

Aus der
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

**Untersuchung zur Expression
der Integrin-Untereinheiten α_2 , α_3 , α_6 , β_1 und β_4 beim
Plattenepithelkarzinom des Ösophagus**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Christian Vay

2006

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Stefan Benedikt Hosch

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Wolfgang Linhart

1	Einleitung.....	5
1.1	Einführung.....	5
1.2	Anatomie des Ösophagus.....	6
1.3	Das Ösophaguskarzinom	7
1.3.1	Inzidenz und Epidemiologie.....	7
1.3.2	Ätiologie und Prädisposition.....	8
1.3.3	Klassifikation des Ösophaguskarzinoms.....	11
1.3.4	Diagnostik und Therapie.....	14
1.3.5	Prognose.....	16
1.4	Integrine	17
1.4.1	Aufbau und Funktion	18
1.4.2	Integrine als Laminin-Rezeptoren.....	21
1.4.3	Integrin-Expression im Plattenepithel des Ösophagus	23
1.4.4	Integrin-Expression bei soliden Tumoren	24
1.5	Ziele der Studie.....	25
2	Patienten, Material und Methoden	26
2.1	Patienten.....	26
2.2	Gewebeaufbereitung	28
2.3	Immunfluoreszenzfärbung	28
2.3.1	Primärantikörper	29
2.3.2	Sekundärantikörper	29
2.3.3	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen	30
2.3.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	31
2.3.5	Hämalaun-Eosin-Färbung	32
2.4	Auswertung	33
2.4.1	Beurteilung des Invasionsverhaltens.....	34
2.4.2	Beurteilung der Integrin-Expression	34
2.4.3	Hierarchische Ähnlichkeitsanalysen	36
2.4.4	Statistische Analysen	36

3	Ergebnisse	37
3.1	Tumormorphologie und Invasionsverhalten	37
3.2	Integrin-Expression	41
3.2.1	α_2 -Integrin-Untereinheit	43
3.2.2	α_3 -Integrin-Untereinheit	45
3.2.3	α_6 -Integrin-Untereinheit	48
3.2.4	β_1 -Integrin-Untereinheit	51
3.2.5	β_4 -Integrin-Untereinheit	54
3.3	Auswertung und statistische Analysen	56
3.3.1	Integrin-Expression im Plattenepithel des Ösophagus	56
3.3.2	Integrin-Expression im Tumorgewebe	57
3.3.3	Integrin-Expression am Übergang von Epithel und Tumor zur ECM	59
3.3.4	Expressionsmuster und Polarisierung	62
3.3.5	Integrin-Expression und das Invasionsverhalten der Primärtumoren	64
3.3.6	Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse anhand der Expressionsstärken	64
3.3.7	Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse anhand der Expressionsmuster	65
3.3.8	Einfluss der Integrin-Expression auf das rezidivfreie Überleben der Patienten	68
4	Diskussion	72
4.1	Tumormorphologie und Invasionsverhalten	72
4.2	Integrin-Expression im Plattenepithel des Ösophagus	74
4.3	Integrin-Expression beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	75
4.3.1	Expression des Integrins $\alpha_2\beta_1$	75
4.3.2	Expression des Integrins $\alpha_3\beta_1$	76
4.3.3	Expression der Integrine $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$	78
4.3.4	Alterationen im Expressionsmuster der Integrine	81
4.4	Evaluierung der Immunfluoreszenzfärbung	83
4.5	Resümee	84
5	Literaturverzeichnis	86
6	Danksagung	96
7	Lebenslauf	97
8	Zusammenfassung	98

1 Einleitung

1.1 Einführung

In den westlichen Industrieländern stellen maligne Tumoren epithelialen Ursprungs die Mehrzahl aller Krebsneuerkrankungen und krebsbezogenen Todesfälle dar. Bei frühzeitiger Diagnose können Karzinome durch die vollständige operative Entfernung des Primärtumors kurativ behandelt werden. In späteren Krankheitsstadien entwickeln sich maligne Neoplasien zu einer Erkrankung des Gesamtorganismus, wobei nach der systemischen Ausbreitung von bösartigen Tumorzellen Tochtergeschwülste (*Metastasen*) entstehen, die in der Mehrheit der Fälle zum letalen Ausgang der Tumorerkrankung führen [1].

Unter den soliden Tumoren zeichnet sich das Ösophaguskarzinom durch einen besonders aggressiven Krankheitsverlauf mit frühzeitiger lymphogener Metastasierung und eine insgesamt schlechte Prognose aus [2]. Während die Inzidenz des Ösophagus-Plattenepithelkarzinoms in der Bundesrepublik Deutschland seit den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts stabil geblieben ist, werden für den gleichen Zeitraum steigende Inzidenzen für das Adenokarzinom des Ösophagus beschrieben. Dennoch stellt das Plattenepithelkarzinom in Deutschland mit über 80% aller auftretenden Fälle weiterhin die Mehrheit der malignen Neoplasien des Ösophagus dar [3].

Bei der Entstehung von Metastasen handelt es sich um einen komplexen, mehrstufigen Prozess. Hierbei kommt es in einem ersten Schritt innerhalb des Primärtumors zur Entwicklung von Zellvarianten, die sich aus dem Tumorzellverband lösen, durch das umgebende Gewebe migrieren und nach Invasion von Lymph- und Blutgefäßen in die Zirkulation gelangen [4, 5]. Nach Erreichen der Sekundärorgane erfolgt in den letzten drei Schritten der Metastasierungskaskade die Adhäsion an das Gefäßendothel, gefolgt von Extravasation und Proliferation, wobei die Proliferation in der neuen Gewebsumgebung stark von gewebespezifischen Faktoren abhängig ist [6]. Auf molekularer Ebene konnte eine Reihe von Faktoren identifiziert werden, die im Rahmen der Metastasierungskaskade eine Rolle zu spielen scheinen. So führt zunächst eine Niederregulation (engl. *down-regulation*) von desmosomalen Adhäsionsmolekülen, wie *E-Cadherin* und *Plakoglobin*, zum Verlust der wechselseitigen Adhäsion im Tumorzellverband [7]. Anschließend wird die Invasion und Migration der Tumorzellen in das umgebende Stroma durch die Expression von Motilitätsfaktoren, wie dem *Scatter factor/Hepatocyte growth factor (SF/HGF)* und den *Transforming growth factors (TGFs)*, sowie durch Sekretion von Proteasen wie *Cathepsin D*, *Metallo-Matrixproteinasen (MMPs)* und *Plasminogenaktivatoren* begünstigt [8-11].

In der vorliegenden Studie wurde die Expression der Integrine $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus untersucht. Bei den Integrinen handelt es sich um heterodimerische, transmembrane Glykoproteine, die bei der Interaktion von Zellen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix (engl. *extracellular matrix, ECM*) eine zentrale Rolle spielen [12]. Unter anderem sind sie Voraussetzung für die dynamische Adhäsion von migrierenden Zellen an Bindegewebsstrukturen. Andererseits tragen die Integrine maßgeblich zur stabilen Verankerung von epithelialen Zellverbänden an der Basalmembran bei. Als Signaltransduktoren sind sie gemeinsam mit verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen an der Regulation von Differenzierung, Wachstum und Proliferation von epithelialen Zellen beteiligt [13, 14]. Darüber hinaus können Integrine das Auslösen des programmierten Zelltods (*Apoptose*) verhindern und damit zum Überleben von

epithelialen Zellen außerhalb ihres Zellverbands beitragen [15, 16]. Aus den genannten Eigenschaften leitet sich eine zentrale Bedeutung der Integrine bei der Migration, Invasion und Metastasierung von malignen Tumoren ab [17-19]. In zahlreichen Studien hat sich ein Einfluss der Integrin-Expression auf das Invasionsverhalten von Tumorzellen gezeigt [20]. Insbesondere im Hinblick auf die frühen Schritte des invasiven Wachstums von Karzinomen, währenddessen möglicherweise bereits eine systemische Streuung der potentiellen Vorläuferzellen von Metastasen stattfindet [21], ergibt sich die Fragestellung, inwieweit die infiltrierenden Tumorzellen eine veränderte Integrin-Expression aufweisen und welchen Einfluss diese bei der Penetration der Basalmembran und der Invasion in angrenzende Strukturen besitzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels einer Immunfluoreszenzfärbung die Expression verschiedener Integrin-Untereinheiten bei 36 Patienten mit Ösophagus-Plattenepithelkarzinomen untersucht. Die experimentellen Ergebnisse wurden mit etablierten klinisch-pathologischen Parametern sowie den Ergebnissen der Nachsorgeuntersuchungen korreliert.

