen auf einen bestimmten Parameter hin untersucht werden. In bisherigen Studien haben sich die so gewonnenen Gewebestanzungen als repräsentativ für ihr Ursprungsgewebe erwiesen [87]. Je nach Größe des Kollektivs und Menge der Gewebestanzungen pro Fall, bieten sich verschiedene

Möglichkeiten des Designs eines TMA, sowie der Wahl eines geeigneten Stanzendurchmessers.



Abbildung 1: Personal Tissue Arrayer (MTA1) Firma Beecher, Sun Prairie, USA

(Quelle: www.beecherinstruments.com)

Vorbereitung des TMA:

Zunächst wurden die betreffenden histologischen Befunde aus dem Institut für Pathologie der Universitätskliniken Düsseldorf und Köln zur Identifizierung der Tumorareale und eventuell vorhandener Lymphknotenmetastasen herangezogen. Die zu den relevanten Paraffinblöcken gehörenden, routinemäßig angefertigten Hämatoxylin-Eosin-Schnitte wurden unter mikroskopischer Kontrolle nach entsprechenden Tumorarealen durchsucht. Jeweils wurde ein Areal des Tumors mit Invasionsfront, eines mit Zentrum, eines mit normalem Epithel und gegebenenfalls eine Lymphknotenmetastase verschieden farblich markiert und umrandet. Diese Markierungen dienten später dem Ansetzen der Stanze.

Jedem Patienten wurde eine Fallnummer zugeordnet, die anstelle der Pathologie-Nummer aus dem Archiv von nun an verwendet wurde. Bei der

Frage nach der Probenanordnung in dem Array, wurde für das Design des TMA folgende Form gewählt:

	Tumor				NG	LKM
Fall-Nummer	61	61	61	61	61	61
Block-Nr.	Patho.-Nr.					
Gewebe	SCC	SCC	SCC	SCC	SCC	SCC
Region	I	I	Z	Z	Ep	LKM
Koordinaten	1,1	2,1	3,1	4,1	5,1	6,1

Abbildung 2: Ausschnittsweise Darstellung des TMA - Designs, beispielhaft für einen Patienten.

Legende zu Abbildung 2:

Ep = normales Epithel

I = Invasionsfront

LKM = Lymphknotenmetastase (regionär)

NG = Normalgewebe

SCC = squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom)

Z = Zentrum

Bezüglich der Größe der Stanzen wurde ein Durchmesser von 1 mm gewählt. Somit sollte das Gewebstück über eine ausreichende Größe verfügen, um das ösophageale Gewebe verlässlich zu repräsentieren [88]. Für alle 120 Fälle wurden, unter wiederholter mikroskopischer Kontrolle, jeweils zwei Stanzen aus der Invasionsfront des Tumors, zwei aus dem Tumorzentrum und eine Stanze aus normalem Ösophagusepithel gewonnen. Die Entnahme von mehr als einer Stanze aus einer Region, gewährleistete einmal mehr die Repräsentation des Gewebes. Wenn vorhanden, wurde Gewebe aus einer Lymphknotenmetastase entnommen. Hierfür war ebenfalls eine ausreichende Größe des Gewebstückes erforderlich.

Mithilfe des in Abbildung 1 dargestellten Tissue Arrayers (MTA1), wurde zunächst aus dem gewebefreien Paraffinblock (Recipient-Block oder Leerblock) eine Paraffinstanze entnommen. Anschließend wurde eine Stanze desselben Formats aus dem vorher farblich markierten Bereich des Donor-Blockes

entnommen. Die Gewebesäule wurde in das eben entstandene Loch des Recipient-Blocks überführt. Dies geschah jeweils unter möglichst wenig Mitnahme von unter dem Gewebstück befindlichem Paraffin. Um die spätere Ausbeute beim Schneiden des TMA möglichst groß werden zu lassen, wurde überschüssiges Paraffin aus der Stanzsäule mit einem Skalpell abgetrennt. Anschließend wurde der Geweberest in das vorgestanzte Loch überführt. Mit einer weiteren Stanze aus dem betreffenden Areal wurde die Stanzhöhle aufgefüllt, bis die Stanztiefe von 4 mm erreicht war.

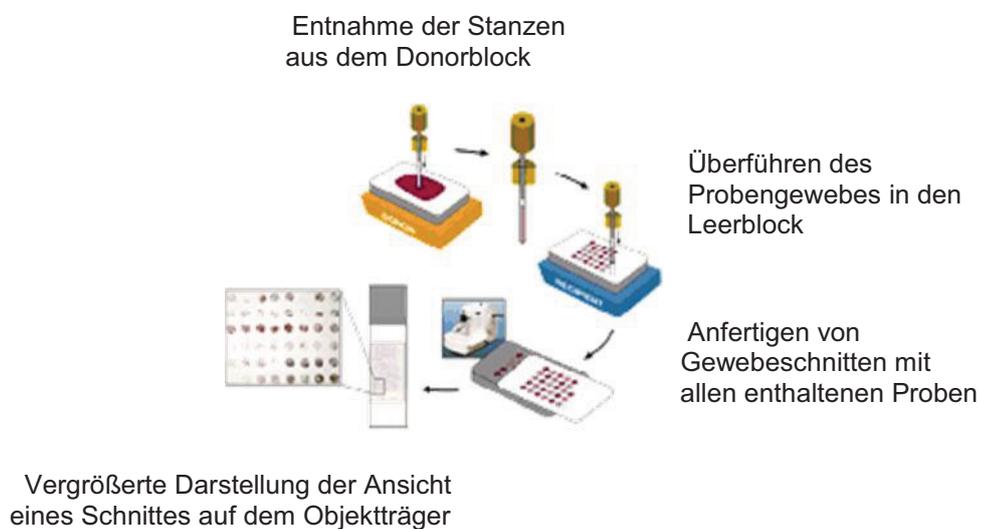


Abbildung 3: Prinzip der Entnahme und Überführung von Gewebestanzten

(Quelle: AlphaMetrix© Biotech)

Zur Erleichterung der späteren Orientierung bei der Auswertung unter dem Mikroskop, wurden jeweils Stanzen von Fremdgewebe seitlich der entstehenden Matrix eingebracht. Hierfür wurde Schilddrüsengewebe und Plazentagewebe verwendet. Die Blocknummern der für die Stanzentnahme verwendeten Paraffinblöcke wurden dokumentiert.

Auf diese Weise entstanden sechs Tissue Micro Array-Blöcke, die jeweils die Gewebeproben von 20 Patienten enthielten.



Abbildung 4: Gefertigte Tissue Micro Array - Paraffinblöcke mit 562 Stanzen aus Tumorgewebe, Normalmucosa und Lymphknotenmetastasen, sowie den oberhalb erkennbaren Stanzen (*) von Fremdgewebe als Orientierungshilfe

Die fertigen Blöcke wurden ca. eine Stunde im Brutschrank erwärmt, damit die Stanzränder sich mit dem sie umgebenden Paraffin verbinden konnten. Anschließend wurden von jedem Block 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf SuperFrost® Plus-vorbehandelte Objektträger aufgezogen wurden. Die Objektträger wurden nun, zur Vorbereitung auf den Färbevorgang, bei 56°C für drei Stunden und anschließend bei 70°C über Nacht in einen Wärmeschrank gebracht. Dies geschah mit dem Ziel, das Paraffin zu erweichen und somit die Haftung der Gewebestanzten am Objektträger zu gewährleisten. Pro TMA-Block wurde jeweils bei einem der Schnitte eine Übersichtsfärbung mit der Hämatoxylin-Eosin Färbung durchgeführt. Dies diente vornehmlich der mikroskopischen Identifikation von tatsächlich gestanzten Tumorarealen und somit als Vergleichsstandard für die immunhistochemische Färbung. Weitere Schnitte wurden für die immunhistochemische Färbung hergestellt.

3.3.2 Immunhistochemie

Das Prinzip der ABC-Methode

Die Avidin-Biotin-Methode gehört zu den indirekten immunenzymatischen Methoden. Es wird die starke Affinität von Avidin oder Streptavidin zu Biotin ausgenutzt. Der spezifisch gebundene unmarkierte Antikörper wird über einen biotin-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen. An das kovalent gebundene Biotin kann nun Avidin binden, das seinerseits drei weitere Biotinbindungsstellen besitzt. Diese können nun durch Meerrettichperoxidase (HRP) besetzt werden, die ihrerseits mit Biotin gekoppelt sind. Hieraus können sich Komplexe bilden, die die Sensitivität der Methode stark erhöhen. Das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wird in Gegenwart von Peroxidase in ein braunes, in Alkohol unlösliches Präzipitat umgesetzt. Die Intensität der Färbung verhält sich proportional zur vorhandenen Antigenmenge [89].

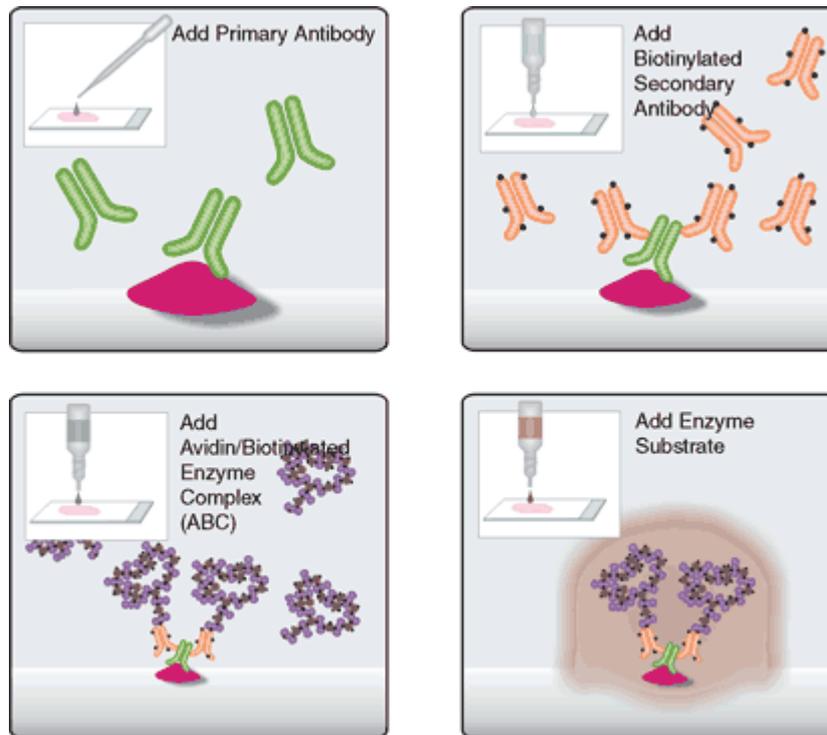


Abbildung 5: Das Prinzip der ABC - Methode

(Quelle: Vector Laboratories, Inc.)

Der Vorteil der ABC-Methode liegt in der hohen Verstärkung des Ausgangssignals und der damit verbundenen hohen Sensitivität [90]. Ihre Spezifität wird durch ein Fehlen endogener Avidinbindungsstellen gesichert [91].

Für die Immunfärbung wurden die primären Antikörper Ber-EP4 [92] gegen EpCAM und MOPC-21 als Negativkontrolle verwendet. Als Positivkontrolle diente Gewebe von Colonmucosa, welches in vorangegangenen Untersuchungen stets eine EpCAM-Expression zeigte. Im Vorfeld erfolgte die Austestung der optimalen Antikörper-Verdünnungen und des übrigen Färberezeptes anhand der Färbung von Negativkontrollen. Es erwies sich eine Antikörperkonzentration von jeweils 2 µg/ml, eine Pipettiermenge von 600 µl pro

TMA-Schnitt, sowie die Verwendung von SuperFrost® Plus-vorbehandelten Objektträgern, als optimal.

Die weiteren Schritte der Färbung werden im Folgenden in Form von Stichpunkten aufgeführt:

- Entparaffinierungsschritte: Die Schnitte wurden jeweils für fünf Minuten in Xylol und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe (2x 99,5%iger, 2x 96%iger, 2x 80%iger und schließlich 1x 70%iger Ethanol) getaucht. Dann wurde fünf Minuten in Aqua dest gespült.
- Demaskierung der Antigen-Epitope mit 1x Retrieval Solution: Die Retrieval Lösung wurde in einem Glasgefäß in einem Wasserbad auf 95°C erhitzt. Die Gewebeschnitte wurden bei dieser Temperatur 30 Minuten lang inkubiert. So wurden die durch die Formalinfixierung verdeckten Epitope wieder zugänglich gemacht.
- Nach der Demaskierung ließ man die Objektträger 20 Minuten bei Raumtemperatur in der Retrieval Lösung abkühlen.
- Es wurde fünf Minuten in 1x PBS gespült.
- Es wurde kurz in Aqua dest gespült.
- Die Objektträger wurden nun abgetrocknet und der Bereich um die Gewebestanzen mit einem Sicherheitsabstand, gleichmäßig mit einem Fettstift umrandet. Dies gewährleistete eine gleichbleibende Konzentration der Antikörper und anderer für die Färbung verwendeter Substanzen auf jeder einzelnen Stanze.
- Nun wurden die Schnitte in eine feuchte Färbekammer überführt und es wurde jeweils 600 µl 1x PBS aufpipettiert.
- Anschließend wurde 30 Minuten mit 0,3%igem H₂O₂ in der feuchten Kammer inkubiert. Dieser Schritt stoppt die Aktivität der endogenen Peroxidase des Gewebes.
- Nun erfolgte ein weiterer Waschschrift für fünf Minuten in 1x PBS.

- In einem weiteren Schritt wurde „Diluted normal Serum“ aufpipettiert. Der Ansatz erfolgte mittels einer Verdünnung des Serums aus dem ABC-Kit mit 1x PBS-Puffer. Während der 20minütigen Inkubation wurden so Proteinbindungen des Gewebes, die nicht spezifisch für den hier verwendeten Antikörper sind, abgedeckt.
- Ansatz des ersten Antikörpers: EpCAM und MOPC-21 wurden mit 10%igem AB-Serum auf eine Konzentration von 2 µg/ml gebracht.
- Es erfolgte die Inkubation der Erst-Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.
- Es folgte ein Waschschrift für fünf Minuten in 1x PBS. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte, die mit dem Ber-EP4-Antikörper gegen EpCAM und die Schnitte die mit dem Kontrollantikörper MOPC-21 behandelt wurden, separat gewaschen wurden.
- Nun erfolgte der Ansatz des zweiten Antikörpers: „Diluted biotinylated secondary antibody solution“ aus dem ABC-Kit, verdünnt mit 1x PBS. Dieser wurde für 30 Minuten inkubiert.
- Waschschrift für fünf Minuten in 1x PBS.
- Ansatz des ABC-Reagenz: Reagenz A und B wurden mit PBS-Puffer verdünnt. Inkubation für 30 Minuten.
- Es folgte ein Waschschrift für fünf Minuten in 1x PBS.
- Nun wurden auf jeden Schnitt jeweils 250 µl DAB-Substrat aufpipettiert und für 10 Minuten inkubiert. Für den Ansatz des Substrates wurde die im Kit bereitgestellte DAB-Solution mit einer definierten Menge Chromogen versetzt. Bei diesem Schritt war eine exakt identische Inkubationszeit für alle Schnitte sehr wichtig, um für die spätere Auswertung des Färbeergebnisses eine repräsentative Relation zwischen Farbintensität der Schnitte und der Quantität der gebundenen spezifischen EpCAM-Antikörper zu erhalten.
- Im Folgenden wurden die Schnitte zweimal für fünf Minuten in Leitungswasser gewaschen.