1.2 Anatomie des Ösophagus

Die Speiseröhre (Ösophagus) ist ein elastisch verformbarer, muskulöser Schlauch, welcher der Beförderung der Nahrung vom Pharynx in den Magen dient. Der erste Teil des griechischen Begriffs *oisopagos* leitet sich von Alt-Griechisch *oiein* mit der Bedeutung „tragen“ ab. Der zweite Teil wird auf gr. *phagos* mit der Bedeutung „essen“ bzw. das zugehörige Nomen gr. *phagema* zurückgeführt [22].

Sofern nicht anders gekennzeichnet, entstammen die nachfolgenden Angaben den Arbeiten zur chirurgischen Anatomie des Ösophagus von Halata und Liebermann-Meffert [23, 24]. Der Ösophagus beginnt etwa 15 cm von den Schneidezähnen entfernt am unteren Rand des Ringknorpels in Höhe des 6.–7. Halswirbels und mündet nach einer Länge von 24–33 cm in Höhe des 10.–12. Brustwirbels in die Kardia des Magens (*Ostium cardiacum*). Nach anatomischen Gesichtspunkten wird der Ösophagus in einen Halsteil (*Pars cervicalis*, C6–Th1), einen Brustteil (*Pars thoracica*, Th2–Th10) und einen Bauchteil (*Pars abdominalis*, Th10–Th11) unterteilt. Im Verlauf der Speiseröhre existieren drei Engen. Die obere Enge (*Angustia cricoidea*), auch Ösophagusmund genannt, befindet sich dorsal des Ringknorpels (*Cartilago cricoidea*) und stellt die engste Stelle der Speiseröhre dar. Die mittlere Enge (*Angustia aortica*) befindet sich 22–25 cm aboral. In Höhe des 4.–5. Brustwirbels engen die dorsal kreuzende Aorta und der ventral verlaufende linke Hauptbronchus die Speiseröhre ein. Die untere Enge (*Angustia diaphragmatica*) liegt etwa 40–44 cm aboral an der Durchtrittsstelle der Speiseröhre durch das Zwerchfell (*Hiatus oesophageus*). Oberhalb dieser Enge ist die Speiseröhre besonders erweiterbar (*Ampulla epiphrenica*, *Vestibulum*).

Wie im gesamten Gastrointestinaltrakt zeigt die Wand des Ösophagus die charakteristische Schichtung in *Tunica mucosa*, *Tela submucosa*, *Tunica muscularis* und *Tunica adventitia*. Der Ösophagus wird unterhalb des Zwerchfells teilweise von *Serosa* bekleidet. Die *Tunica mucosa* besteht aus einem mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithel, einer dünnen *Lamina propria* aus netzartigem Bindegewebe mit vereinzelt Lymphfollikeln und einer *Lamina muscularis propria* aus vorwiegend längs verlaufender glatter Muskulatur [25]. Das Plattenepithel ist zur Schleimhaut der Kardia scharf abgegrenzt (*Ora serrata*, *Z-Linie*), allerdings kommen im unteren Drittel des Ösophagus gelegentlich Inseln von Magenschleimhaut vor. Im proximalen und

distalen Anteil findet man zusätzlich Schleimdrüsen in der Lamina propria, welche histologisch den Kardiadrüsen des Magens entsprechen. Die Tela submucosa besteht aus areolärem Bindegewebe, welches elastische und kollagene Fasern enthält. Die Submukosa führt neben feinen Blutgefäßen, Lymphkanälen und Nerven (*Plexus submucosus*, *Meißner*) im oberen und unteren Drittel der Speiseröhre die rein mukösen *Glandulae oesophageae*, die mit einem kurzen, oft ampullär erweiterten Ausführungsgang ins Epithel münden. Die Tunica muscularis enthält im oberen Anteil des Ösophagus zunächst nur quergestreifte, dann quergestreifte und glatte und kaudal der Trachealbifurkation ausschließlich glatte Muskulatur. Im Querschnitt durch den kontrahierten und geschrumpften Ösophagus scheint die Muskularis aus einer inneren Ring- und einer äußeren Längsmuskelschicht zu bestehen. Nach Kaufmann et al. handelt es sich allerdings um ein morphologisch und funktionell einheitliches System von Muskelfasern, welche außen mit einem steilen Verlauf beginnen und sich dann schraubengleich je nach Dehnungszustand des Ösophagus unterschiedlich schräg bis zu einem zirkulären Verlauf nach innen winden [26]. Zwischen den Muskelschichten findet sich ein weiterer Nervenplexus (*Plexus myentericus*, *Auerbach*). Die Tunica adventitia besteht aus lockerem Bindegewebe, welches Lymphgefäße, Lymphknoten und Fettgewebe enthält. Hier verlaufen die Nervenfasern des *Plexus oesophageus* und des *Nervus vagus*. Die Vorderseite der Pars abdominalis des Ösophagus ist von Peritoneum überzogen.

Die Lymphabflusswege des Ösophagus weisen im Vergleich zu anderen gastrointestinalen Organen eine besondere und komplexe Anatomie auf [27-29]. Dabei sind die submukosalen Lymphgefäße im Ösophagus nicht segmental sondern longitudinal ausgerichtet, was eine massive lokale Ausdehnung der Tumoren in der Längsrichtung ermöglicht und das Fehlen einer Obstruktion in der Frühphase der Erkrankung erklärt [30, 31]. Des Weiteren können die Lymphgefäße, welche aus einem mukösen und submukösen Geflecht bestehen, nach Durchqueren der Muskularis direkt in benachbarte Lymphknoten oder mittels Längsanastomosen in weiter entfernte Lymphknoten münden. Möglicherweise gehen Lymphknotenmetastasen, die eine oder mehrere dem Primärtumor nachgeschaltete Lymphknotenstationen überspringen (*Skipmetastasen*) und beim Ösophaguskarzinom häufig beobachtet werden [32], auf diese besondere anatomische Situation zurück.

1.3 Das Ösophaguskarzinom

Obwohl zahlreiche Subtypen des Ösophaguskarzinoms unterschieden werden, sind aufgrund ihrer überwiegenden Häufigkeit (>90%) im Wesentlichen zwei Typen von klinischer Bedeutung: Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome. Diese unterscheiden sich nicht nur morphologisch sondern auch in ihrer Ätiologie, Pathogenese, Epidemiologie, klinischen Erscheinung und Prognose [33]. Im Blickpunkt der vorliegenden Arbeit steht das Plattenepithelkarzinom, so dass in den nachfolgenden Betrachtungen zum Ösophaguskarzinom die Rolle dieses Subtyps hervorgehoben ist.

1.3.1 Inzidenz und Epidemiologie

Das Ösophaguskarzinom ist weltweit betrachtet die sechsthäufigste krebbsbedingte Todesursache [34, 35]. In der Bundesrepublik Deutschland beträgt die Inzidenz für das Ösophaguskarzinom bei Männern 6,5 Fälle pro 100.000 Einwohnern und Jahr und bei Frauen 1,3 Fälle pro 100.000 Einwohnern und Jahr [36]. In der Todesursachenstatistik rangierte das Ösophaguskarzinom 1997 in Deutschland bei Männern mit malignen

Grunderkrankungen an neunter Stelle, während es bei Frauen eine untergeordnete Rolle spielte [37]. Die Inzidenz nimmt mit dem Alter zu und erreicht einen Häufigkeitsgipfel im sechsten Lebensjahrzehnt. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Diagnose beträgt 67 Jahre [38, 39].

Kennzeichnend für die Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms sind die ausgeprägten geographischen Unterschiede hinsichtlich seines Auftretens, die auf ein komplexes Zusammenspiel von regionalen, soziokulturellen sowie genetischen Faktoren hindeuten. In Europa liegt die Inzidenz zwischen 2,3 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr in Griechenland und 10,7 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr in Frankreich. Für die USA wird eine Inzidenz von 4,5 Fällen pro 100.000 Einwohnern und Jahr beschrieben [40]. In Japan liegt die Inzidenz mit über 50 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr deutlich höher [41]. Im nördlichen Iran und im Norden Chinas übersteigen die jeweiligen Inzidenzen 100 Erkrankungsfälle pro 100.000 Einwohner und Jahr und erreichen dort mit 130 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr in Linxian, Provinz Hunan, ihren höchsten Wert [42].

Innerhalb eines geographisch definierten Raumes kann die Inzidenz zwischen unterschiedlichen ethnischen Gruppen variieren. So ist das Auftreten eines Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus bei US-Amerikanern afrikanischer Abstammung sechsmal wahrscheinlicher als bei US-Amerikanern kaukasischer Abstammung. Im Gegensatz dazu besitzen Kaukasier gegenüber Afroamerikanern ein vierfach erhöhtes Risiko, an einem Adenokarzinom des Ösophagus zu erkranken [43, 44].

Während das Ösophagus-Plattenepithelkarzinom (engl. *Oesophageal squamous cell carcinoma*, *OSCC*; amerik. *ESCC*) in den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts in den USA noch etwa 90% aller Ösophaguskarzinome ausmachte, nahm die Inzidenz des Adenokarzinoms seither exponentiell zu, so dass es dort gegenwärtig die Mehrzahl der neu auftretenden Speiseröhrenkrebsfälle ausmacht [45]. Steigende Inzidenzen des Adenokarzinoms wurden ebenfalls aus England [46], Schottland [47], der Schweiz [48], Frankreich [49] und den skandinavischen Ländern [50-52] berichtet. Demgegenüber wurde in den asiatisch-pazifischen Ländern keine Zunahme des Adenokarzinoms verzeichnet [53].

In Deutschland hat die Inzidenz des Ösophagus-Adenokarzinoms in den letzten 20 Jahren um 70% zugenommen und übertrifft mit dieser Zuwachsrate alle anderen bösartigen Tumoren [54]. Die Inzidenz des Ösophagus-Plattenepithelkarzinoms ist in der Bundesrepublik während dieses Zeitraums nur leicht angestiegen. Trotz relativer Zunahme der Adenokarzinome stellt das Plattenepithelkarzinom mit etwa 80% der Fälle weiterhin die Mehrzahl der Speiseröhrenkrebsneuerkrankungen [3].

1.3.2 Ätiologie und Prädisposition

Plattenepithel- und Adenokarzinome stellen hinsichtlich ihrer Genese unterschiedliche Entitäten dar: So besitzen Patienten mit gastroösophagealer Refluxkrankheit (amerik. *Gastroesophageal reflux disease*, *GERD*) ein etwa achtfach erhöhtes Risiko, an einem Adenokarzinom des Ösophagus zu erkranken [55]. Bei etwa 5–8% aller GERD-Patienten führt der chronische gastroösophageale Reflux zum metaplastischen Umbau der Ösophagasmukosa im unteren Speiseröhrendrittel (*Intestinalisierung*), die ab einer longitudinalen Ausdehnung von über 3 cm als *Barrett-Ösophagus* oder *Endobrachyösophagus* bezeichnet wird [56]. Innerhalb der metaplastischen Areale können sich Dysplasien entwickeln, die wiederum das Potential zur neoplastischen

Transformation besitzen (*Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz*) [57]. So muss der Barret-Ösophagus als fakultative Präkanzerose für das Adenokarzinom angesehen werden [58]. DeMeester stellt in seiner Übersichtsarbeit fest, dass ein persistierender pH-neutralerer Reflux, wie er bei der Behandlung der Refluxkrankheit mit Protonenpumpen-Inhibitoren und vermutlich auch mit Histamin-H₂-Rezeptor-Antagonisten auftritt [59, 60], den Übergang von der Metaplasie zur Dysplasie beim Barret-Ösophagus begünstigt. Ursächlich dabei sei die fehlende Degradation von Gallensäuren im duodeno-gastro-ösophagealen Reflux, die zu einer erhöhten Mutationsrate im metaplastischen Epithel führen könne [57]. Darüber hinaus scheint zwischen dem *Body-Mass-Index (BMI)* und dem relativen Risiko für die Entstehung eines Ösophagus-Adenokarzinoms eine positive Korrelation zu bestehen [45]. Bislang wurde für das Adenokarzinom kein oder nur ein geringer Einfluss von Alkoholmissbrauch auf das Erkrankungsrisiko beobachtet [61, 62]. Allerdings führt Alkoholgenuss zur Relaxation des unteren Ösophagussphinkters, was die Entstehung von gastro-ösophagealem Reflux begünstigt und folglich auch mit einer erhöhten Prävalenz für die Entstehung eines Adenokarzinoms einhergehen könnte [63]. Außerdem hat in den Industrienationen die Anwendung von Medikamenten zugenommen, welche den Verschlussdruck im unteren Ösophagussphinkter senken und infolgedessen zu vermehrtem Reflux führen können. Inwieweit dies die Entstehung von Adenokarzinomen beeinflusst, wird kontrovers diskutiert [64]. Die Einnahme von Acetylsalicylsäure und anderen nicht-steroidalen Antiphlogistika (*NSAR*) scheint hingegen das Risiko an einem Ösophaguskarzinom zu erkranken oder zu versterben zu vermindern [65, 66].

Beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus stehen als Risikofaktoren neben möglichen genetischen Determinanten in erster Linie Umwelt- und Ernährungsfaktoren wie Alkohol, Tabakrauch und nitrosaminhaltige Nahrungsmittel im Vordergrund [39, 67]. Bei Rauchern ist das Risiko, an einem Ösophaguskarzinom zu erkranken, 2–7fach erhöht. Dabei besteht beim Plattenepithel- wie beim Adenokarzinom eine Dosisabhängigkeit [61, 68]. Plattenepithelkarzinome entstehen bevorzugt an den physiologischen Engstellen der Speiseröhre. Auch durch Erkrankungen oder Verletzungen entstandene Verengungen stellen Prädilektionsstellen dar. Verätzungen der Ösophagusschleimhaut durch Laugeningestion ziehen häufig die Bildung von Strikturen nach sich. In diesen Bereichen entstehen gehäuft Plattenepithelkarzinome, welche mit einer Latenz von 30–40 Jahren auftreten können [69, 70]. Die *postkrikoidale sideropenische Dysphagie* als Sonderform des *Plummer-Vinson-Syndroms* weist ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Ösophaguskarzinoms auf [71]. Bei dieser auch als *Paterson-Kelly-Syndrom* bezeichneten Erkrankung kommt es durch Ausbildung von intraösophagealen Membranen (engl. „webs“) zu Ösophagusstenosierungen, die häufig Entstehungsort der Karzinome sind. Das Auftreten von Ösophagusdivertikeln prädisponiert ebenfalls für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms [72]. Erkrankungen, die zu einer verlangsamten Passage des Speisebreis führen, erhöhen ebenfalls das Risiko, ein Ösophagus-Plattenepithelkarzinom zu entwickeln. So weisen Patienten mit *Achalasie* ein um 14–16% erhöhtes Erkrankungsrisiko auf [73, 74].

Auch Mikroorganismen und Viren sind möglicherweise an der Entstehung von Ösophaguskarzinomen beteiligt [75]. Analog zur Entstehung von epithelialen Neoplasien in Schleimhäuten des Genitaltrakts wird für das Ösophaguskarzinom ebenfalls eine Schädigung des Epithels durch das *humane Papillomavirus (HPV)* und das *Epstein-Barr-Virus* diskutiert [76-78].

In einer US-Studie korrelierte das Auftreten eines Plattenepithelkarzinoms bei über 90% der untersuchten Fälle mit kombiniertem hohem Alkohol- und Tabakkonsum, seltenem Genuss von Obst und rohem Gemüse und

niedrigem sozioökonomischen Status [79]. Auch in Deutschland ist ein hoher Nahrungsanteil von frischem Obst und Gemüse mit einem verminderten Erkrankungsrisiko assoziiert [80]. Insbesondere Vitamin C, Vitamin E, Folsäure, Carotinoide und Zink scheinen eine protektive Funktion zu besitzen [67, 81-87]. Nitrit und Nitrosodimethylamin, die u. a. in gepökelten, geräucherten oder gegrillten Fleisch- und Fischprodukten vorkommen, stehen im Verdacht, Ösophaguskarzinome direkt induzieren zu können [88, 89]. In einigen Regionen Chinas, die hohe Inzidenzraten für das Ösophaguskarzinom aufgewiesen hatten, korrelierte der kontinuierliche Rückgang der Erkrankungswahrscheinlichkeit mit Verbesserungen in der Nahrungsmittelkonservierung und Änderungen der Ernährungsgewohnheiten [90]. Vielerorts ist der Konsum von heißen Getränken mit einer erhöhten Inzidenz des Ösophaguskarzinoms assoziiert, wobei die hohe Trinktemperatur der Getränke als Ursache im Vordergrund zu stehen scheint [91-95].