- Schließlich erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer für 15 Sekunden und zum Schluss wurden die Schnitte 15 Minuten unter fließendem Wasser „gebläut“.
- Als Eindeckmedium wurde Entellan® verwendet. Hierfür war es erforderlich die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe für eine Entwässerung, bis hin zum Xylol zu führen.

3.3.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die Auswertung der Immunhistochemie wurde unabhängig von zwei Personen durchgeführt. Innerhalb der Auswertung wurden vier Färbeintensitäten vergeben: Die Stanze einer Tumorprobe wurde mit dem Färbegrad 3+ bewertet, wenn mehr als 10% der Tumorzellen im Anschnitt eine starke Anfärbung der Zellmembran zeigten. Entsprechend wurde als Färbergrad 2+ gewertet, wenn bei mehr als 10% der Tumorzellen im Anschnitt eine mittelgradige Anfärbung der Zellmembran beobachtet wurde und analog für eine schwache Membranfärbung bei mehr als 10% der Tumorzellen wurde der Färbegrad 1+ vergeben. Bei einer Membranfärbung von weniger als 10% der Tumorzellen, oder bei fehlender Anfärbung der Zellmembran wurde der Färbegrad mit 0 bewertet.

Da der Tissue Micro Array so konzipiert wurde, dass für jede Patientenprobe zwei Stanzen aus dem jeweiligen Tumorzentrum und aus der Invasionsfront gewonnen worden waren, wurde jede Stanze einzeln ausgewertet und anschließend ein Mittelwert aus den Färbeintensitäten gebildet, welcher als endgültiger Färbegrad der Tumorprobe eines Patienten gewertet wurde. In die Bewertung wurden ausschließlich Gewebestanden einbezogen, die einen intakten Gewebeverbund zeigten und mindestens 10% Tumorzellen im Anschnitt aufwiesen.

In 109 Fällen (98%) kam es zu übereinstimmenden Ergebnissen der beiden auswertenden Personen. Die restlichen 2% der Proben (n=9) wurden im

Anschluss gemeinsam betrachtet. Die betreffenden Proben zeigten ein heterogenes Färbeergebnis, welches dann im Konsens bewertet wurde.

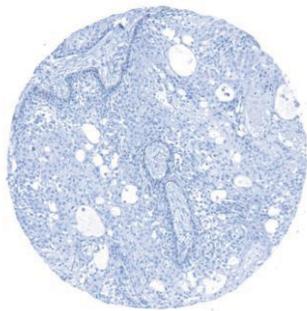
Als Klassifizierungsmethode wurde der HercepTest™ der Firma DAKO zur Auswertung herangezogen. Dieser wird seit 1999 zum Nachweis des membranständigen Rezeptors HER2 bei Mamma-Karzinomen verwendet. Für das ebenfalls membranäre EpCAM-Molekül bietet sich dieses Interpretationsverfahren daher an. Bereits in der Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe zur Expression von EpCAM beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus wurde diese Klassifikation verwendet [75]. Die Bewertungskriterien des HercepTests™ sind in Tabelle 3-4 dargestellt. Für jede Patientenprobe ergab sich somit ein Färbegrad zwischen 0 und 3.

Tabelle 3-4: Auswertungsprinzip der immunhistochemischen Färbung nach dem HercepTest™

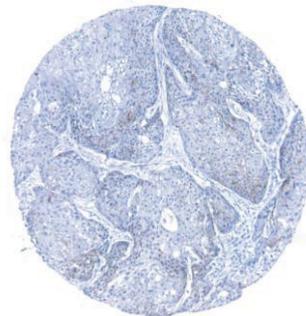
Anfärbungsmuster	Gradeinteilung	Bewertung der EpCAM-Expression
Keine Anfärbung beobachtbar oder eine Membranfärbung wird bei weniger als 10 % der Tumorzellen festgestellt.	0	Negativ
Bei mehr als 10 % der Tumorzellen wird eine schwache/kaum sichtbare Membranfärbung festgestellt. Nur ein Teil der Zellmembran wird angefärbt.	1+	Schwach positiv*
Bei mehr als 10 % der Tumorzellen wird eine schwache bis mittelgradige komplette Anfärbung der Zellmembran beobachtet.	2+	Positiv
Bei mehr als 10 % der Tumorzellen wird eine starke komplette Anfärbung der Zellmembran beobachtet.	3+	Stark positiv

*in Färbungen an Mammakarzinomen wird dieser Färbegrad als negativ gewertet

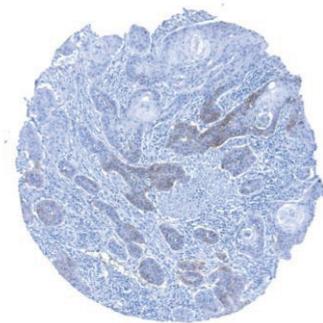
Eine exemplarische Übersicht über die optische Definition der verschiedenen Färbegrade ist in Abbildung 6 dargestellt:



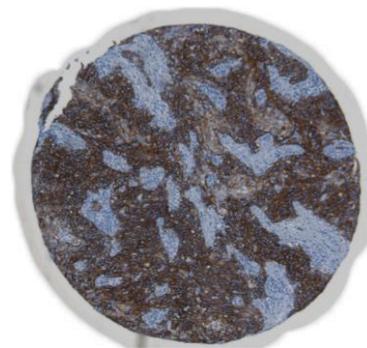
negatives Färbeergebnis



schwach positives Färbeergebnis (1+)



positives Färbeergebnis (2+)



stark positives Färbeergebnis (3+)

Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der unterschiedlichen Färbegrade anhand von Stanzen in 10x Vergrößerung, gemäß der Auswertung nach dem HercepTest™

Als weitere Klassifikationsmethode für die Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurde der Remmele-Score (syn. Immunreaktiver Score; IRS) herangezogen [77]. Hierbei wird der prozentuale Anteil gefärbter Tumorzellen mit der jeweiligen Färbeintensität (0 bis 3+) in Relation gesetzt. Dabei wird aus beiden Parametern das Produkt gebildet und es ergibt sich für jede Probe ein absoluter Wert zwischen 0 und 12. Der Vergleich zwischen dem HercepTest™ und dem Remmele-Score ermöglicht

eine präzisere Darstellung der Färbeergebnisse. Analog zum HercepTest™ finden sich in Tabelle 3-5 die Kriterien für den Remmele-Score dargestellt.

Tabelle 3-5: Prinzip der Auswertung von immunhistochemischen Färbungen nach dem *Remmele - Score* (syn. Immunreaktiver Score; IRS)

<i>Intensitätsklassen</i>	<i>Prozentklassen</i>
0 = negativ	0
1 = schwache Färbeintensität	>0–<10 % = 1
2 = mäßige Färbeintensität	10–<50 % = 2
3 = starke Färbeintensität	50 %–80 % = 3
Überexpression	>80 % = 4

3.3.4 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurden nicht parametrische Variablen mit 4-Felder-Tafeln und dem Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) ausgewertet. Dieser Test wurde hier eingesetzt um eine mögliche Signifikanz zwischen der EpCAM-Expression und den histopathologischen Parametern zu berechnen. Die Gleichheit zweier binominaler Verhältnisse wurde mit dem Fisher's exact test (n mindestens 5 pro Feld) überprüft. Dieser kam vornehmlich bei dem Vergleich der verschiedenen Expressionsstärken zum Einsatz. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. So wurde beurteilt, ob ein Zusammenhang zwischen zwei untersuchten Variablen bestand. Mittels der univariaten Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier wurde der Einfluss der EpCAM-Expression auf das Überleben der Patienten untersucht. Dafür wurden zunächst alle Variablen dichotomisiert. Bei der Tumorgröße wurden die Gruppen pT1-2 und die Gruppen pT3-4 zusammengefasst. Die N-Kategorie wurde in die Gruppen N0 und N1 eingeteilt. Die beiden Fälle mit Fernmetastasen wurden aus unserem Kollektiv ausgeschlossen. In Bezug auf den Differenzierungsgrad wurden G1 und G2 zusammengefasst und mit der Gruppe G3, also den schlecht

differenzierten Tumoren verglichen. Für die Risikoabschätzung bezüglich des Lebensalters wurden die Patienten in Gruppen bis inklusive 60 Jahren zum Operationszeitpunkt und solche über 60 Jahre und älter eingeteilt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Log-Rang-Test verwendet. In der Überlebenszeitanalyse wurde hier geprüft, ob sich bestimmte Gruppen betreffend des Sterberisikos unterscheiden: Dies kam zur Anwendung bei den entsprechend der EpCAM - Expressionsmuster gebildeten Gruppen, sowie im Bezug auf Gemeinsamkeiten histologischer Parameter. Endpunkte der Überlebensanalyse waren das tumorspezifische Überleben sowie das rezidivfreie Überleben. Die Zeitspanne umfasste den Zeitraum vom Operationsdatum bis zum Datum der letzten Nachbeobachtung oder des tumorbedingten Todes. Daten von Patienten, die beim letzten Nachbeobachtungszeitpunkt rezidivfrei waren oder lebten, wurden am Ende dieser Studie zensiert.

Um die Unabhängigkeit der in den univariaten Überlebensanalysen als signifikant identifizierten Prognoseparameter zu untersuchen, wurden multivariate Cox-Regressionsanalysen durchgeführt. Die Durchführung der vorgenannten statistischen Analysen erfolgte mit der Software des Statistikprogrammes SPSS 16.0. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden im *„Chirurgisches Forum und DGAV 2009 für experimentelle und klinische Forschung Unterreihe: Forumband 38. Herausgeber: Schumpelick, Volker; Bruch, Hans-Peter; Schackert, Hans Konrad“* veröffentlicht.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

4.1.1 Geschlecht und Alter

Das bereits im Material und Methodenteil beschriebene Patientenkollektiv umfasste 120 Fälle, nach Ausschluss zweier Fälle mit Fernmetastasen belief sich das ausgewertete Kollektiv auf 118 Patienten. Es bestand aus 31 weiblichen und 87 männlichen Patienten. Das Durchschnittsalter lag bei 57 Jahren, wobei das maximale Alter eines Patienten bei der Tumorresektion 83 Jahre betrug und der jüngste Patient zum Zeitpunkt der Operation 41 Jahre alt war.

4.1.2 Histopathologische Parameter

Die histopathologische Einteilung erfolgte nach der pTNM-Klassifikation, gemäß der Kriterien der UICC [26]. In das Kollektiv wurden ausschliesslich Patienten mit der Kategorie pM0 aufgenommen, sodass zwei Patienten aufgrund einer Fernmetastasierung ausgeschlossen wurden (n=118).

In der pT-Kategorie waren mit 69 Fällen überwiegend pT3-Tumoren vertreten (59%), gefolgt von pT2-Tumoren mit 25 Fällen (21%) und pT1-Tumoren mit 19 Fällen (16%). pT4-Tumoren waren mit fünf Fällen (4%) selten.

Von den Patienten wiesen 77 (65%) regionäre Lymphknotenmetastasen (pN1) auf und 41 Patienten (35%) wurden als pN0 diagnostiziert.

Bezüglich des Differenzierungsgrades fanden sich am häufigsten G2-Tumoren mit 67 von 118 Fällen (57%), gefolgt von G3-Tumoren mit 49 Fällen (41%). Den geringsten Anteil machten Tumoren mit G1, also einem hohen Differenzierungsgrad aus. Hier fanden sich zwei Fälle (2%).

4.2 Überprüfung der Gewebestanden des TMA

Das TMA - Design sah vor, dass je zwei Stenzen aus der Invasionsfront des Tumors, sowie aus dem Tumorzentrum entnommen wurden. Des Weiteren wurde, je nach Verfügbarkeit, jeweils eine Stanze Normalmucosa und Material aus einer Lymphknotenmetastase entnommen. Somit ergab sich bei einem Patientenkollektiv von 118 Fällen, eine Gesamtmenge von 562 entnommenen Stenzen. Die Beurteilbarkeit der gestanzten Areale war in zwei Fällen aufgrund mangelnden Gewebes auf dem Objektträger beziehungsweise innerhalb der Stanze eingeschränkt. In einem Fall betraf dies Stenzen aus der Invasionsfront und in einem Anderen Stenzen aus dem Tumorzentrum. Hierbei wurde dann jeweils der sich ergebende Score für das restliche Material ermittelt. In 75 der 118 Fälle wurde Normalmucosa identifiziert und gestanzt. Stenzen von 60 dieser Fälle enthielten tatsächlich das gewünschte Gewebe. Die übrigen 15 Fälle enthielten zu wenig Gewebe auf der Schnittfläche. Bei 15 Fällen konnte Gewebe aus Lymphknotenmetastasen biopsiert werden. Bei zwei dieser Fälle war die Gewebemenge für eine Analyse nicht ausreichend, so dass insgesamt 13 Lymphknotenmetastasen ausgewertet werden konnten.

4.3 Analyse der Expression von EpCAM

Bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv zeigten 74 Tumorproben (63%) eine Expression von EpCAM. Bei 38 Proben (32%) war keine Reaktion mit dem Antikörper gegen EpCAM messbar. In sechs Fällen (5%) zeigte sich eine EpCAM-Expression in weniger als 10% der Tumorzellen, sodass diese Proben analog den Kriterien des HercepTests™ als negativ (Score 0) gewertet wurden.

4.3.1 Analyse der EpCAM-Expression in gesundem Gewebe

In 60 von 75 Fällen konnte gesunde Schleimhaut des Ösophagus für die Analyse der EpCAM-Expression verwendet werden. In keiner dieser Proben ließ sich das Molekül

detektieren. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Daten anderer, unabhängiger Arbeitsgruppen [47, 74].