Eine eindeutige genetische Prädisposition für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus besteht nach dem derzeitigen Kenntnisstand allein für die autosomal-dominant vererbte, als *Tylosis* bezeichnete *nicht-epidermolytische Palmoplantarkeratose* [96]. Dieser Erkrankung liegt wahrscheinlich eine Veränderung des Gens *TOC* (*Tylosis oesophageal cancer gene*) auf Chromosom 17q25.2 zugrunde [97], wobei der Verlust der Heterozygotie (engl. *Loss of heterozygosity*, *LOH*) dieses Gen auch in sporadisch auftretenden Ösophaguskarzinomen beobachtet wird [98, 99]. Für erkrankte Mitglieder betroffener Familien besteht ein Risiko von 95%, ein Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zu entwickeln [100]. Zudem besitzen Zöliakie-Patienten ein erhöhtes Erkrankungsrisiko [101].

Bei bis zu 6% aller Patienten mit Karzinomen im Bereich des Oropharynx und der oberen Atemwege wird ein synchrones Ösophagus-Plattenepithelkarzinom diagnostiziert [102]. Es ist unklar, ob bei der häufig beobachteten Entstehung von Sekundärkarzinomen eine mögliche genetische Prädisposition oder das Vorhandensein einer gemeinsamen ursächlichen Noxe (z.B. Tabakrauch) im Vordergrund steht. Das Risiko eines metachronen Ösophaguskarzinoms ist in den genannten Fällen um das 44fache erhöht [103].

Die Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden in den letzten Jahren trug zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen des Ösophaguskarzinoms bei [33]. Wie bei vielen soliden Tumoren finden sich auch beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus häufig Mutationen des Tumorsuppressorgens *p53*, welches sowohl bei der Initiierung von Ösophagusneoplasien als auch bei deren Progression eine entscheidende Rolle zu spielen scheint [104-106]. Alterationen von *p53* treten bereits bei Hyper- und Dysplasien des Plattenepithels sowie bei *in-situ*-Karzinomen in Erscheinung [107, 108], womit es sich bei der Mutation von *p53* möglicherweise um ein frühes Ereignis in einer Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz handelt [109]. Mutationen von *p16* (*ink4a*) und *Cyclin D1* (*bcl-1*), welches durch *p16* inhibiert wird, gehen häufig mit einer schlechten Prognose einher [110-114]. Auch Gene der *bcl-2*-Familie, die an der Initiierung des programmierten Zelltods (*Apoptose*) beteiligt sind, weisen in Ösophagus-Plattenepithelkarzinomen häufig Veränderungen auf [115, 116]. Keine einheitlichen Veränderungen sind bislang für die Expression von Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren beschrieben worden. Beispielsweise variierten die Expressionsraten des Rezeptors für den *Epidermal growth factor* (*EGFR*) zwischen 71% und 83% [117, 118]. Eine Expression des Wachstumsfaktors *TGF- α* , der ebenfalls mit dem EGF-Rezeptor interagiert, wurde bei 35% eines Untersuchungskollektivs beobachtet [119]. Die klinische Bedeutung dieser Einzelbeobachtungen ist jedoch noch nicht bekannt.

1.3.3 Klassifikation des Ösophaguskarzinoms

Die Einteilung der Ösophaguskarzinome erfolgt nach den Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) [120], der Klassifikation des *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* [121], den Kriterien der *International Union Against Cancer (Union Internationale Contre Cancer, UICC)* [122-124] und den Richtlinien der *International Society for Diseases of the Esophagus (ISDE)* [125]. Zur Beurteilung werden die Lokalisation des Tumors, dessen histomorphologischer Typ und sein Differenzierungsgrad, die anatomische Ausbreitung des Tumors und das potentielle Vorhandensein von Tumorgewebe nach chirurgischer Therapie herangezogen.

1.3.3.1 Lokalisation

Im klinischen Umfeld werden Ösophaguskarzinome häufig in Tumoren des oberen, mittleren und unteren Drittels eingeteilt. Insgesamt befinden sich etwa zwei Drittel aller Karzinome im distalen, etwa 25 % im mittleren und weniger als 10 % im proximalen Drittel des Ösophagus [41]. Plattenepithelkarzinome befinden sich dabei zu 45% im mittleren Ösophagusdrittel, zu 40% im unteren Drittel und zu 15% im oberen Drittel jeweils mit einer Präferenz für die physiologischen Engen der Speiseröhre [126]. Mit über 80% ist bei den Adenokarzinomen vornehmlich das untere Drittel des Ösophagus betroffen [127].

Die Richtlinien der UICC unterscheiden einen zervikalen und einen intrathorakalen Abschnitt des Ösophagus, wobei der intrathorakal gelegene Anteil wiederum in einen oberen, einen mittleren und einen unteren Abschnitt eingeteilt wird. Die Trachealbifurkation grenzt den oberen vom mittleren Abschnitt ab. Die Hälfte der Verlaufstrecke zwischen Trachealbifurkation und ösophagogastralem Übergang bildet die Grenze zwischen mittlerem und unterem thorakalen Abschnitt, wobei letzterer den kurzen intraabdominal gelegenen Teil des Ösophagus mit einschließt. Die ISDE empfiehlt demgegenüber eine Einteilung der Ösophagus-Plattenepithelkarzinome anhand ihres Bezugs zum Tracheobronchialsystem in infrabifurkale, suprabifurkale und rein zervikale Tumoren.

Bei Tumoren, die Ösophagus und Magen gleichzeitig befallen, wird zur Unterscheidung zwischen distalen Ösophaguskarzinomen, Cardiakarzinomen und proximalen Magenkarzinomen nach der Empfehlung der UICC die longitudinale Ausdehnung um mehr als 50% als Zuordnungskriterium herangezogen. Bei einer Ausdehnung zu gleichen Anteilen werden Plattenepithelkarzinome, kleinzellige Karzinome und undifferenzierte Karzinome als distale Ösophaguskarzinome und Adenokarzinome als Cardiakarzinome bzw. proximale Magenkarzinome klassifiziert. Adenokarzinome des distalen Ösophagus und ösophago-gastralen Übergangs können außerdem entsprechend den Empfehlungen der *International Gastric Cancer Association (IGCA)* und der ISDE nach Siewert eingeteilt werden [128].

1.3.3.2 Tumortyping und histopathologisches Grading

Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom stellen die beiden histologischen Haupttypen des Ösophaguskarzinoms dar. In weniger als 10% handelt es sich bei malignen Speiseröhrentumoren um Spindelzellkarzinome (Karzinosarkome), Basaloidzellkarzinome, adenomatös-zystische Karzinome,

mukoepidermoidale Karzinome, kleinzellige Karzinome und Lymphome [129, 130]. Makroskopisch dominieren ulzerierende Läsionen gefolgt von intramural wachsenden und polypösen Tumoren. Nach ihrem Differenzierungsgrad werden gut (G1), mäßig (G2), schlecht differenzierte (G3) und undifferenzierte Karzinome (G4) unterschieden (siehe Tabelle 1).

Im Dokumentationssystem der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Tumorzentren ist in Übereinstimmung mit der *Internationalen Histologischen Klassifikation* der WHO zusätzlich die Zusammenfassung von G1 und G2 zu einem niedrigen Malignitätsgrad („*low grade*“) und von G3 und G4 zu einem hohen Malignitätsgrad („*high grade*“) vorgesehen. Bei kleinzelligen und undifferenzierten Karzinomen des Ösophagus kommt der Differenzierungsgrad G4 zur Anwendung, so dass diese Karzinome dementsprechend als hoch maligne klassifiziert werden.