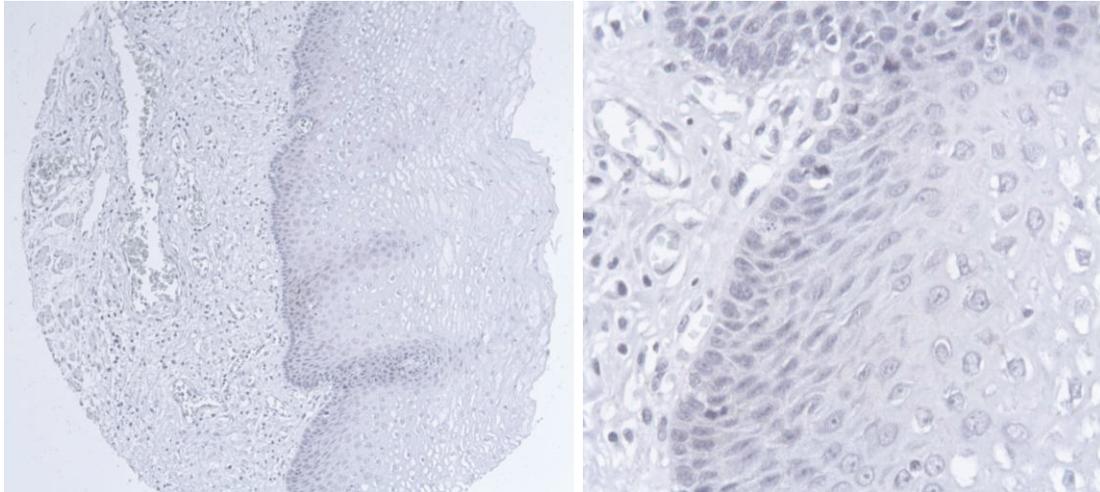


Abbildung 7: Stanzen von Normalmucosa des Ösophagus. Links 100fache Vergrößerung, rechts 400fache Vergrößerung. Es liegt ein insgesamt negatives Färbeargebnis für EpCAM vor.

4.3.2 Analyse der EpCAM-Expression im Karzinom

4.3.2.1 Analyse der EpCAM-Expression nach dem HercepTest™

Zunächst erfolgte die Klassifikation des immunhistochemischen Färbeargebnisses nach dem HercepTest™. Hierbei wurden entsprechend der Färbeintensität Scores von 0 bis 3 vergeben, um die EpCAM-Expression zu klassifizieren. In Abbildung 8 ist die Verteilung der Färbegrade anteilig und absolut dargestellt:

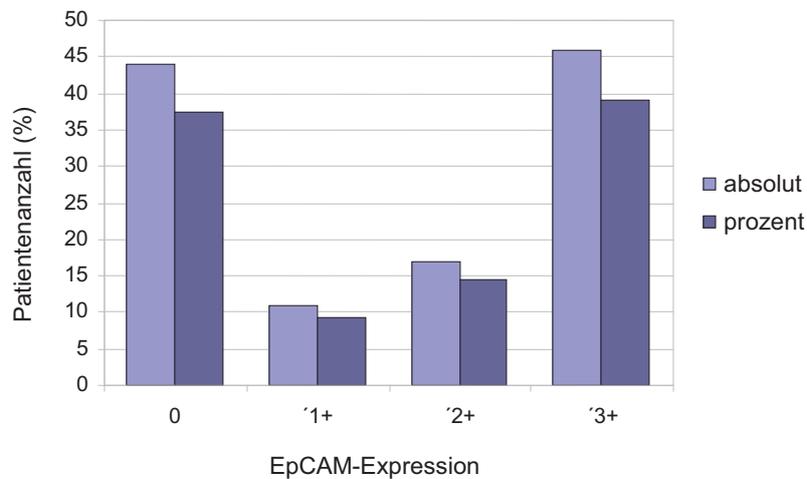


Abbildung 8: EpCAM - Expression im Tumorgewebe nach der Hercep - Klassifikation

Von den 74 EpCAM-positiven Tumorproben, wiesen 11 Proben (9%) einen Score von 1+ und somit ein schwaches Färbeergebnis auf. 17 Proben (14%) erhielten einen Score von 2+. Den größten Anteil machten 46 Tumoren (39%) mit einem Score von 3+ aus. Bei 38 Proben (37%) fiel die EpCAM-Expression nur gering oder negativ aus, sodass diese mit "0" bewertet wurden. Sechs Proben wurden aufgrund einer Expression von EpCAM in weniger als 10% der Tumorzellen ebenfalls als negativ bewertet.

4.3.2.2 Analyse der EpCAM-Expression nach dem Immunreaktiven Score (IRS)

Ergänzend zu der Auswertung nach der Hercep-Klassifikation, wurde der Remmele-Score (syn. Immunreaktiver Score; IRS) verwendet. Dieser erlaubt eine feinere Einteilung des Färbeergebnisses. Der sich daraus ergebende Score enthält absolute Werte zwischen "0" und "12".

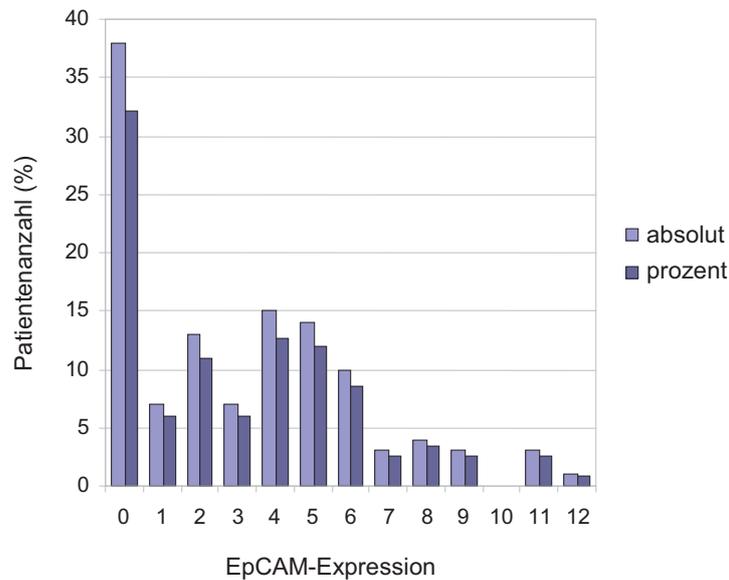


Abbildung 9: EpCAM - Expression im Tumorgewebe nach dem Remmele - Score (IRS)

Während hier 38 Proben (32%) einen Färbescore von “0” erhielten, ergab die Auswertung der restlichen 80 Proben (68%) Scores zwischen “1” und “12“. Dabei verteilten sich die meisten Probenwerte auf Expressionsscores zwischen “1” und “6“. Der Mittelwert der positiven Färbeergebnisse für EpCAM lag bei “4,6“ (+/- 2,6). Aufgrund der feineren Abstufung der Auswertung im Remmele-Score, wurden sechs Proben im Hercep-Score als negativ bewertet, erhielten jedoch ein Scoreergebnis im IRS.

4.3.2.3 Vergleichende Analyse zentraler und peripherer Tumoranteile

Nachdem nun die EpCAM-Expression aller Stenzen betrachtet worden war, stellte sich die Frage, inwiefern es Unterschiede in der Expression in zentralen Tumoranteilen und in der Invasionsfront gab. Hierfür wurden die gestanzten Areale getrennt analysiert.

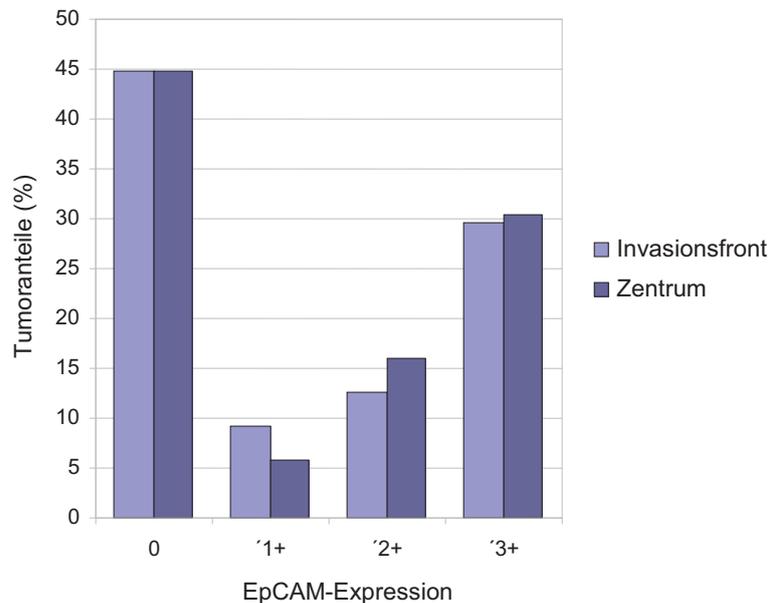


Abbildung 10: Vergleichende Darstellung der Expression von EpCAM in der Invasionsfront und in zentralen Tumoranteilen (HercepTest™).

Sowohl für die Kategorien des HercepTests™ (Abbildung 10), als auch beim Remmele-Score (IRS) zeigten sich keine auffälligen Unterschiede. So ergab sich für den Remmele-Score (IRS) in der Invasionsfront ein Mittelwert von 4,8 (+/- 2,8) und im Tumorzentrum von 5 (+/- 3,1).

4.3.2.4 Analyse der EpCAM-Expression in Lymphknotenmetastasen

Von dem 118 Patientenproben umfassenden Kollektiv wiesen 77 Fälle (64%) zum Zeitpunkt der histologischen Befunderhebung regionäre Lymphknotenmetastasen auf. In der vorliegenden Analyse konnte Material von regionären Lymphknotenmetastasen aus 15 Fällen gewonnen und untersucht werden. Zwei Proben waren mangels Gewebe im Anschnitt mikroskopisch nicht auswertbar. Von den 13 Proben zeigten sieben (54%) keine Expression von EpCAM. Dahingegen wiesen sechs Proben (46%), analog unserer Auswertungskriterien ein positives Färbeergebnis für das Molekül auf.

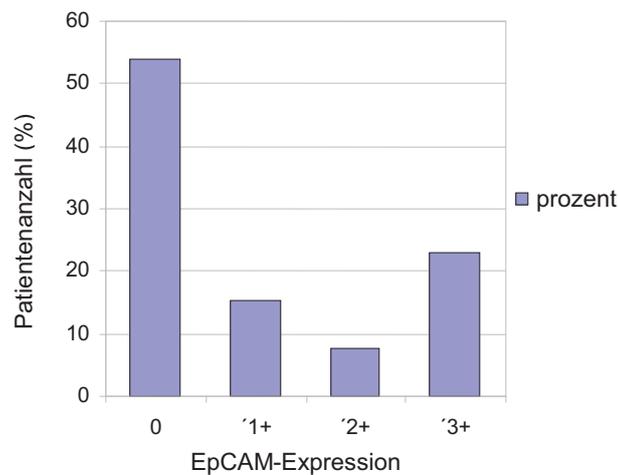


Abbildung 11: Expression von EpCAM in regionären Lymphknotenmetastasen (HercepTest™)

Von den sechs Fällen mit positiver EpCAM-Expression im Lymphknoten zeigte in vier Fällen (67%) der Primarius dieser Patienten ebenfalls eine EpCAM-Expression. Diese Primärtumore wiesen jeweils ein starkes (3+) Färbeergebnis auf. In einem Fall war der Primarius nicht auswertbar.

Interessanterweise zeigten jedoch auch bei vier von den sieben Fällen (57%) in denen die Lymphknoten keine EpCAM-Expression aufwiesen, die zugehörigen Primärtumoren eine deutliche Expression des Moleküls.

4.3.2.5 Heterogenität der EpCAM Expression

In drei Fällen (2%) zeigte das Färbeergebnis für EpCAM, anders als in den übrigen gewonnenen Tumorstanzen, ein heterogenes Muster. Dieses fand sich hier innerhalb der Tumoranschnitte sowohl im Bereich der Invasionsfront des Tumors, als auch in dessen Zentrum (Abbildung 12). In den übrigen Gewebeanschnitten der Tumorproben hingegen zeigte die Expression von EpCAM eine gleichförmig verteilte Anfärbung innerhalb des Tumorgewebes einer untersuchten Gewebestanze.

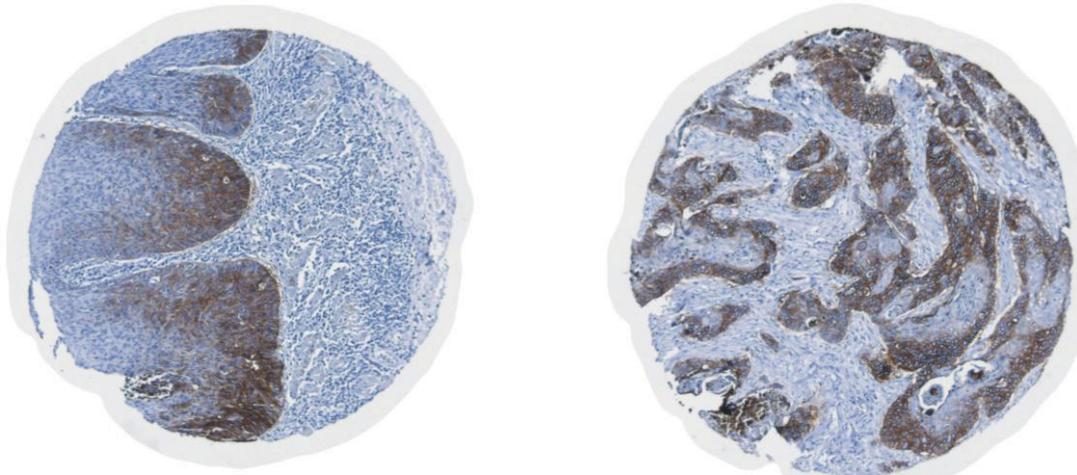


Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung heterogener Expression von EpCAM in der Invasionsfront (links) und im Zentrum (rechts) des Tumors.

Bei allen Fällen fanden sich regionäre Lymphknotenmetastasen. In zwei Fällen zeigten diese eine Expression von EpCAM und ein Fall erwies sich als negativ für die Expression.

4.4 Korrelation der EpCAM-Expression mit der TNM-Klassifikation

Die Ergebnisse der Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe zur Expression von EpCAM in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus hatten gezeigt, dass eine Starke Expression des Moleküls (3+) mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben der Patienten einher ging [75]. In der vorliegenden Arbeit hat sich an dem hier untersuchten Kollektiv gezeigt, dass EpCAM in 63% der Fälle exprimiert wurde (HercepTest™). Die restlichen 37% der Patientenproben zeigten keinerlei, oder zumindest keine deutliche Expression des Moleküls. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob EpCAM zur Progression von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus beiträgt, wurde nun getestet ob ein Zusammenhang zwischen der EpCAM-Expression und histopathologischen Parametern bestand.

Hierfür haben wir die Parameter des TNM -Systems mit den erhobenen Färbescores aus dem HercepTest™ korreliert. Da das von uns betrachtete Kollektiv keine Fälle von Fernmetastasen enthielt, entfiel die Korrelation der Expressionsergebnisse mit der M-Kategorie. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 4-1 dargestellt:

Tabelle 4-1: Korrelation der Expression von EpCAM mit der TNM - Klassifikation

<i>Variable</i>	<i>N</i>		<i>EpCAM-Expression</i>			<i>p-Wert</i>	
			0	'1+	'2+		'3+
T-Kategorie	44	T1/T2	16 (36%)	5 (11%)	8 (18%)	15 (34%)	0,697
	74	T3/T4	28 (38%)	6 (8%)	9 (12%)	31 (42%)	
N-Kategorie	41	N0	19 (46%)	1 (2%)	4 (10%)	17 (42%)	0,139
	77	N1	26 (34%)	9 (11%)	13 (17%)	29 (38%)	
G-Kategorie	69	G1/G2	28 (41%)	9 (13%)	11 (16%)	21 (30%)	0,087
	49	G3	16 (33%)	2 (4%)	6 (12%)	25 (51%)	

Korrelation der T-Kategorie mit der Expressionsstärke: Bezüglich der EpCAM-Expression in Relation zur T-Kategorie zeigte sich für die einzelnen Färbescores keine signifikante Beziehung. Ebenfalls bei Zusammenfassung der Kategorien pT1 mit pT2, sowie pT3 mit pT4 erwies sich die Korrelation als nicht signifikant ($p = 0,697$). Das Verhalten der Expression von EpCAM bei kleineren (T1/T2) und größeren Tumoren (T3/T4) zeigt Abbildung 13:

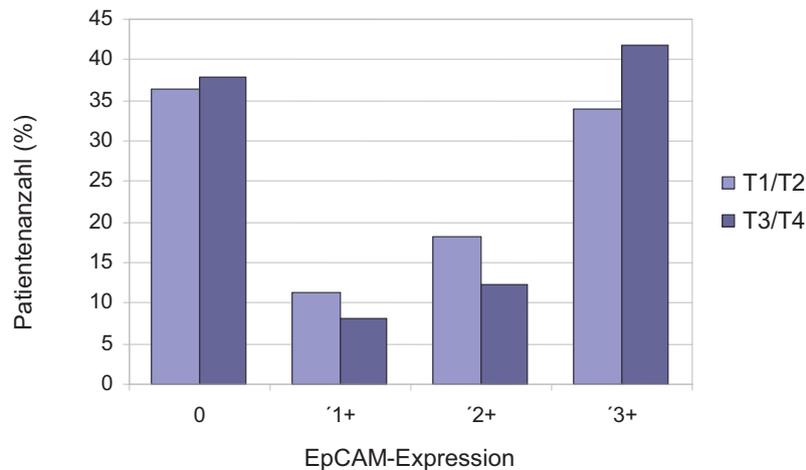


Abbildung 13: Korrelation der Expression von EpCAM mit der TumorgroÙe (T) gemäß der Klassifikation nach dem TNM - System.

Die zusammengenommenen Färbegrade 0/1+/2+ korreliert mit dem Score 3+ erwiesen sich des Weiteren als nicht signifikant.

Korrelation der N-Kategorie mit der Expressionsstärke: Die Analyse der Beziehung von der EpCAM-Expression im Bezug zu den Lymphknotenmetastasen (pN0/pN1) ergab eine verstärkte Expression von EpCAM in Fällen, bei denen es zu einer Metastasierung gekommen war. Hier zeigten 66% der Proben mit pN1 eine Überexpression des Moleküls, in den meisten Fällen lag ein Score von 3+ vor. In Korrelation der Kategorie pN0 mit pN1 ließ sich hier jedoch keine signifikante Beziehung mit der Expressionsintensität ableiten ($p = 0,139$). Ebenso verhielt sich die Beziehung der zusammengefassten Scores 0/1+/2+ gegenüber 3+ der Kategorien N0 und N1 ($p = 0,687$).

Korrelation der G-Kategorie mit der Expressionsstärke: Auch innerhalb des hier untersuchten Kollektivs wurde überprüft, ob ein Färbescore von 3+ möglicherweise mit einem aggressiveren Tumorverhalten assoziiert war.

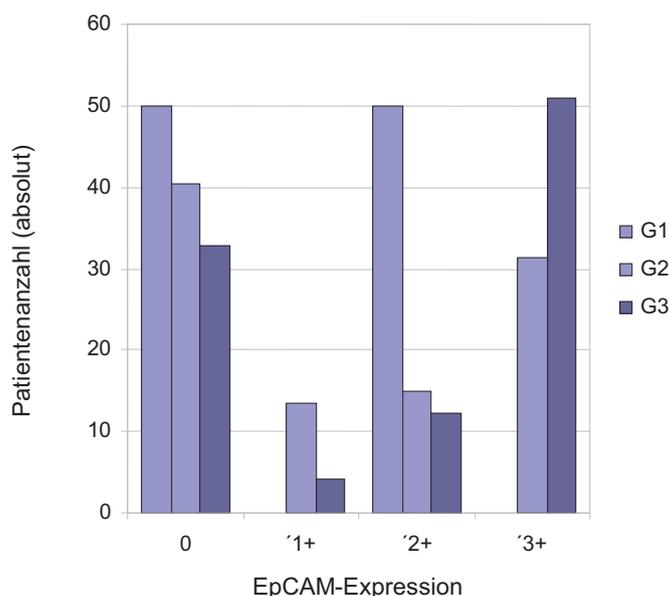


Abbildung 14: Darstellung der EpCAM - Expression in Korrelation mit dem Differenzierungsgrad (G).

Daher wurden stark exprimierende (3+) Tumoren gegen die restlichen Proben korreliert. Es wurden jeweils Tumoren der Kategorien G1 und G2 zusammengefasst, ebenso bildeten G3-Tumoren eine Gruppe. Die Korrelation erfolgte nun anhand der niedrigen Färbegrade 0/1+/2+ mit denjenigen Tumoren mit starker Expression (3+) (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Korrelation von fehlender und hoher EpCAM - Expression mit dem G - Status

Variable	N		EpCAM-Expression		p-Wert
			0/1+/2+	3+	
G-Kategorie	69	G1/G2	48 (41%)	21 (18%)	0,023
	49	G3	24 (20%)	25 (21%)	

Hierbei ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grad der Differenzierung und der Expression von EpCAM ($p = 0,023$).

Tumoren mit schlechter Differenzierung zeigten weitaus häufiger eine starke Überexpression (3+) von EpCAM, als Tumoren mit guter bis mäßiger Differenzierung.

4.5 Korrelation der EpCAM-Expression mit Alter und Geschlecht der Patienten

Das hier untersuchte Patientenkollektiv bestand aus 31 weiblichen und 87 männlichen Patienten. Das Durchschnittsalter lag bei 57 Jahren, wobei das maximale Alter eines Patienten bei der Tumorresektion 83 Jahre betrug und der jüngste Patient zum Zeitpunkt der Operation 41 Jahre alt war.

Tabelle 4-3: Korrelation von EpCAM - Expression und Geschlecht bzw. Alter im Gesamtkollektiv

<i>Variable</i>	<i>N</i>	<i>EpCAM-Expression</i>		<i>p-Wert</i>
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	
<i>Geschlecht</i>				
männlich	87	33	54	0,808
weiblich	31	11	20	
<i>Alter</i>				
bis inklusive 60 Jahre	74	25	49	0,308
über 60 Jahre	44	19	25	

Im Gesamtkollektiv konnten keine signifikanten Unterschiede in der EpCAM-Expression in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter der Patienten festgestellt werden (Tabelle 4-3). Auch die Korrelation innerhalb der männlichen und weiblichen Kollektivanteile wies keinen erkennbaren Zusammenhang mit der Expression des Moleküls auf.

4.6 Überlebensanalyse

In die Überlebensanalyse konnten 107 Patienten einbezogen werden. Für jeden Patienten waren Daten zum klinischen postoperativen Verlauf von mehr als 4 Wochen vorhanden. Postoperativ wurden von den Patienten Daten zum Verlauf der Erkrankung erhoben, die in halbjährlichen Abständen über die Kontaktierung der Einwohnermeldeämter und Hausärzte aktualisiert wurden. Es wurden hierbei Daten zum postoperativen Krankheitsverlauf mit Zeitpunkt und Lokalisation von Rezidiven und Metastasen sowie gegebenenfalls der Sterbefall mit Zeitpunkt des Todes dokumentiert. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 18 Monate (4 bis 136 Monate). Patienten, die innerhalb von 4 Wochen postoperativ verstarben, wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Weitere Daten zum untersuchten Kollektiv finden sich im Ergebnisteil dieser Arbeit (Tabelle 3-1 im Anhang).

4.6.1 Überleben in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression

Für die Analyse der Überlebenszeit im Zusammenhang mit der Expression von EpCAM wurden Gruppen gebildet. Diejenigen Patienten, deren Tumoren keine oder eine geringgradige Expression des Moleküls (0/1+/2+) zeigten wurden zusammengefasst und jenen gegenübergestellt, die ein starkes Färbeergebnis (3+) aufwiesen. Es zeigte sich eine mediane Überlebenszeit von 19 Monaten für Patienten mit negativer bis geringer EpCAM-Expression gegenüber einem medianen Überleben von 13 Monaten bei Patienten, deren Tumoren EpCAM in starkem Maße exprimierten. Im Log-Rang-Test zeigte sich hier eine statistische Signifikanz ($p = 0,035$). Die Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 15 zeigt den Zusammenhang zwischen einer starken Überexpression von EpCAM mit dem Gesamtüberleben, verglichen mit niedriger bis negativer Expression des Moleküls.

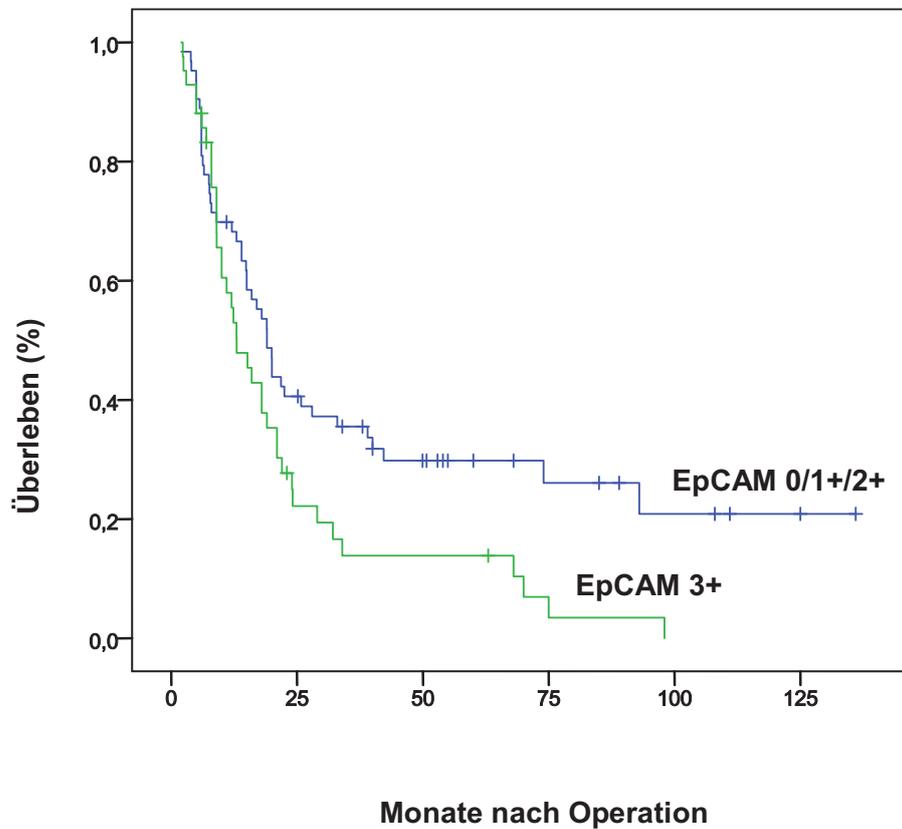


Abbildung 15: Kaplan Meier Überlebenskurve für die Expression von EpCAM (Log-Rang-Test 0,035)

In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass eine starke EpCAM-Expression (3+) ein unabhängiger prognostischer Parameter für das Gesamtüberleben ist ($p = 0,012$). Patienten, deren Tumore das Molekül in starkem Maße exprimierten, wiesen ein deutlich schlechteres Gesamtüberleben auf, als solche deren Tumore eine schwächere oder keine Expression von EpCAM aufwiesen.

4.6.2 Überleben in Abhängigkeit von histopathologischen Parametern

In dem hier untersuchten Kollektiv erwies sich die pT-Kategorie in der multivariaten Analyse als prognostisch signifikante Größe ($p = 0,019$). Das mediane Überleben von Patienten mit T1- und T2-Tumoren lag bei 24 Monaten, wohingegen dasjenige von Patienten mit großen Tumoren der Stadien T3 und T4 nur 13 Monate betrug. Betrachtet man die Parameter der pN-Kategorie, so zeigte sich in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse eine signifikante Beziehung zwischen Lymphknotenmetastasierung ($p = 0,04$) und dem schlechten Gesamtüberleben. Dies spiegelte sich in dem hier untersuchten Kollektiv in der univariaten Überlebensanalyse nicht so deutlich wieder, bei einer medianen Überlebenszeit von 21 Monaten von Patienten mit negativem Lymphknotenstatus im Vergleich zu 14 Monaten bei Patienten mit regionären Lymphknotenmetastasen ($p = 0,094$). Patienten mit gut bis mäßig differenzierten Tumoren (G1 und G2) zeigten ähnliche Überlebensraten wie solche mit Tumoren eines schlechten Differenzierungsgrades (G3). Der Differenzierungsgrad allein betrachtet, wies in dem hier untersuchten Kollektiv keinen prognostischen Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben auf ($p = 0,639$).