Tabelle 1. *Histopathologisches Grading.*

Histopathologisches Grading (G)	
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

1.3.3.3 Tumorstaging (TNM-Klassifikation)

Wie alle epithelialen Tumoren werden auch die Ösophaguskarzinome unabhängig von ihrem histologischen Typ nach dem TNM-System der UICC klassifiziert. Unterschieden wird hierbei das prätherapeutische, diagnostische „klinische“ Tumorstaging (cTNM) vom postoperativen pathohistologischen Tumorstaging (pTNM). Die Einteilung des Primärtumorstadiums (T) erfolgt nach der Tumordinfiltrationstiefe in die Ösophaguswandschichten (siehe Tabelle 2).

Zur Beurteilung der lymphatischen Zellstreuung werden in den Richtlinien der UICC die Lymphknoten für den zervikalen und thorakalen Ösophagus jeweils zu regionären Gruppen zusammengefasst. Für den zervikalen Ösophagusabschnitt werden allein zervikale Lymphknotengruppen (Skalenus-Lymphknoten, Lymphknoten an der V. jugularis interna, obere und untere zervikale Lymphknoten, periösophageale Lymphknoten und supraklavikuläre Lymphknoten) als regionäre Lymphknoten definiert. Zu den regionären Lymphknoten im thorakalen Ösophagusabschnitt zählen die an der V. azygos gelegenen oberen periösophagealen Lymphknoten, die subkarinalen Lymphknoten, die unterhalb der V. azygos gelegenen unteren periösophagealen Lymphknoten, die mediastinalen Lymphknoten und die perigastrischen Lymphknoten ausgenommen der Lymphknoten am Truncus coeliacus. Ein Tumorbefall der Lymphknoten des Truncus coeliacus wird unabhängig von der Primärtumorlokalisation als Fernmetastasierung gewertet (pM1) ebenso wie ein Befall zervikaler Lymphknoten bei Primärtumoren der thorakalen Ösophagusabschnitte.

Tabelle 2. *TNM/pTNM-Klassifikation.*

Primärtumor (T/pT)	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Lamina propria oder submucosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Adventitia
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen
Regionäre Lymphknotenmetastasen (N/pN)	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
Fernmetastasen (M/pM)	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
Für Tumoren des unteren thorakalen Ösophagus	
M1a	Metastase(n) in zöliakalen Lymphknoten
M1b	Andere Fernmetastasen
Für Tumoren des oberen thorakalen Ösophagus	
M1a	Metastase(n) in zervikalen Lymphknoten
M1b	Andere Fernmetastasen
Für Tumoren des mittleren thorakalen Ösophagus	
M1a	Nicht anwendbar
M1b	Nichtregionäre Lymphknoten oder andere Fernmetastasen

Für die pathologische Klassifikation des Lymphknotenstadiums pN0 wird die histologische Untersuchung von mindestens 6 Lymphknoten empfohlen.

Fernmetastasen liegen vor, wenn Tumorzellsabsiedelungen in nicht-regionären Lymphknotengruppen oder in anderen Organen nachgewiesen wurden. Entsprechend den lymphatischen und venösen Abflusswegen der Speiseröhre manifestieren sich Fernmetastasen beim Ösophaguskarzinom am häufigsten in den nicht-regionären intraabdominellen Lymphknoten mit einer Inzidenz von 45%, gefolgt von der Leber mit 35%, der Lunge mit 20%, den supraklavikulären und zervikalen Lymphknoten mit 18% und dem Knochen mit 9% [131].

Weiterhin sind die verschiedenen TNM-/pTNM-Einstufungsmöglichkeiten anhand von prognostischen Daten zu fünf Stadien gruppiert worden (siehe Tabelle 3) [132]. 13–20% der Patienten mit einem operablen Ösophaguskarzinom befanden sich im UICC Stadium I, 14–27% im Stadium IIA, 7–16% im Stadium IIB und 40–54% im Stadium III [133, 134].

Tabelle 3. Stadiengruppierung des Ösophaguskarzinoms.

UICC-Tumorstadien			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIA	T2, T3	N0	M0
Stadium IIB	T1, 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

Das Fehlen oder Vorhandensein eines Residualtumors nach Behandlung wird durch die R-Klassifikation beschrieben. Dazu werden neben den Resektionsrändern des Primärtumors auch die Resektionsgrenzen von regionären Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen beurteilt.

Tabelle 4. R-Klassifikation.

Residualtumor (R)	
RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

1.3.4 Diagnostik und Therapie

Die Dysphagie als Leitsymptom des Ösophaguskarzinoms (74% aller Fälle) tritt in der Regel erst bei einer Verlegung des Ösophaguslumens um mehr als die Hälfte auf, 17% der Patienten beklagen dann eine Odynophagie [38]. Die damit verbundene, häufig beobachtete Gewichtsabnahme korreliert mit einem ungünstigen Langzeitverlauf, wenn der Gewichtsverlust 10% des Körpergewichts übersteigt [135]. Kachexie, Anämie, eine aufgehobene Schluckfähigkeit für feste Speisen, rezidivierende Aspiration, Heiserkeit, Pleuraerguss, Aszites, Horner-Syndrom und ein Zwerchfellhochstand sind weitere Symptome, die ein fortgeschrittenes Tumorstadium anzeigen.

Anhand der Ergebnisse des prätherapeutischen Tumorstagings mit körperlicher Untersuchung, Röntgenübersichtsaufnahme der Lungen in zwei Ebenen, Endoskopie, Endosonographie, Computertomographie von Thorax und Abdomen, Kontrastmittelbreischluck, Skelettszintigraphie, Laboruntersuchungen und Zusatzuntersuchungen bei bestehenden Komorbiditäten wird die Entscheidung über einen primär kurativen oder primär palliativen Therapieansatz gefällt. Die exakte Lokalisation des Tumors wird endoskopisch bestimmt, wobei durch die Entnahme von Stufenbiopsien Tumortyp und Differenzierungsgrad ermittelt werden. Potentielle

Fisteln können mittels Kontrastmittelbreischluck ausgeschlossen werden. Darüber hinaus liefert die Passagedarstellung möglicherweise den Hinweis auf die Fixation der Speiseröhre aufgrund einer Infiltration des Tumors in die Umgebung. Lymphknotenmetastasen, lokale Tumorausdehnung und Fernmetastasen können mittels Computertomographie mit einer Sicherheit von 65–88% dargestellt werden. Bezüglich des Tumorstaging haben sich bisher keine Vorteile der Kernspintomographie gegenüber der Computertomographie ergeben. Eine abschließende Beurteilung der Wertigkeit einer Positronen-Emissions-Tomographie (*PET*) bei der Diagnostik des Ösophaguskarzinoms steht noch aus [136-138]. Standard zur Beurteilung des lokalen Tumorwachstums hinsichtlich der Infiltrationstiefe und des lokoregionären Lymphknotenstatus stellt jedoch die Endosonographie dar, welche in über 80% der Fälle das korrekte T- und N-Stadium liefert [38]. Die Ultraschall-gesteuerte endoskopische Feinnadelbiopsie ermöglicht darüber hinaus eine sichere Diagnose von Lymphknotenmetastasen in bis zu 90% der Fälle. Bei Tumoren des oberen Ösophagus wird präoperativ regelhaft eine Infiltration der Trachea und des Bronchialsystems durch eine Tracheobronchoskopie ausgeschlossen. Zusätzlich empfiehlt sich bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom eine konsiliarische HNO-ärztliche Spiegeluntersuchung zum Ausschluss von Zweitumoren. Die Bestimmung von Tumormarkern im Serum von Patienten besitzt beim Ösophaguskarzinom nur eine geringe Sensitivität und Spezifität, allerdings können die Tumormarker CEA, CA 19-9, CA 125 und SCC nach erfolgter Therapie als Verlaufsparameter herangezogen werden [139].