Tabelle 4-4: Univariate und multivariate Überlebensanalyse verschiedener prognostischer Parameter

Risikofaktor (n=107)	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	Medianes Überleben in Monaten	p-Wert	Relatives Risiko (95% CI)	p-Wert
Alter: <60 Jahre (n=64) vs. ≥60 Jahre (n=43)	16,0 vs. 18,0	0,635	ne	-
Lymphknotenstatus: pN0 (n=38) vs. pN1 (n=69)	21,0 vs. 14,0	0,094	0,621 (0,389-0,990)	0,045
Größe des Primarius: pT1-2 (n=41) vs. pT3-4 (n=64) (n=105)	24,0 vs. 13,0	0,022	0,585 (0,371-0,922)	0,021
Differenzierungsgrad: G1-2 (n=62) vs. G3-4 (n=45)	18,0 vs. 18,0	0,207	ne	-
EpCAM-Expression: positiv (n=65) vs. negativ (n=42)	17,0 vs. 18,0	0,817	ne	-
EpCAM-Expression: Grad 0/1+/2+ (n=66) vs. Grad 3+ (n=41)	19,0 vs. 13,0	0,035	0,563 (0,363-0,875)	0,011

Legende zu Tabelle 5-4:

ne: nicht einbezogen in die multivariate Analyse

n=105: Für 2 Patienten lagen keine Daten zur T-Kategorie vor

Definition:

T1a/b: Die Lamina propria/ Submucosa nicht überschreitend

T2: Die Muscularis propria nicht überschreitend

T3: Die Muscularis propria überschreitend

T4: Infiltration von Nachbarstrukturen (Bronchien, Trachea, Aorta)

5 Diskussion

Karzinome des Ösophagus gehören zu den schnell metastasierenden Tumoren und weisen eine sehr schlechte Prognose auf. Bis heute stehen keine nachhaltig wirksamen adjuvanten systemischen Therapien zur Verfügung und es kommt überdurchschnittlich häufig zur Rezidiventwicklung nach operativer Therapie in kurativer Intention. Aktuell sind die Möglichkeiten zur lokalen Therapie weitgehend ausgeschöpft und es fehlen wirksame therapeutische Optionen zur Bekämpfung von Metastasen. Dieser Umstand macht es notwendig, effektivere systemische Therapieansätze zu entwickeln. Herkömmliche adjuvante Therapieregimes vermögen hier aktuell keine entscheidende Rolle zu spielen. Die hier gewonnenen Daten deuten an, dass eine gezielte Immuntherapie gegen EpCAM eine sinnvolle Ergänzung zu zytostatisch orientierten adjuvanten Therapieansätzen darstellen kann. Fußend auf umfangreichen Expressionsanalysen an Karzinomen verschiedener Entitäten und seiner bisher bekannten molekularbiologischen Funktionen, stellte EpCAM (CD326) im Vorfeld dieser Arbeit eine potenziell interessante Zielstruktur für die Therapie ösophagealer Plattenepithelkarzinome dar. Unsere Arbeitsgruppe hatte bereits Daten an einem Kollektiv von 56 Patienten erhoben, die Hinweis auf eine Rolle von EpCAM als therapeutische Zielstruktur ergeben hatten. Nun stellte sich die Frage, ob diese Daten an einem unabhängigen und vergleichsweise großen Patientenkollektiv validiert werden können. Denn bis zu diesem Zeitpunkt lagen keine umfangreicheren Expressionsanalysen zum Plattenepithelkarzinom des Ösophagus vor. Es wurde ein Tumor-Kollektiv von 118 Patienten asserviert, an dem die Expression von EpCAM mit Hilfe eines TMA und mit immunhistochemischen Methoden analysiert wurde. Die TMA Technologie bietet aufgrund der simultanen Färbung mehrerer Gewebeproben unter jeweils identischen Bedingungen bei der Analyse größerer Kollektive, entscheidende Vorteile. Zudem haben Studien gezeigt, dass Gewebestanden von 1 mm Durchmesser sich als repräsentativ für das Ursprungsgewebe erwiesen haben [93].

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit Ber-EP4, einem murinen monoklonalen Antikörper (IgG1) gegen EpCAM, der bereits in verschiedenen Studien verwendet wurde [75, 92].

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurden die Kriterien des HercepTest™ verwendet, da dieser Test standardisiert durchführbar ist und EpCAM ein membranständiges Protein darstellt. Die Modalitäten der Auswertung wie oben beschrieben, wurden analog zu der Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe zur Expression von EpCAM im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus angewendet [75].

Klinische Daten von 118 Patienten standen nach Ausschluss von Fällen mit Fernmetastasen für die vorliegende Arbeit zur Verfügung. Aus diesem Kollektiv konnten letztlich 107 Patienten mit klinischen Verlaufsdaten in die Überlebensanalyse einbezogen werden.

5.1 Prävalenz der EpCAM-Expression und Korrelation mit histopathologischen Parametern

In Ergänzung zu vorangegangenen Studien konnte in der vorliegenden Analyse gezeigt werden, dass es beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zu einer Neoexpression von EpCAM kommt, wohingegen das Molekül im gesunden Plattenepithel nicht detektierbar ist [47, 74, 75]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde EpCAM in keinem der 60 untersuchten Gewebe von Normalmucosa nachgewiesen. Die *de novo* Expression von EpCAM scheint außerdem in sehr frühen Stadien maligner Transformation stattzufinden, da bereits Plattenepithel-Dysplasien das Molekül exprimieren [52]. Im hier untersuchten Kollektiv wiesen 63% der untersuchten Tumore eine Neoexpression des Moleküls auf, wobei die Dominanz im Bereich der starken Expression (3+) mit 39% lag, gefolgt von schwächeren Färbegraden 2+ mit 14% und 1+ mit 9%. Diese Überexpression im Karzinom wurde bisher unter anderem in Karzinomen der Gallenblase und in Stadien der CIN beobachtet [52, 71]. Im Unterschied zu den vorgenannten Zusammenhängen, weist epitheliales Normalgewebe von Magen, Dünndarm und Colon, sowie endokrines Gewebe natürlicherweise eine EpCAM-Expression auf. Im Falle einer malignen

Transformation kann es zu einer weiteren Verstärkung der EpCAM-Expression kommen. Dies gilt für die Mehrzahl epithelialer Tumoren, wie den gastralen und kolorektalen Karzinomen, sowie für solche der Mamma, des Ovars und der Harnblase [47].

Es ist seit langem bekannt, dass Tumoren mit schlechter Differenzierung eher eine ungünstige Prognose aufweisen. Dies konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Da mehrere Studien zeigten, dass eine starke EpCAM-Expression im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose und einem aggressiven Potenzial der Tumoren steht, war es interessant, dass in der vorliegenden Arbeit eine Signifikanz zwischen EpCAM und dem Grading zu beobachten war. In Zusammenschau mit der vorliegenden Überlebensanalyse, in der sich ein schlechteres Gesamtüberleben bei Patienten mit stark EpCAM-exprimierenden Tumoren zeigte, ergeben sich starke Hinweise auf eine mögliche Rolle von EpCAM in der Tumorprogression von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus.

5.2 EpCAM als prognostischer Faktor

Ein wichtiger Aspekt der EpCAM-Expression bei dem hier untersuchten Kollektiv liegt darin, dass eine starke Überexpression des Moleküls (3+) mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten einhergeht und damit für das Vorliegen eines aggressiven Tumors spricht. In der vorliegenden Analyse zeigte sich, dass besonders eine starke Überexpression von EpCAM mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben einherging und das Molekül zudem einen unabhängigen prognostischen Faktor in der multivariaten Analyse darstellte ($p = 0,012$). Diese Ergebnisse decken sich mit bisherigen Studien zur EpCAM-Expression in Mammakarzinomen, Gallenblasenkarzinomen und Ovarialkarzinomen hinsichtlich seiner prognostischen Bedeutung [71, 72, 76]. Die Korrelation einer starken Expression von EpCAM mit einem schlechten Überleben konnte für Mamma-, Kolon-, Gallen- und Pankreaskarzinome, sowie für Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs gezeigt werden [69, 71]. Darüber hinaus bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine vorangegangene Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe zur Expression von EpCAM

im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus [75]. Interessanterweise ergaben erste Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur EpCAM-Expression beim Adenokarzinom der Speiseröhre eine gute Überlebensprognose im Falle einer starken Expression von EpCAM [94]. Ähnliche Befunde konnten für Magenkarzinome [67], klarzellige Nierenzellkarzinome [95] und Adenokarzinome der Lunge gezeigt werden [96]. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnissen, zeigten Untersuchungen aus Japan von Kimura et al. zur Expression von EpCAM in Karzinomen des Ösophagus signifikant höhere Überlebenszeiten bei Patienten deren Tumore EpCAM in hohem Maße exprimierten, als bei solchen mit einer niedrigen Expression [97]. Neben Unterschieden in der technischen Durchführung der Studie (Verwendung unterschiedlicher Antikörper und Frischgewebe anstelle der Paraffineinbettung), wurden hier sowohl Plattenepithelkarzinome, als auch Adenokarzinome in das Kollektiv einbezogen. Weiterhin könnten ätiologische Faktoren, die für die Entstehung von Ösophaguskarzinomen eine Rolle spielen, sowie die ethnischen Unterschiede der unterschiedlichen Populationen für solch unterschiedliche Ergebnisse von Bedeutung sein. Diese Unterschiede könnten die Abweichung der Ergebnisse beider Studien, zumindest teilweise erklären. Eine Übersicht der bisherigen Studien hinsichtlich der prognostischen Bedeutung einer EpCAM-Überexpression zeigt, dass es zurzeit für die verschiedenen Tumorentitäten keine allgemeingültigen Hinweise zur möglichen Bedeutung von EpCAM in der Tumorprogression gibt:

Tabelle 5-1: Übersicht bisheriger Studien zur prognostischen Bedeutung einer EpCAM - Überexpression in verschiedenen Tumorentitäten.

Tumorgewebe	AG	Fallzahl	Histologie	Antikörper	p-Wert	Prognose
Mamma-CA, LK-positive	Spizzo, 2004 [69]	1715	AC	murine monoclonal antibody ESA	p<0,0001	schlecht
Ovarial-CA	Spizzo, 2006 [72]	199 Paraffin	epithelial	murine monoclonal antibody ESA	p=0,036	schlecht

5 Diskussion

Gallenblasen-CA	Varga, 2004 [71]	99 Paraffin	AC	murine monoclonal antibody ESA	p<0,03	schlecht
Cholangiozellu- läres-CA	De Boer, 1999 [61]	11	AC	antibody 323/A3		schlecht
Pankreas-CA	Salnikov, 2009 [68]		AC	Bispezifische AK EpCAMxCD3		schlecht
Ösophagus-CA	Stoecklein, 2006 [75]	70	SCC	Ber-EP4	p=0,0003	schlecht
Prostata-CA	Mukherjee, 2009 [98]	20	Gleason 4+5	primary mouse monoclonal antibody	p=0,001	schlecht
Magen-CA	Songun, 2005 [67]	300 Paraffin	AC Stadium I+II	mAb 323/A3	p<0,0001	gut
Nieren-CA	Seligson, 2004 [95]	318	klarzellig	anti-EpCAM murine monoclonal antibody IgG2a clone KS ¼	p=0,017	gut
Colon	Went, 2006 [96]	176	AC	murine monoclonal antibody ESA	p=<0,000 1	gut
Colon	Went, 2006 [96]	284	AC, G2 Tumoren ohne EpCAM- Expression	murine monoclonal antibody ESA	p=<0,000 1	Prognose schlecht bei fehlender EpCAM- Expres- sion
Ösophagus-CA	Kimura, 2006 [97]	138	SCC	murine monoclonal antibody KSA	p=0,0213	gut

In der vorliegenden Analyse ließen sich neben Fällen mit einem Score von 3+ für EpCAM, ebenfalls das pT-Stadium und das pN-Stadium als unabhängige Prognosefaktoren in der multivariaten Analyse identifizieren: Patienten mit kleineren Tumoren (T1+T2) wiesen ein signifikant längeres Überleben auf, als Patienten mit größeren Tumoren (T3+T4) ($p = 0,019$). Im Falle eines regionären Lymphknotenbefalls zeigte sich in der multivariaten Analyse ein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten ohne Lymphknotenmetastasen ($p = 0,040$), (jedoch nicht in der univariaten Auswertung ($p = 0,094$)). Sowohl das Grading, als auch die Korrelation mit dem Alter der Patienten (<60 Jahre vs. ≥ 60 Jahre) erwiesen sich als nicht signifikant für das Überleben.

5.3 Die mögliche Rolle von EpCAM bei der Tumorprogression von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

EpCAM wurde seit seiner Entdeckung 1979 die Rolle eines tumorassoziierten Antigens zugeschrieben [50]. Seinen bis heute gültigen Namen erhielt es 1994 auf Grund seiner gezeigten Funktion als homophiles Adhäsionsmolekül [45]. Die durch EpCAM vermittelten Adhäsionen scheinen zur Stabilität der Gewebe beitragen zu können [45]. Analog zu der Beobachtung, dass eine verminderte E-Cadherin-Expression die Migrationsfähigkeit von Zellen begünstigt [99], könnte der Verlust der EpCAM-Expression bei Geweben mit physiologischer EpCAM-Expression ebenfalls zu erhöhter Migrationsfähigkeit führen [100]. Die Rolle von EpCAM bei der Adhäsion war in den vergangenen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Balzar und Mitarbeiter konnten EpCAM und E-Cadherin als „Konkurrenten“ um identische Bindungsstellen am Zytoskelett identifizieren [47, 49]. Es konnte in einem Transfektionsmodell gezeigt werden, dass die durch E-Cadherin vermittelte Adhäsion in Anwesenheit von EpCAM abgeschwächt wird. Dies führt zu einer Destabilisierung der epithelialen Zell-Zell-Kontakte und könnte so die Migration, Invasion und Metastasierung ermöglichen [53]. Eine erhöhte EpCAM-Expression scheint jedoch auch direkt onkogene Wirkungen zu haben. Gires, Münz und Mitarbeiter beschäftigten sich mit der Rolle von EpCAM bei der Proliferation und im Zellzyklus. Sie zeigten erstmals den Zusammenhang zwischen der Expression von EpCAM und

der Induktion von MYC, was unter anderem zur verstärkten Proliferation führt [58]. EpCAM führte hierbei zu einer Zunahme der Promotor-Aktivität von MYC.

Erst kürzlich konnte von derselben Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass EpCAM in der Lage ist, ausgehend von der Plasmamembran selbst Signale in den Zellkern zu vermitteln und somit die Expression von Genen zu regulieren. Hier wurde eine Assoziation des EpCAM-Signalings mit dem WNT-Signalweg gefunden, welcher bei vielen Tumoren eine zentrale Bedeutung für die Tumorprogression hat. EpCAM ist also nicht als reines Adhäsionsmolekül zu verstehen, sondern es scheint eine Rolle im Rahmen von Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen zu spielen [47, 49, 92].

Schon früh in der Embryogenese wird eine starke Expression von EpCAM beobachtet, welche in vielen terminal differenzierten Zellen nur noch vermindert oder gar nicht mehr vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass der Grad der Zelldifferenzierung und Spezialisierung wenigstens teilweise auch von der EpCAM-Expression abhängig ist [92]. Bei maligner Transformation kommt es jedoch in einigen Fällen im Verlauf zu einer erneuten Induktion der EpCAM-Expression [47, 61]. Das mehrschichtige unverhornte Plattenepithel des Ösophagus zeigt physiologischerweise keine EpCAM-Expression [47, 92]. Interessanterweise konnten Hosch und Mitarbeiter in histopathologisch tumorfreien Lymphknoten von Ösophaguskarzinompatienten EpCAM-positive Einzelzellen detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass die betreffenden Fälle mit einem frühen metastatischen Rezidiv und kürzerem tumorassoziierten Überleben korreliert waren [101]. Der Arbeitsgruppe gelang die Etablierung einer Zelllinie aus einer EpCAM-positiven Mikrometastase eines Ösophaguskarzinoms. In einem Mausmodell konnte dann gezeigt werden, dass die relevanten Zellen tumorigen sind. Entsprechend dieser Befunde beim Ösophaguskarzinom konnten Osta et al. in Untersuchungen beim Mammakarzinom zeigen, dass eine Herabregulation der EpCAM-Expression die Migration und Invasion der Zelllinien signifikant reduziert [102]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass eine Überexpression von EpCAM im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus mit einer schlechten Prognose bezogen auf das Gesamtüberleben der betroffenen Patienten einhergeht. Dies unterstreicht

frühere Ergebnisse der Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe an einem kleineren Kollektiv, in welcher ein signifikanter prognostischer Einfluss einer starken *de novo*

Expression von EpCAM auf das rezidivfreie Überleben beobachtet wurde [75].

Bei anderen Plattenepithelkarzinomen wie denen der Lunge und des Kopf-Hals-Bereichs ist die Überexpression von EpCAM mit der Tumorprogression assoziiert [59, 103, 104]. Bei Adenokarzinomen des Ösophagus wird EpCAM ebenfalls in der Karzinogenese exprimiert, weswegen das einschichtige hochprismatische Barrett-Epithel, gemäß seiner Eigenschaft als Vorläuferläsion als diagnostischer Marker der Metaplasie vorgeschlagen wurde [74]. Die bislang zur Verfügung stehenden Daten die an Tumorgewebe gewonnen wurden sprechen dafür, dass EpCAM eine Rolle in der Tumorprogression von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus spielt. Jedoch sind hier bislang keine *in vitro* oder *in vivo* Daten verfügbar.

5.4 EpCAM als mögliche therapeutische Zielstruktur beim Ösophaguskarzinom

Auf Grund der starken Expression bei verschiedenen Tumorentitäten stellt EpCAM als tumor-assoziiertes Molekül auch eine interessante Zielstruktur für Immuntherapien dar. Aufgrund der Spezifität und dem daraus resultierenden vorteilhaften Nebenwirkungsspektrum im Vergleich zu gängigen Chemotherapeutika kann die Gabe von Antikörpern in der adjuvanten Therapie von Tumorerkrankungen attraktiv sein. Bezüglich der Wirkung des bislang einzigen gründlich getesteten therapeutischen anti-EpCAM Antikörpers zeigten sich jedoch inkonsistente Ergebnisse in prospektiv randomisierten Studien. Es konnte zwar ein signifikanter Effekt der Monotherapie im Vergleich zu unbehandelten Patienten gezeigt werden, jedoch für Patienten mit kolorektalen Karzinomen UICC III ergab sich keine Überlegenheit gegenüber alleiniger postoperativer Chemotherapie [78, 79, 81]. In einer weiteren klinischen Studie zum Wert einer adjuvanten anti-EpCAM Therapie bei operablen, nodal negativen Kolonkarzinompatienten (UICC II) konnte kein Vorteil der adjuvanten Edrecolomab® -Therapie gegenüber der alleinigen Operation gezeigt werden [105]. Als muriner Antikörper induziert Edrecolomab® eine humorale Immunantwort beim Menschen, die zu einer kurzen Halbwertszeit im Serum führt.

Eine reduzierte Kompatibilität mit humanen Effektorzellen wird ebenfalls diskutiert [83].

Im Zuge der damaligen Studien wurde angenommen, dass bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen ein hoher Expressionslevel von EpCAM vorliegt. Dies wurde jedoch sowohl prospektiv, als auch retrospektiv im Tumorgewebe der behandelten Patienten nicht analysiert. Zudem handelt es sich bei Edrecolomab® um einen Antikörper mit einer geringen Affinität, sodass für eine effektive Therapie die Voraussetzung einer hohen Expression des Zielmoleküls möglicherweise an Bedeutung gewinnt. Daher wird an der Entwicklung von anti-EpCAM Antikörpern gearbeitet, die beim Menschen aufgrund verbesserter Halbwertszeiten einen größeren therapeutischen Effekt versprechen [78, 84]. Unter anderem befindet sich ein vollständig humaner Antikörper (Adecatumomab®, MT201) in klinischer Erprobung an Patienten mit Mamma- und Prostatakarzinomen [46]. Dieser verspricht ein geringeres Nebenwirkungsspektrum, da die Bildung von „human-anti-mouse-antibodies“ vermieden wird. Zwischenzeitlich wurde in Deutschland ein trifunktionaler bispezifischer Antikörper (Removab®) für die Therapie von malignem Aszites zugelassen, welcher an EpCAM auf Karzinomzellen und CD3 auf T-Zellen bindet [106].

Mit der kürzlich von Maetzel und Mitarbeitern gelungenen Entschlüsselung des nukleären Signalweges von EpCAM, bieten sich möglicherweise künftig neue Angriffspunkte, die therapeutisch nutzbar sein könnten [57]. Der in diesem Zuge gefundene onkogene Effekt von EpCAM auf den WNT-Signalweg könnte erklären, warum EpCAM in vielen Tumoren und in Vorläuferläsionen exprimiert wird. Somit wäre EpCAM nicht nur eine Zielstruktur für Immuntherapien, sondern könnte für molekulare, zielgerichtete Therapien („targeted therapies“) interessant sein.

Zusammenfassend sprechen die zur Verfügung stehenden Daten EpCAM eine Rolle bei der Tumorprogression von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus zu. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zum physiologischen Plattenepithel zu einer Neo-Expression von EpCAM kommt. In den meisten Fällen des untersuchten Kollektivs konnte im Falle einer positiven EpCAM-Expression, gleichzeitig eine sehr

starke Überexpression (3+) beobachtet werden und EpCAM konnte als negativer prognostischer Faktor in der Überlebensanalyse identifiziert werden.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen anderer Studien zur Rolle von EpCAM als therapeutische Zielstruktur und unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse bei der therapeutischen Anwendung von Antikörpern gegen EpCAM, scheint eine Therapie mit EpCAM als Zielstruktur für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus interessant zu sein. Es ist daher vorstellbar, dass Patienten deren Tumoren eine starke Überexpression von EpCAM aufweisen, von einer gegen EpCAM gerichteten Therapie profitieren würden.

Es müsste jedoch im Vorfeld der Therapie eine Stratifizierung bezüglich der EpCAM-Expression erfolgen, um die Effektivität derselben zu steigern. Bezug nehmend auf die Arbeit von Hosch et al. zur Detektion EpCAM-positiver disseminierter Tumorzellen in histopathologisch negativ klassifizierten Lymphknoten, stellt sich die Frage der Indikation einer gegen EpCAM gerichteten Therapie auch unabhängig vom Expressionsverhalten des Primarius [101]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass fast die Hälfte der untersuchten Lymphknotenmetastasen eine sehr starke Überexpression von EpCAM aufweisen. Hier haben sich jedoch bei näherer Betrachtung erhebliche Unterschiede in der EpCAM-Expression zwischen Lymphknotenmetastasen und Primärtumor ergeben. Daher kann an dieser Stelle keine Aussage zu einer möglichen Bedeutung der EpCAM-Expression in Lymphknotenmetastasen beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus gemacht werden. Größere Studien wären hier erforderlich. Angesichts der noch immer sehr schlechten Prognose von operablen Ösophaguskarzinompatienten und dem Fehlen von wirkungsvollen systemischen Therapien wäre eine klinische Testung verfügbarer, gegen EpCAM gerichteter Therapien eine interessante Option zur Prognoseverbesserung. Welche Patienten von einer solchen Therapie profitieren würden und ob eine heterogene EpCAM-Expression von Nachteil wäre, liesse sich letztlich nur in einer prospektiven randomisierten klinischen Studie überprüfen.

6 Zusammenfassung

Einleitung: Karzinome des Ösophagus gehören weltweit zu den Tumoren mit der schlechtesten Prognose. Derzeit gängige Therapieregimes vermögen es nicht, den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen bzw. die Rezidivrate zu senken. Bis zu 85% der in kurativer Absicht operierten Patienten versterben an den Folgen der systemischen Tumorausbreitung innerhalb von fünf Jahren nach dem Eingriff. Die Aufgabe dieser Arbeit war die Analyse der EpCAM-Expression in primär operablen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus.

Material und Methoden: Von einem 118 Patienten umfassenden Kollektiv mit klinischen Verlaufsdaten, wurde sowohl von den Primärtumoren, als auch von Lymphknotenmetastasen und Normalmucosa ein Tissue Micro Array (TMA) erstellt. Die Expression von EpCAM wurde immunhistochemisch mit dem monoklonalen Antikörper Ber-EP4 evaluiert. Die Auswertung erfolgte nach HercepTest™, einem standardisierten Schema zur Erfassung der Membranfärbung. Es ergaben sich so Färbegrade von 0 bis 3+. Für 107 Patienten waren klinische Verlaufsdaten vorhanden, die mit den Ergebnissen der Analysen statistisch korreliert wurden.

Ergebnisse: Während alle untersuchten gesunden Ösophagusschleimhäute keine Expression von EpCAM zeigten, exprimierten die Mehrzahl der Karzinome EpCAM, wobei eine generelle Expression nicht mit den klinisch-pathologischen Parametern korrelierte. Die in 39% der Fälle nachgewiesene starke Expression (3+) erwies sich jedoch als unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben. Stark EpCAM-exprimierende Tumoren scheinen sich also durch ein aggressiveres biologisches Verhalten auszuzeichnen. In der Korrelation mit dem Grading zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen starker Expression von EpCAM und Tumoren mit schlechter Differenzierung. In der multivariaten Analyse erwiesen sich des Weiteren die T-Kategorie und die N-Kategorie für das untersuchte Kollektiv als unabhängige prognostische Faktoren.

Schlussfolgerung: Die Analyse des Expressionsmusters von EpCAM im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus könnte im Rahmen einer Risikostratifizierung sinnvoll sein. Die klinische Anwendung einer adjuvanten, gegen EpCAM gerichteten Immuntherapie erscheint vor allen Dingen bei Patienten, deren Tumoren eine starke Überexpression des Moleküls zeigen aussichtsreich. Hinsichtlich eines Therapieansatzes mit spezifischen Antikörpern gegen EpCAM bedarf es der Etablierung potenter, gegebenenfalls humanisierter Antikörper, die sich bereits in klinischer Erprobung befinden. In seiner Rolle als Signaltransduktionsmolekül eröffnen sich möglicherweise neue Therapieoptionen auf molekularer Ebene, mit EpCAM als Zielstruktur.

7 Literaturverzeichnis

1. Piero Marco Fisichella, *Esophageal Cancer*. 2009, eMedicine.
2. Parkin, D., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., *Global Cancer Statistics, 2002*. CA Cancer J Clin 2005; 55:74-108, 2005.
3. RKI, G., *Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends*. 2008, Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister.
4. Statistisches Bundesamt, *Amtliche Todesursachenstatistik*. 2006.
5. Pickens, A., Orringer, M.B., *Geographical distribution and racial disparity in esophageal cancer*. Ann Thorac Surg. 2003 Oct;76(4):S1367-9, 2003.
6. Globocan. 2002, Globocan Database.
7. Munoz N, B.E., *Chemoprevention of oesophageal cancer*. IARC Sci Publ. 1996;136:27-33., 1996.
8. Enzinger PC, M.R., *Esophageal Cancer*. N Engl J Med. 2003 Dec 4;349(23):2241-52. Review, 2003.
9. Blot, W.J., McLaughlin, J.K., *The changing epidemiology of esophageal cancer*. Semin Oncol 1999;26(5 suppl15):2-8., 1999.
10. Bareiss, D., et al., *Current epidemiology of carcinoma of the esophagus and cardia in Germany*. Deutsche Medizinische Wochenschrift 2002 Jun 21;127(25-26):1367-74., 2002.
11. Stahl, M., Wilke, H., *Ösophaguskarzinom*. Therapiekonzepte Onkologie, ed. S. Seeber, Schütte, J.,(Hrsg.). Vol. 4. Auflage. 2003: Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
12. Khushalani N., *Cancer of the esophagus and stomach*. Mayo Clin Proc. 2008 Jun;83(6):712-22., 2008.
13. Ramasamy, K. and G. VV., *Corrosive ingestion in adults*. J Clin Gastroenterol. 2003 Aug;37(2):119-24, 2003.
14. Layke, J. and P. Lopez, *Esophageal cancer: a review and update*. Am Fam Physician. 2006;73:2187-2194., 2006.
15. Shimizu, M., Ban, S., Odze, RD., *Squamous dysplasia and other precursor lesions related to esophageal squamous cell carcinoma*. Gastroenterol Clin North Am. 2007 Dec;36(4):797-811, v-vi., 2007.

16. Coia, L.R. and E.R. Sauter, *Esophageal cancer*. Curr Probl Cancer. 1994 Jul-Aug;18(4):189-247., 1994.
17. Ribeiro, U.J., et al., *Risk factors for squamous cell carcinoma of the oesophagus*. Br J Surg 1996 Sep;83(9):1174-85., 1996.
18. Altorki, N.K., et al., *Squamous cell carcinoma of the esophagus: therapeutic dilemma*. World J Surg. 1994 May-Jun;18(3):308-11, 1994.
19. Chang, F., et al., *Evaluation of HPV, CMV, HSV and EBV in esophageal squamous cell carcinomas from a high-incidence area of China*. Anticancer Res. 2000 Sep-Oct;20(5C):3935-40., 2000.
20. Awerkiew, S., et al., *Esophageal cancer in Germany is associated with Epstein-Barr-virus but not with papillomaviruses*. Med Microbiol Immunol. 2003 Aug;192(3):137-40., 2003.
21. Risk, J.M., et al., *Tylosis oesophageal cancer mapped*. Nat Genet. 1994 Dec;8(4):319-21, 1994.
22. Jankowski, J.A., et al., *Molecular Evolution of the Metaplasia-Dysplasia-Adenocarcinoma Sequence in the Esophagus*. Am J Pathol. 1999 April; 154(4): 965-973., 1999.
23. Wong, A., Fitzgerald, R.C., *Epidemiologic risk factors for Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma*. Clin Gastroenterol Hepatol 2005;3:1-10., 2005.
24. Freeman, H.J., *Risk of gastrointestinal malignancies and mechanisms of cancer development with obesity and its treatment*. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2004;18:1167-75., 2004.
25. Patel, A., Preskitt, JT., Kuhn, JA., Hebel, RF., Wood, RE., Urschel, HC. Jr., *Surgical management of esophageal carcinoma*. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2003 Jul;16(3):280-4., 2003.
26. Greene, F.L., American Joint Committee on Cancer, American Cancer Society, *AJCC cancer staging manual, 6th ed*. New York: Springer, 2002: 93-4. 2002.
27. Iizuka, T., Isono, K., Kakegawa, T., Watanabe, H., *Parameters linked to ten-year survival in Japan of resected esophageal carcinoma*. Japanese Committee for Registration of Esophageal Carcinoma Cases. National Ooji Hospital, Tokyo, Japan., 1998.
28. Lehnert, T., *Multimodal therapy for squamous carcinoma of the oesophagus*. Br J Surg. 1999 Jun;86(6):727-39, 1999.