Eine kurative Behandlung des Ösophaguskarzinoms ist gegenwärtig allein durch die chirurgische R0-Resektion mit Entfernung der regionären Lymphknoten gegeben, so dass bei einem lokal begrenzten Tumor ohne nachweisbare Fernmetastasen das operative Vorgehen angestrebt werden sollte. Bei Vorliegen einer Fernmetastasierung ist ein kurativer Ansatz generell nicht mehr möglich, da von einer systemischen Erkrankung ausgegangen werden muss. Ausgedehnte lokoregionäre Befunde hingegen sprechen nicht notwendigerweise gegen eine kurativ intendierte chirurgische Therapie, wenn eine R0-Resektion potentiell durchführbar erscheint. Sollte ein organüberschreitendes Wachstum des Primärtumors mit Infiltration benachbarter Strukturen vorliegen, kann eine neoadjuvanten Therapie zwecks Reduktion der Tumorgroße (engl. *downstaging*) durchgeführt werden. So kann bei 70–80% der lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinome durch eine präoperative Radiochemotherapie eine kurative R0-Resektion ermöglicht werden.

Das operative Verfahren der Wahl beim Plattenepithelkarzinom ist die thorako-abdominale *en-bloc*-Ösophagektomie mit Zwei-Feld-Lymphadenektomie und Magenhochzug [140, 141]. Hierbei erfolgt die Resektion der Speiseröhre gemeinsam mit der mediastinalen Lymphknotendissektion *en bloc* über einen rechtsthorakalen Zugang. Die Rekonstruktion der Speisepassage wird nach Umlagerung des Patienten von abdominal und zervikal links durchgeführt. Dabei werden im Rahmen der so genannten 2-Feld-Lymphadenektomie neben den bereits entfernten mediastinalen Lymphknoten mit einer proximalen Resektion der kleinen Kurvatur des Magens auch abdominale Lymphknoten entfernt. Die abdominale Lymphadenektomie umfasst darüber hinaus die Entfernung der zöliakalen und suprapankreatischen Lymphknoten. Bei Tumoren, die oberhalb der Karina lokalisiert sind, kann aufgrund des erhöhten Risikos zervikaler Lymphknotenmetastasen zusätzlich eine zervikale Lymphadenektomie durchgeführt (engl. *neck dissection*) werden. Ob dieses als 3-Feld-Lymphadenektomie bezeichnete Vorgehen zur Verbesserung der Prognose führt, wird weiterhin untersucht [142-145]. In Ausnahmefällen, z.B. bei pulmonalen Einschränkung der funktionellen Operabilität,

kann alternativ die transhiatale Ösophagektomie durchgeführt werden [146]. Die Präparation des Ösophagus erfolgt hier ohne Thorakotomie stumpf von transzervikal und transabdominal, wobei eine Lymphadenektomie lediglich im unteren Mediastinum und im Bauchraum durchgeführt werden kann. Die Rekonstruktion der Speisepassage erfolgt in der Regel durch Hochzug eines Magenschlauches und dessen extrathorakale Anastomosierung mit dem Ösophagusstumpf im Bereich des Halses. Alternativ können isoperistaltische Kolon- oder Dünndarminterponate verwendet werden.

Die chirurgische Therapie wurde im Hinblick auf eine Verbesserung des postoperativen Krankheitsverlaufs mit neoadjuvanter und adjuvanter Chemo- und Strahlentherapie kombiniert: Als Monotherapie angewendet hatten Chemo- und Strahlentherapie jeweils keine Verbesserung der operativen Ergebnisse erzielen können, so dass sie im Rahmen eines kurativen Therapiekonzepts als Einzelmaßnahmen keine Anwendung mehr finden [147]. Auch durch die kombinierte Anwendung als Radiochemotherapie vor oder nach chirurgischer Intervention konnte bei einer erhöhten postoperativen Morbidität und fraglich erhöhten Mortalität keine eindeutige Verbesserung der Prognose erzielt werden [135].

Eingesetzt wird der multimodale Therapieansatz im Zuge eines palliativen Vorgehens bei inoperablen Tumoren. Oberstes Ziel der palliativen Therapie ist der Erhalt bzw. die Wiederherstellung der Schluckfähigkeit der Patienten. Aufgrund der hohen Strahlensensibilität steht beim Plattenepithelkarzinom die Bestrahlung im Vordergrund, deren lokale Wirkung durch Kombination mit einer Chemotherapie verstärkt werden kann. Neben der perkutanen Strahlen- und der endoluminalen Brachytherapie stehen eine Reihe endoskopischer Verfahren zur Verfügung. Hier hat sich die Kombination aus intraluminaler Lasertherapie und anschließender perkutaner oder endokavitärer Bestrahlung als wirksam erwiesen [148]. Bei bestehenden oder drohenden ösophago-bronchialen bzw. ösophago-tachealen Fisteln hat sich die endoprothetische Lumenwiederherstellung durch Einlage von selbst-expandierbaren Maschendrahtstents, gegebenenfalls nach Bougierung, durchgesetzt. Im Falle einer drohenden Obstruktion sollte bei noch bestehender Passage frühzeitig die Anlage einer perkutanen endoskopischen Gastrostomie (*PEG*) angestrebt werden. Wenngleich das Ösophaguskarzinom insgesamt nur als mäßig sensibel für Chemotherapeutika gilt [149], erreicht die Kombination von Cisplatin und 5-Fluorouracil (5-FU) im metastasierten Stadium Ansprechraten bis zu 35%, bei lokoregionär begrenzten Tumoren sogar bis zu 75% [150].

1.3.5 Prognose

Die Prognose des Ösophaguskarzinoms hängt entscheidend vom Krankheitsstadium ab. Die Tumorstadien UICC III und IV umfassen nahezu 75% der neu auftretenden Fälle. Etwa 50% aller Patienten sind bei Erstdiagnose bereits lokal inoperabel oder haben radiologisch nachweisbare Fernmetastasen [2]. In Erhebungen bis 1995 betrug die 5-Jahres-Überlebensrate aller diesen Stadien zugeordneten Ösophaguskarzinome weniger als 5%. Im einzelnen belaufen sich die 5-Jahres-Überlebensraten auf über 95% für das UICC-Stadium 0, auf 50–80 % für das Stadium I, auf 30–40 % für das Stadium IIA, auf 10–30 % für das Stadium IIB und 10–15 % für das Stadium III [151, 152]. Die Überlebenszeit für Patienten im Stadium IV beträgt bei palliativer Chemotherapie im Mittel weniger als ein Jahr [150].

Der Anteil der Frühkarzinome (T1N0M0, Tumorstadium UICC I) liegt unter 10%. Sofern bei diesen Patienten

eine vollständige Tumorresektion (R0) durchgeführt werden konnte, können 5-Jahres-Überlebensraten von 83% für das Adenokarzinom und 65% für das Plattenepithelkarzinom erreicht werden. Ursachen für die insgesamt ungünstigere Prognose von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen sind möglicherweise der häufig assoziierte schlechte Allgemeinzustand, das häufigere Auftreten von kardiopulmonalen Komorbiditäten sowie die häufiger vorhandenen syn- bzw. metachronen Zweitkarzinome im Oropharynx und der Lunge [153-155].

Hat eine Infiltration der Speiseröhrenwand bis in die Lamina propria stattgefunden (pT2), sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit nach 5 Jahren auf 37% für beide Tumorentitäten. Insgesamt kann bei weiter fortgeschrittenen Karzinomen nach gelungener R0-Resektion mit 5-Jahresüberlebensraten von 30–40% gerechnet werden. In der Subgruppe der R0-resezierten Patienten stellen der Lymphknotenstatus und die Tumordinfiltrationstiefe die wesentlichen prognostischen Faktoren dar: Über 90% aller Ösophaguskarzinome werden im Stadium T2 oder T3 diagnostiziert und ungefähr zwei Drittel der Patienten haben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung regionale Lymphknotenmetastasen (pN1) [156]. Auch bei Patienten mit wenigen befallenen lokoregionären Lymphknoten ist ein Langzeitüberleben möglich, wenn die so genannte Lymphknotenratio aus der Anzahl befallener und entfernter Lymphknoten unter 20% liegt [157]. Der immunhistochemische Nachweis lymphatischer Mikrometastasen stellt einen weiteren, unabhängigen Prognosefaktor für rezidivfreies und absolutes Überleben dar [158, 159]. Trotz Berücksichtigung in der derzeit aktuellen 6. Auflage der AJCC- bzw. UICC-Klassifikation maligner Tumoren hat der immunhistochemische (pN0 (i+)) oder molekularbiologische (pN0 (mol+)) Nachweis von Mikrometastasen bzw. isolierten Tumorzellen in Lymphknoten noch keine verbreitete Anwendung bei der Beurteilung maligner Tumoren gefunden [160].