29. Jacobson, B.C., Hirota, W., Baron, T.H., Leighton, J.A., Faigel, D.O.; Standards of Practice Committee. American Society for Gastrointestinal Endoscopy., *The role of endoscopy in the assessment and treatment of esophageal cancer*. *Gastrointest Endosc.* 2003 Jun;57(7):817-22, 2003.
30. Wang, K.K., *Detection and staging of esophageal cancers*. *Curr Opin Gastroenterol.* 2004 Jul;20(4):381-5., 2004.
31. van Westreenen, H.L., Westerterp, M., Bossuyt, P.M., Pruijm, J., Sloof, G.W., van Lanschot, J.J., Groen, H., Plukker, J.T., *Systematic review of the staging performance of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in esophageal cancer*. *J Clin Oncol.* 2004 Sep 15;22(18):3805-12., 2004.
32. Sugarbaker, D.J., Jaklitsch, M.T., Liptay, M.J., *Thoracoscopic staging and surgical therapy for esophageal cancer*. *Chest.* 1995 Jun;107(6 Suppl):218S-223S. Review, 1995.
33. Mealy, K., Feely, J., Reid, I., McSweeney, J., Walsh, T., Hennessy, TP., *Tumour marker detection in oesophageal carcinoma*. *Eur J Surg Oncol.* 22: 505-507, 1996., 1996.
34. Enzinger, P.C., Ilson, D.H., Kelsen, D.P., *Chemotherapy in esophageal cancer*. *Semin Oncol.* 1999 Oct;26(5 Suppl 15):12-20., 1999.
35. Malthaner, R.A., Wong, R.K., Rumble, R.B., Zuraw, L.; Members of the Gastrointestinal Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based Care., *Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis*. *BMC Med.* 2004 Sep 24;2:35., 2004.
36. Wong, R., Malthaner, R., *Combined chemotherapy and radiotherapy (without surgery) compared with radiotherapy alone in localized carcinoma of the esophagus*. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006 Jan 25;(1):CD002092., 2006.
37. Urba, S.G., Orringer, M.B., Turrisi, A., Iannettoni, M., Forastiere, A., Strawderman, M., *Randomized trial of preoperative chemoradiation versus surgery alone in patients with locoregional esophageal carcinoma*. *J Clin Oncol.* 2001 Jan 15;19(2):305-13., 2001.
38. Group, M.R.C.O.C.W., *Surgical resection with or without preoperative chemotherapy in oesophageal cancer: a randomised controlled trial*. *Lancet.* 2002 May 18;359(9319):1727-33., 2002.
39. Arnott, S.J., Duncan, W., Gignoux, M., Hansen, H.S., Launois, B., Nygaard, K., Parmar, M.K., Rousell, A., Spilopoulos, Stewart, G., Tierney, J.F., Wang, M., Rhugang, Z.; Oesophageal Cancer Collaborative Group., *Preoperative radiotherapy for esophageal carcinoma*. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Oct 19;(4):CD001799., 2005.

40. Richel, D.J., Vervenne, W.L., *Systemic treatment of oesophageal cancer*. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2004 Mar;16(3):249-54., 2004.
41. Yang, H., Fu, J.H., Hu, Y., Lin, P., Liu, M.Z., Li, Q., Fang, Z.C., Hu, Y.H., *Neo-adjuvant chemoradiotherapy followed by surgery in treatment of advanced esophageal carcinoma*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2008 Dec 9;88(45):3182-5., 2008.
42. Fu, J.H., Rong, T.H., Li, X.D., Hu, Y., Ou, W., Hu, Y.H., Li, Q., *Chemoradiotherapy followed by surgery in treatment of locally advanced esophageal carcinoma: a phase II trial*. Ai Zheng. 2004 Nov;23(11 Suppl):1473-6., 2004.
43. Siewert, J.R., Stein, H.J., Feith, M., Bruecher, B.L., Bartels, H., Fink, U., *Histologic tumor type is an independent prognostic parameter in esophageal cancer: lessons from more than 1,000 consecutive resections at a single center in the Western world*. Ann Surg. 2001 Sep;234(3):360-7; discussion 368-9., 2001.
44. Bollschweiler, E., Hölscher, A.H., *Aktuelle Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms in Deutschland*. Onkologie 2001;24:180-184 (DOI: 10.1159/000050312), 2001.
45. Litvinov, S.V., Velders, M.P., Bakker, H.A., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., *Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule*. J Cell Biol. 1994 Apr;125(2):437-46., 1994.
46. Baeuerle, P.A., Gires, O., *EpCAM (CD326) finding its role in cancer*. Br J Cancer. 2007 Feb 12;96(3):417-23. Epub 2007 Jan 9., 2007.
47. Balzar, M., Winter, M.J., de Boer, C.J., Litvinov, S.V., *The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)*. J Mol Med. 1999 Oct;77(10):699-712., 1999.
48. Trzpis, M., McLaughlin, P.M., de Leij, L.M., Harmsen, M.C., *Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule*. Am J Pathol. 2007 Aug;171(2):386-95. Epub 2007 Jun 28., 2007.
49. Balzar, M., Bakker, H.A., Briaire-de-Bruijn, I.H., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., Litvinov, S.V., *Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule*. Mol Cell Biol. 1998 Aug;18(8):4833-43., 1998.
50. Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D., Koprowski, H., *Colorectal carcinoma specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Mar;76(3):1438-42., 1979.
51. Koprowski, H., Steplewski, Z., Mitchell, K., Herlyn, M., Herlyn, D., Fuhrer, P., *Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies*. Somatic Cell Genet. 1979 Nov;5(6):957-71., 1979.

52. Litvinov, S.V., van Driel, W., van Rhijn, C.M., Bakker, H.A., van Krieken, H., Fleuren, G.J., Warnaar, S.O., *Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation*. Am J Pathol. 1996 Mar;148(3):865-75., 1996.
53. Winter, M.J., Nagelkerken, B., Mertens, A.E., Rees-Bakker, H.A., Briaire-de Bruijn, I.H., Litvinov, S.V., *Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak*. Exp Cell Res. 2003 Apr 15;285(1):50-8., 2003.
54. Guillemot, J.C., Naspetti, M., Malergue, F., Montcourrier, P., Galland, F., Naquet, P., *Ep-CAM transfection in thymic epithelial cell lines triggers the formation of dynamic actin-rich protrusions involved in the organization of epithelial cell layers*. Histochem Cell Biol. 2001 Oct;116(4):371-8., 2001.
55. Christofori, G., Semb, H., *The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene*. Trends Biochem Sci. 1999 Feb;24(2):73-6., 1999.
56. Ladwein, M., Pape, U.F., Schmidt, D.S., Schnölzer, M., Fiedler, S., Langbein, L., Franke, W.W., Moldenhauer, G., Zöller, M., *The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7*. Exp Cell Res. 2005 Oct 1;309(2):345-57., 2005.
57. Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P.A., Munz, M., Gires, O., *Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM*. Nat Cell Biol. 2009 Feb;11(2):162-71. Epub 2009 Jan 11., 2009.
58. Münz, M., Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., Zeidler, R., Gires, O., *The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation*. Oncogene. 2004 Jul 29;23(34):5748-58., 2004.
59. Pauli, C., Münz, M., Kieu, C., Mack, B., Breinl, P., Wollenberg, B., Lang, S., Zeidler, R., Gires, O., *Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas*. Cancer Lett. 2003 Apr 10;193(1):25-32., 2003.
60. Momburg, F., Moldenhauer, G., Hämmerling, G.J., Möller, P., *Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues*. Cancer Res. 1987 Jun 1;47(11):2883-91., 1987.
61. de Boer, C.J., van Krieken, J.H., Janssen-van Rhijn, C.M., Litvinov, S.V., *Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver*. J Pathol. 1999 Jun;188(2):201-6., 1999.

-
62. Kasper, M., Behrens, J., Schuh, D., Müller, M., *Distribution of E-cadherin and Ep-CAM in the human lung during development and after injury*. Histochem Cell Biol. 1995 Apr;103(4):281-6., 1995.
 63. Went, P.T., Lugli, A., Meier, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Sauter, G., Dirnhofer, S., *Frequent EpCam protein expression in human carcinomas*. Hum Pathol. 2004 Jan;35(1):122-8., 2004.
 64. Salem, R.R., et al., *Expression of colorectal carcinoma-associated antigens in colonic polyps*. J Surg Res. 1993 Sep;55(3):249-55., 1993.
 65. Packeisen, J., Kaup-Franzen, C., Knieriem, H.J., *Detection of surface antigen 17-1A in breast and colorectal cancer*. Hybridoma. 1999 Feb;18(1):37-40., 1999.
 66. Songun, I., van de Velde, C.J., Hermans, J., Pals, S.T., Verspaget, H.W., Vis, A.N., Menon, A.G., Litvinov, S.V., van Krieken, J.H., *Expression of oncoproteins and the amount of eosinophilic and lymphocytic infiltrates can be used as prognostic factors in gastric cancer. Dutch Gastric Cancer Group (DGCG)*. Br J Cancer. 1996 Dec;74(11):1783-8., 1996.
 67. Songun, I., Litvinov, S.V., van de Velde, C.J., Pals, S.T., Hermans, J., van Krieken, J.H., *Loss of Ep-CAM (CO17-1A) expression predicts survival in patients with gastric cancer*. Br J Cancer. 2005 May 9;92(9):1767-72., 2005.
 68. Salnikov, A., Groth, A., Apel, A., Kallifatidis, G., Beckermann, BM., Khamidjanov, A., Ryschich, E., Büchler, MW., Herr, I., Moldenhauer, G., *Targeting of cancer stem cell marker EpCAM by bispecific Antibody EpCAMxCD3 inhibits pancreatic carcinoma*. J Cell Mol Med. 2009 Apr 2., 2009.
 69. Spizzo, G., et al., *High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer*. Breast Cancer Res Treat. 2004 Aug;86(3):207-13., 2004.
 70. Joo, M., Kim, H., Kim, M.K., Yu, H.J., Kim, J.P., *Expression of Ep-CAM in intestinal metaplasia, gastric epithelial dysplasia and gastric adenocarcinoma*. J Gastroenterol Hepatol. 2005 Jul;20(7):1039-45., 2005.
 71. Varga, M., Obrist, P., Schneeberger, S., Mühlmann, G., Felgel-Farnholz, C., Fong, D., Zitt, M., Brunhuber, T., Schäfer, G., Gastl, G., Spizzo, G., *Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival*. Clin Cancer Res. 2004 May 1;10(9):3131-6., 2004.
 72. Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Moch, H., Baeuerle, P.A., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Gastl, G., Zeimet, A.G., *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 Nov;103(2):483-8. Epub 2006 May 6., 2006.
73. de Boer, C.J., van Krieken, J.H., Janssen-van Rhijn, C.M., Litvinov, S.V., *Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver.* *J Pathol.* 1999 Jun;188(2):201-6., 1999.
74. Wong, N.A., Warren, B.F., Piris, J., Maynard, N., Marshall, R., Bodmer, W.F., *EpCAM and gpA33 are markers of Barrett's metaplasia.* *J Clin Pathol.* 2006 Mar;59(3):260-3. Epub 2006 Feb 10., 2006.
75. Stoecklein, N.H., Siegmund, A., Scheunemann, P., Luebke, A.M., Erbersdobler, A., Verde, P.E., Eisenberger, C.F., Peiper, M., Rehders, A., Esch, J.S., Knoefel, W.T., Hosch, S.B., *Ep-CAM expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker.* *BMC Cancer.* 2006 Jun 23;6:165., 2006.
76. Spizzo, G., Obrist, P., Ensinger, C., Theurl, I., Dünser, M., Ramoni, A., Gunsilius, E., Eibl, G., Mikuz, G., Gastl, G., *Prognostic significance of Ep-CAM AND Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer.* *Int J Cancer.* 2002 Apr 20;98(6):883-8., 2002.
77. Gastl, G., Spizzo, G., Obrist, P., Dünser, M., Mikuz, G., *Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival.* *Lancet.* 2000 Dec 9;356(9246):1981-2., 2000.
78. Riethmüller, G., Schneider-Gädicke, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Höffken, K., Gruber, R., Pichlmaier, H., Hirche, H., Pichlmayr, R., et al., *Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group.* *Lancet.* 1994 May 14;343(8907):1177-83., 1994.
79. Riethmüller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Höffken, K., Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., Buggisch, P., Witte, J., Pichlmayr, R., *Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial.* *J Clin Oncol.* 1998 May;16(5):1788-94., 1998.
80. Haller, D., *Update of clinical trials with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal cancer.* *Semin Oncol.* 2001 Feb;28(1 Suppl 1):25-30., 2001.
81. Punt, C., Nagy, A., Douillard, J.Y., Figer, A., Skovsgaard, T., Monson, J., Barone, C., Fountzilas, G., Riess, H., Moylan, E., Jones, D., Dethling, J., Colman, J., Coward, L., MacGregor, S., *Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study.* *Lancet.* 2002 Aug 31;360(9334):671-7., 2002.

82. Fields, A., Keller, A., Schwartzberg, L., Bernard, S., Kardinal, C., Cohen, A., Schulz, J., Eisenberg, P., Forster, J., Wissel, P., *Adjuvant therapy with the monoclonal antibody Edrecolomab plus fluorouracil-based therapy does not improve overall survival of patients with stage III colon cancer*. J Clin Oncol. 2009 Apr 20;27(12):1941-7. Epub 2009 Mar 9., 2009.
83. Pimm, M., Gribben, S.J., *Influence of syngeneic (anti-idiotypic) antibody responses on biodistribution and tumour localisation of murine monoclonal antibodies and fragments*. Anticancer Res. 1993 Jan-Feb;13(1):241-8., 1993.
84. Lutterbuese, P., Brischwein, K., Hofmeister, R., Crommer, S., Lorenczewski, G., Petersen, L., Lippold, S., da Silva, A., Locher, M., Baeuerle, PA., Schlereth, B., *Exchanging human Fcγ1 with murine Fcγ2a highly potentiates anti-tumor activity of anti-EpCAM antibody adecatumumab in a syngeneic mouse lung metastasis model*. Cancer Immunol Immunother. 2007 Apr;56(4):459-68. Epub 2006 Aug 26., 2007.
85. Wittekind, C., Compton, C.C., Greene, F.L., Sobin, L.H., *TNM residual tumor classification revisited*. Cancer. 2002 May 1;94(9):2511-6., 2002.
86. Packeisen, J., Korsching, E., Herbst, H., Boecker, W., Buerger, H., *Demystified.tissue microarray technology*. Mol Pathol. 2003 Aug;56(4):198-204., 2003.
87. Nocito, A., Kononen, J., Kallioniemi, OP., Sauter, G., *Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research*. Int J Cancer. 2001 Oct 1;94(1):1-5., 2001.
88. Avninder, S., Ylaya, K., Hewitt, SM., *Tissue microarray: a simple technology that has revolutionized research in pathology*. J Postgrad Med. 2008 Apr-Jun;54(2):158-62., 2008.
89. Büttner, R., Thomas, C., *Allgemeine Pathologie; 3. Auflage*. 2003.
90. Böcker, W.H., *Pathologie*. Vol. 2. Auflage. 2001: München; Jena: Urban und Fischer.
91. Boenisch, T., *Formalin-fixed and heat-retrieved tissue antigens: a comparison of their immunoreactivity in experimental antibody diluents*. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2001 Jun;9(2):176-9., 2001.
92. Winter, M., Nagtegaal, ID., van Krieken, JH., Litvinov, SV., *The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology*. Am J Pathol. 2003 Dec;163(6):2139-48., 2003.
93. Camp, R., Charette, LA., Rimm, DL., *Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma*. Lab Invest. 2000 Dec;80(12):1943-9., 2000.

-
94. N. Lindenlauf, C.V., S. A. Topp, C. F. Eisenberger, S. E. Baldus, A. H. Hölscher, W. T. Knoefel, N. H. Stoecklein, *Die Down-Regulation von EpCAM im Zuge der Metaplasie-Karzinom-Sequenz beim Barrett-Karzinom des Ösophagus korreliert mit einer ungünstigen Prognose*. Chirurgisches Forum und DGAV Forum 200, 2009.
 95. Seligson, D., Pantuck, AJ., Liu, X., Huang, Y., Horvath, S., Bui, MH., Han, KR., Correa, AJ., Eeva, M., Tze, S., Belldegrun, AS., Figlin, RA., *Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res. 2004 Apr 15;10(8):2659-69., 2004.
 96. 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 Jan 16;94(1):128-35., 2006.
 97. Kimura, H., Kato, H., Faried, A., Sohda, M., Nakajima, M., Fukai, Y., Miyazaki, T., Masuda, N., Fukuchi, M., Kuwano, H., *Prognostic significance of EpCAM expression in human esophageal cancer*. Int J Oncol. 2007 Jan;30(1):171-9., 2007.
 98. Mukherjee, S., et al., *Identification of EpCAM as a Molecular Target of Prostate Cancer Stroma*. Am J Pathol. 2009 Oct 22., 2009.
 99. Birchmeier, W., Hülsken, J., Behrens, J., *E-cadherin as an invasion suppressor*. Ciba Found Symp. 1995;189:124-36; discussion 136-41, 174-6., 1995.
 100. Giehl, K., Menke, A., *Microenvironmental regulation of E-cadherin-mediated adherens junctions*. Front Biosci. 2008 May 1;13:3975-85., 2008.
 101. Hosch, S.B., Stoecklein, N.H., Pichlmeier, U., Rehders, A., Scheunemann, P., Niendorf, A., Knoefel, W.T., Izbicki, J.R., *Esophageal cancer: the mode of lymphatic tumor cell spread and its prognostic significance*. J Clin Oncol. 2001 Apr 1;19(7):1970-5., 2001.
 102. Osta, W.A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M., Hannun, Y.A., Cole, D.J., Gillanders, W.E., *EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy*. Cancer Res. 2004 Aug 15;64(16):5818-24., 2004.
 103. Yanamoto, S., Kawasaki, G., Yoshitomi, I., Iwamoto, T., Hirata, K., Mizuno, A., *Clinicopathologic significance of EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the tongue and its possibility as a potential target for tongue cancer gene therapy*. Oral Oncol. 2007 Oct;43(9):869-77. Epub 2007 Jan 4., 2007.

-
104. Kim, Y., Kim, HS., Cui, ZY., Lee, HS., Ahn, JS., Park, CK., Park, K., Ahn, MJ., *Clinicopathological implications of EpCAM expression in adenocarcinoma of the lung*. *Anticancer Res.* 2009 May;29(5):1817-22., 2009.
 105. Hartung, G., et al, *Adjuvant therapy with edrecolomab versus observation in stage II colon cancer: a multicenter randomized phase III study*. *Onkologie.* 2005 Jun;28(6-7):347-50. Epub 2005 Jun 2., 2005.
 106. Bokemeyer. C, *Catumaxomab - trifunctional anti-EpCAM antibody used to treat malignant ascites*. *Expert Opin Biol Ther.* 2010 Aug;10(8):1259-69., 2010.
 107. Schmelzle M Dizdar L Matthaehi H Baldus SE, W.J.L.N.B.I.C.R.K.F., Topp SA Schulte am Esch J 2nd, Eisenberger CF Knoefel WT Stoecklein NH, *Esophageal cancer proliferation is mediated by cytochrome P450 2C9 (CYP2C9)*. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*; Volume 94, Issues 1-2 February 2011, Pages 25-33, 2011.

8 Anhang

Tabelle 3-1: Patientenkollektiv mit histopathologischen Daten

TNM-Klassifikation	absolut	prozent
<i>Tumorausdehnung (T)</i>		
T 1	19	16,1
T 2	25	21,2
T 3	69	58,5
T 4	5	4,2
<i>Lymphknoten (N)</i>		
N 0	41	34,7
N 1	77	65,3
N 2	0	0
<i>Fermetastasen (M)</i>		
M X	3	2,5
M 0	115	97,5
M 1	0	0
<i>Differenzierungsgrad (G)</i>		
G 1	2	1,7
G 2	67	56,8
G 3	49	41,5

8.1 Danksagung

Mein innigster Dank gehört meinem Doktorvater und Betreuer von Anbeginn an bis zur Vollendung dieser Arbeit, Herrn Professor Dr. med. N.H. Stoecklein. Er war stets engagierter Diskussionspartner und Ratgeber in allen Belangen die Dissertation betreffend. Nicht nur trug seine Unterstützung in praktischen Fragen und seine Leidenschaft für die onkologische Forschung zu einem sehr interessanten und lehrreichen Forschungssemester bei, für seine Geduld und menschliche Wärme möchte ich darüber hinaus danken.

Für die hervorragenden Bedingungen zur Durchführung der Analysen im chirurgischen Forschungslabor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. W.T. Knoefel.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Professor Dr. med. S.E. Baldus für seine Unterstützung und die großzügige Bereitstellung eines Großteils der hier analysierten Patientenproben aus der Domstadt aussprechen. Er hat den Rahmen der vorliegenden Arbeit entscheidend geprägt. Ebenfalls möchte ich mich für die Unterstützung und Ratschläge bedanken, nicht nur einmal habe ich an seine Bürotür klopfen dürfen.

Nicht zuletzt gilt meine Dankbarkeit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, wo mir großzügig Zeit, Raum und die notwendigen technischen Mittel zur Verfügung gestellt wurden, um den Tissue Micro Array zu erstellen. Die Medizintechnischen Assistentinnen halfen durch ihr Geschick am Mikrotom, den respektvollen und sparsamen Umgang mit den Patientenproben zu gewährleisten.

Letzlich bleibt die Frage bei der Verfassung einer Danksagung, welches über die Studienjahre, die Schulzeit und die Kinder und Jugendzeit, die Konstanten im Leben eines Menschen sind. Hier bleibt mir, meiner über alles geliebten Familie meine tiefe Verbundenheit und Liebe auszudrücken, die über alle akademischen Errungenschaften hinaus erhaben ist.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Personal Tissue Arrayer (MTA1) Firma Beecher, Sun Prairie, USA (Quelle: [www. beecherinstruments.com](http://www.beecherinstruments.com))

Abbildung 2: Ausschnittsweise Darstellung des TMA - Designs, beispielhaft für einen Patienten

Abbildung 3: Prinzip der Entnahme und Überführung von Gewebestanzen

Abbildung 4: Gefertigte Tissue Micro Array - Paraffinblöcke mit 562 Stanzen aus Tumorgewebe, Normalmucosa und Lymphknotenmetastasen, sowie den oberhalb erkennbaren Stanzen von Fremdgewebe als Orientierungshilfe

Abbildung 5: Das Prinzip der ABC - Methode (Quelle: Vector Laboratories, Inc.)

Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der unterschiedlichen Färbegrade anhand von Stanzen in 10x Vergrößerung, gemäß der Auswertung nach dem *HercepTest*[™]

Abbildung 7: Stanzen von Normalmucosa des Ösophagus. Links 100fache Vergrößerung, rechts 400fache Vergrößerung. Es liegt ein insgesamt negatives Färbeergebnis für EpCAM vor.

Abbildung 8: EpCAM - Expression im Tumorgewebe nach der Hercep - Klassifikation

Abbildung 9: EpCAM - Expression im Tumorgewebe nach dem Remmele – Score (IRS)

Abbildung 10: Vergleichende Darstellung der Expression von EpCAM in der Invasionsfront und in zentralen Tumoranteilen (*HercepTest*[™])

Abbildung 11: Expression von EpCAM in regionären Lymphknotenmetastasen (*HercepTest*[™])

Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung heterogener Expression von EpCAM in der Invasionsfront (links) und im Zentrum (rechts) des Tumors.

Abbildung 13: Korrelation der Expression von EpCAM mit der Tumorgröße (T) gemäß der Klassifikation nach dem TNM - System.

Abbildung 14: Darstellung der EpCAM - Expression in Korrelation mit dem Differenzierungsgrad (G).

Abbildung 15: Kaplan Meier Überlebenskurve für die Expression von EpCAM (Log-Rang-Test 0,035)

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Übersicht der Risikofaktoren, die mit den beiden häufigsten Ösophaguskarzinom - Typen assoziiert sind

Tabelle 1-2: TNM - Klassifikation von Tumoren des Ösophagus (UICC 2002) und des American Joint Committee on Cancer Staging System [26]

Tabelle 1-3: 5 - Jahresüberlebensraten von Patienten mit Ösophaguskarzinomen nach Resektion (Stadien I bis III) bzw. palliativer Chemotherapie (Stadium IVB) gemäß der AJCC - Stadieneinteilung.

Tabelle 3-1: Patientenkollektiv mit histopathologischen Daten (Anhang)

Tabelle 3-2: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Tabelle 3-3: Substanzen und Geräte

Tabelle 3-4: Auswertungsprinzip der immunhistochemischen Färbung nach dem *HercepTest*TM

Tabelle 3-5: Prinzip der Auswertung von immunhistochemischen Färbungen nach dem *Remmele - Score* (syn. Immunreaktiver Score; IRS)

Tabelle 4-1: Korrelation der Expression von EpCAM mit der TNM - Klassifikation

Tabelle 4-2: Korrelation von fehlender und hoher EpCAM - Expression mit dem G - Status

Tabelle 4-3: Korrelation von EpCAM - Expression und Geschlecht bzw. Alter im Gesamtkollektiv

Tabelle 4-4: Univariate und multivariate Überlebensanalyse prognostischer Parameter

Tabelle 5-1: Übersicht bisheriger Studien zur prognostischen Bedeutung einer EpCAM - Überexpression in verschiedenen Tumorentitäten.

8.4 Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Bidestilliertes Wasser
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Complex Methode
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
CA 125	Cancer Antigen 125 (Tumormarker)
CA 19-9	Cancer Antigen 19-9 (Tumormarker)
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CIN	cervikale intraepitheliale Neoplasie
CT	Computertomographie
cTNM	klinische Tumorklassifikation
DAB	3,3'- Diaminobenzidin (Chromogen)
EGF	epidermal growth factor
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
5 FU	5 - Fluorouracil
GERD	gastroesophageal reflux disease
GIST-Tumoren	gastrointestinale Stromatumoren
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HRP	horseradish peroxidase
IRS	Immunreaktiver Score
ISDE	International Society for Diseases of the Esophagus
MTA1	Personal Tissue Arrayer
PBS	“Phosphate buffered saline” (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PEG	perkutane endoskopische Gastrostomie
PET	Positronenemissionstomographie
pTNM	pathologische Tumorklassifikation
SCC	Squamous cell carcinoma (auch: Squamous cell carcinoma antigen)
TACSTD1	tumor-associated calcium signal transducer 1
Tis	In - situ - Karzinom
TMA	Tissue Micro Array
TNM	Klassifikation/System zur Stadieneinteilung maligner Tumoren
TY	Thyroglobulin - Domäne
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Judith Regina Wolters
Geburtsdatum	23.07.1979
Geburtsort	Köln
Familienstand	ledig

Schulbildung/Berufsausbildung

1985-1989	Katholische Grundschule Rösrath
1989-1993	Freiherr vom Stein Gymnasium Rösrath
1993-1998	Clara-Fey Gymnasium, Bonn Bad Godesberg
08/1996-11/1997	Intermediate School Killorglin, Irland
06/1998	Abitur
1998-2001	Ausbildung zur Medizinisch technischen Assistentin, Philipps Universität Marburg, Marburg/Lahn
09/2001	Staatsexamen

Studium

2001 - 2008	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
03/2004	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
12/2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Staatsexamen)
01/2009	Erteilung der Approbation

Ärztliche Tätigkeit

04/2011 - heute	Assistenzärztin in der Klinik für Urologie der Kliniken Maria Hilf GmbH in Mönchengladbach
08/2009-12/2010	Assistenzärztin in der Abteilung für Allgemein- Viszeral- Thorax und Gefäßchirurgie an den Städtischen Kliniken Neuss

9.1 Veröffentlichungen

1. **Neo-Expression von EpCAM beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus Prognostischer Marker und potentielle Zielstruktur**

J. Wolters, C. Vay, S. Topp, C.F. Eisenberger, S.E. Baldus, W.T. Knoefel, N.H.

Stoecklein

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf,
Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf.

*Deutsche Gesellschaft für Chirurgie; Forumband , Band 38 Schumpelick, Volker; Bruch,
Hans-Peter; Schackert, Hans Konrad (Hrsg.) 2009, XXI*

2. **Esophageal cancer proliferation is mediated by cytochrome P450 2C9 (CYP2C9)**

M. Schmelzle, L.Dizdar, H. Matthaei, S.E. Baldus, J. Wolters, N. Lindenlauf, I. Bruns,
R.P. Cadeddu, F. Kröpil, S.A. Topp, J. Schulte am Esch, C.F. Eisenberger, W.T. Knoefel,
N.H. Stoecklein

Department of Surgery, University Hospital Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2011 Feb;94(1-2):25-33. Epub 2010 Dec 15. [107]