1.4 Integrine

In den Organen und Gewebekompartimenten des Körpers schließen sich unterschiedliche Zelltypen zu Zellpopulationen zusammen. Der notwendige Kontakt zwischen den Zellen wird durch verschiedene integrale Membranproteine hergestellt. *Zelladhäsionsmoleküle* (engl. *cell adhesion molecules*, *CAMs*) vermitteln sowohl den festen Kontakt zwischen gleichen und verschiedenartigen Zellen als auch die Anheftung von Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) und gewährleisten damit die Integrität und Stabilität von Gewebeverbänden. Demgegenüber ermöglicht das kontrollierte Wechselspiel zwischen Adhäsion und Dissoziation die Migration von nicht ortsgebundenen Zellen im Organismus. Die Zelladhäsionsmoleküle besitzen somit einen essentiellen Stellenwert bei der Ausbildung und Stabilisierung von epithelialen und mesenchymalen Gewebeverbänden. Während der Embryogenese spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Organentwicklung und sind auch im ausgewachsenen Organismus an zahlreichen dynamischen Prozessen wie Angiogenese, Wundheilung und Immunabwehr beteiligt [12, 14, 161, 162].

Es werden fünf Hauptklassen unterschieden: *Cadherine*, die *Immunoglobulin-Superfamilie*, *Selectine*, *Mucine* und *Integrine* [163]. Während alle Klassen an den spezifischen homotypischen Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind, vermitteln die Integrine vor allem heterotypische Wechselwirkungen von verschiedenartigen Zelltypen und insbesondere deren Interaktion mit der extrazellulären Matrix. Die extrazelluläre Matrix ist ein komplexes Netzwerk aus hochmolekularen Proteinen (u. a. *Kollagene*, *Laminine*, *Fibronectin*) und Polysacchariden, die

sowohl von den mesenchymalen Zellen des Bindegewebes als auch von Zellen epithelialen Ursprungs sezerniert und modifiziert werden können. Die ECM liefert ein Strukturgerüst zur räumlichen Verankerung von Einzelzellen oder Zellverbänden und bildet physikalische Barrieren zwischen Gewebekompartimenten aus. Als Speicherort für Wachstumsfaktoren und andere Zytokine ist sie an der Differenzierung und Proliferation der interagierenden Zellen beteiligt.

Im Zuge der malignen Progression verlassen Tumorzellen ihren ursprünglichen Zellverband. Sie durchdringen die Basalmembran und wandern in das umliegende Bindegewebe ein. Die Integrine spielen eine entscheidende Rolle bei der Invasion und Migration von Tumorzellen. Neben der strukturellen Anheftung von Zellen an die ECM sind die Integrine in ihrer Funktion als Signaltransduktoren auch an verschiedenen Aspekten der Zellregulation beteiligt. Im Zusammenspiel mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren können sie Zelldifferenzierungsvorgänge beeinflussen, Wachstums- und Proliferationsstimuli verstärken und dem programmierten Zelltod (*Apoptose*) entgegenwirken.

1.4.1 Aufbau und Funktion

Die Bezeichnung *Integrin* beschreibt die Funktion der transmembranären Glykoproteine: Sie „integrieren“ das Zytoskelett über die Zellmembran hinweg mit der extrazellulären Matrix und ermöglichen damit die räumliche Verspannung einer Zelle im Bindegewebe. Als in der Evolution hochkonservierte Proteine werden die Integrine überall im menschlichen Organismus exprimiert, wobei auf einem bestimmten Zelltyp gleichzeitig verschiedene Integrine vorkommen können [164]. Manche Integrine werden von vielen unterschiedlichen Zellarten exprimiert, wohingegen andere spezifisch für eine bestimmte Zellart sind. Die β_2 -Integrin-Untereinheit wird beispielsweise nur auf Leukozyten und das $\alpha_6\beta_4$ -Integrin allein auf Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert [12]. In der vorliegenden Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Expression und Wirkung derjenigen Integrine gerichtet, die an der Interaktion von epithelialen Zellen mit der extrazellulären Matrix beteiligt sind.

Integrine setzen sich aus je einer α - und einer β -Untereinheit zu Heterodimeren zusammen, die durch nicht-kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind. Bis jetzt wurden 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten sicher identifiziert, welche sich zu insgesamt 24 verschiedenen Integrinen zusammensetzen (siehe Abbildung 1) [14, 165, 166].

Alle Integrin-Untereinheiten setzen sich aus einer Cystein-reichen extrazellulären Domäne, einem hydrophoben transmembranen Abschnitt und, mit Ausnahme der β_4 -Untereinheit, aus einer kurzen zytoplasmatischen Domäne zusammen. Die N-terminalen, extrazellulären Anteile einer α - und einer β -Untereinheit bilden einen kugelförmigen Kopfbereich aus sieben β -Faltblattstrukturen, dessen Ligandenbindungsstelle von beiden Untereinheiten gebildet wird. Die beiden langen, geraden Abschnitte der α - und β -Untereinheit verbinden den Kopf mit der Zellmembran [166].

Adaptorproteine (*Tensin*) und die Aktivierung der *Focal adhesion kinase* (*FAK*) und der *Proteinkinase C* (*PKC*) bewirken die Phosphorylierung nachgeschalteter Tyrosin- und Serin-/Threoninkinasen. Diese regulieren die Aktivität der zur Rho-Familie gehörenden GTPasen (*Rho*, *Rac*, *Cdc42*), die weitere Effektorproteine stimulieren, welche letztendlich die Organisation des Zytoskeletts und damit die Ausprägung der Zellgestalt und die Bewegung der Zellen steuern [171, 172].

Die Zellmigration umfasst die Wiederholung von diversen Veränderungen der Zellgestalt, denen der Integrin-vermittelte Umbau des Zytoskeletts zugrunde liegt. Wandernde Zellen bilden in Bewegungsrichtung Ausziehungen der Zellmembran (*Lamellipodien*, *Filopodien*, *Pseudopodien*, engl. *ruffles*) aus, an deren Oberfläche sich Rezeptoren für chemotaktische Moleküle, Integrine und Proteine des Zytoskeletts konzentrieren. Während am vorderen Zellpol nach vorübergehender Aufhebung der Adhäsion wieder ein fester Kontakt zur ECM hergestellt worden ist, lösen sich am hinteren Zellpol die Zell-Matrix-Verbindungen. Durch die gerichtete Polymerisation von Actin-Filamenten und die Ausbildung und Aktivierung von kontraktile Actin-Myosin-Elementen (*Actomyosin*) entstehen Zugkräfte, welche die migrierende Zelle in Richtung des fixierten vorderen Zellpols verschieben [18, 173].

Über die Vermittlung und Abstimmung der mechanischen Anheftung hinaus scheinen die Integrine gegenüber der extrazellulären Matrix eine „Sensorfunktion“ auszuüben [174]. Sie übertragen Signale aus der Umgebung in die Zellen und lösen im Verbund mit anderen Signaltransduktoren zellmorphologische und zellproliferative Veränderungen aus. So mündet die Integrin-vermittelte Stimulation der *Shc/Erk*-Signalkaskade in einer stärkeren und dauerhaften Aktivierung des Signalwegs [175]. Im Zuge der Ausbildung von Integrin-Clustern im Bereich der Fokalkontakte und der nachfolgenden Anlagerung verschiedener Adaptorproteine und Proteinkinasen werden auch membranständige Wachstumsfaktorrezeptoren rekrutiert. Wachstumsfaktoren, die in der ECM an Proteoglykane gebunden vorliegen, werden so in räumliche Nähe zu ihren Rezeptoren gebracht und diesen präsentiert [176]. Darüber hinaus könnten Rezeptor-Tyrosinkinasen wie der EGF-Rezeptor (EGFR) oder der HGF-Rezeptor Met, die Bestandteil von Integrin-Clustern sind, ihre Signalwirkung auch durch Transaktivierung entfalten, ohne dass die Rezeptoren durch Ligandenbindung aktiviert werden müssten [11, 177].

An den fokalen Adhäsionsstellen entstehen somit Signalplattformen, die durch die Aktivierung und Modulation des zentralen *Ras/MAPK/ERK*-Signalwegs Veränderungen der Genexpression bewirken und damit entscheidenden Einfluss auf die Zellzyklusprogression, Differenzierung, Proliferation und das Überleben von Matrix-gebundenen Zellen ausüben können (Übersicht siehe Abbildung 2) [178, 179].

In adhärent wachsenden Epithelzellen wird bei Verlust der Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Adhäsion physiologischerweise Apoptose induziert, die in diesem Zusammenhang als *Anoikis* (gr. Heimatlosigkeit) bezeichnet wird [16, 180, 181]. Die physiologische Integrin-Expression trägt dazu bei, dass normal differenzierte Zellen lediglich in ihrem designierten Zellverband überleben können. Allerdings kann in Zellen, die sich vom primären epithelialen Zellverband gelöst haben, eine fortwährende Interaktion von Integrinen mit der extrazellulären Matrix die *PKB/AKT*-Signalkaskade aktivieren und damit das Auslösen des Apoptoseprogramms verhindern [15, 182].

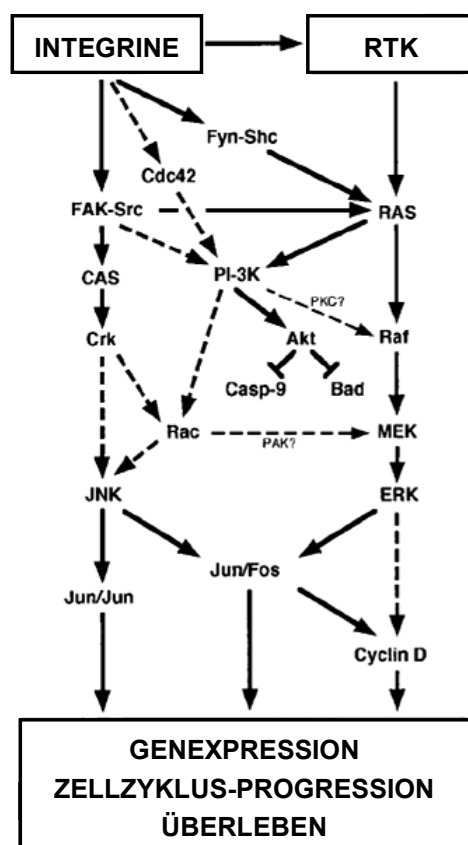


Abbildung 2. Koordinierte Regulation der Genexpression, Zellzyklus-Progression und des Überlebens von Zellen durch Integrine und Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Dargestellt sind bekannte (ausgefüllte Pfeile) und mutmaßliche (gestrichelte Pfeile) gemeinsame Signalübertragungswege der Integrine und Rezeptor-Tyrosinkinasen (nach Giancotti et al. [13]).

1.4.2 Integrine als Laminin-Rezeptoren

Die Laminine bilden eine Familie von trimerischen Glykoproteinen, die sich aus jeweils einer α -, β - und γ -Untereinheit zu verschiedenen Isoformen zusammenschließen. β - und γ -Untereinheit bilden zwei kurze Arme aus, die α -Untereinheit stellt einen weiteren kurzen und einen langen Arm. Alle vier Arme besitzen globuläre Enddomänen, auf denen Bindungsstellen für Integrine lokalisiert sind. Laminin ist eine Hauptkomponente der Basalmembran und liegt dabei gebunden an Kollagen IV vor, welches im Gegensatz zu anderen Kollagentypen keine Fibrillen ausbildet, sondern zu einem maschenartigen Netzwerk auswächst [183]. Über Heparansulfat-Proteoglykane kann Laminin Wachstumsfaktoren und andere Zytokine binden und speichern. Als Liganden der Integrine und weiterer Rezeptoren können die Laminine über die Genese und Differenzierung von epithelialen Strukturen hinaus auch die Entwicklung und Progression von soliden Tumoren beeinflussen [184].

Die Integrine $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ sind reine Laminin-Rezeptoren. $\alpha_2\beta_1$ bindet neben Laminin verschiedene Kollagene und $\alpha_3\beta_1$ besitzt zusätzliche Bindungsstellen für Fibronectin, Kollagen IV und andere Matrixbestandteile [185]. Darüber hinaus existieren mit $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_7\beta_1$ weitere Integrin-Heterodimere mit der Fähigkeit, Laminin zu binden. Allerdings werden diese vornehmlich von Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimiert [186]. Damit setzen sich die Laminin-Rezeptoren unter den Integrinen, die in erster Linie von epithelialen Zellen exprimiert werden, aus

den Untereinheiten α_2 , α_3 , α_6 , β_1 und β_4 zusammen.

Das für die α_2 -Integrin-Untereinheit (*CD49b*, *Very Late Activation Protein 2*, *VLA-2*) kodierende Gen *ITGA2* ist auf Chromosom 5q23-31 lokalisiert [187]. Die Nukleotidsequenz von 5374 Basenpaaren (bp) kodiert für 1181 Aminosäuren (AS), von denen 1103 AS die extrazelluläre und 22 AS die kurze intrazelluläre Domäne bilden. Zu den anderen α -Untereinheiten besteht eine Ähnlichkeit von etwa 20%. Im Unterschied zu den anderen Integrin-Untereinheiten verfügt α_2 über eine so genannte *I-Domäne* mit einer Länge von 191 AS, die potentielle Bindungsstellen für Kollagen besitzt [188].

Die menschliche α_3 -Integrin-Untereinheit (*CD49c*, *VLA-3*) besitzt ein Molekulargewicht von 150 kD und wird vom *ITGA3* Gen auf Chromosom 17q21 kodiert. Das Gen erstreckt sich über 36,3 Kilobasen (kb) und besitzt 26 Exons, von denen zwei Splicing-Varianten existieren. Das α_3 B-Protein kommt lediglich in Gehirn und Herz vor, während das α_3 A-Protein im gesamten Organismus verbreitet ist [189]. Die α_3 -Untereinheit verbindet sich nur mit der β_1 -Untereinheit zum $\alpha_3\beta_1$ -Integrin-Heterodimer. Liganden des $\alpha_3\beta_1$ -Integrins sind neben Laminin auch Kollagen IV und Fibronectin [190]. Da $\alpha_3\beta_1$ -knock-out Mäuse vor der Geburt sterben, kann auf eine essentielle Rolle des $\alpha_3\beta_1$ -Integrins in der Embryogenese geschlossen werden [191]. Das $\alpha_3\beta_1$ -Integrin kommt im ausgewachsenen Organismus auf fast allen Geweben vor und wird insbesondere auf Epithelien und Endothelien exprimiert [20, 186]. Des Weiteren ist das $\alpha_3\beta_1$ -Integrin Bestandteil von fokalen Adhäsionsstellen und ist in organisierten Epithelverbänden im Bereich von Zell-Zell-Kontakten lokalisiert, ohne mit Matrixbestandteilen zu interagieren. Nehmen Zellen epithelialen Ursprungs im allerdings einen migratorischen Phänotyp an (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, *EMT*), polarisiert sich das Integrin an den Kontaktflächen zur ECM [192]. Im Gegensatz zum $\alpha_6\beta_4$ -Integrin, welches als Bestandteil der Hemidesmosomen eine stabile und dauerhafte Adhäsion von Zellen an die Basalmembran vermittelt, scheint das $\alpha_3\beta_1$ -Integrin über die Ausbildung von Fokalkontakten eher an der temporären Zelladhäsion an ECM-Komponenten beteiligt zu sein. Zusätzlich kann das $\alpha_3\beta_1$ -Integrin die Aktivität und Distribution von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Plasminogen-Aktivatoren und deren Rezeptoren modulieren [193-195].

Die α_6 -Integrin-Untereinheit (*CD49f*, *VLA-6*) wird vom *ITGA6* Gen auf Chromosom 2q31.1 kodiert und ähnelt in seiner genomischen Organisation und seiner Aminosäuresequenz der α_3 -Untereinheit mit einer Homologie von 40%. Die 140 kD große α_6 -Untereinheit besteht aus 1050 Aminosäuren und tritt als $\alpha_6\beta_1$ - und $\alpha_6\beta_4$ -Heterodimer auf [196, 197]. α_6 -knock-out-Mäuse sterben kurz nach der Geburt durch die blasenartige Auflösung von Epithelien, ohne dass die Embryonalentwicklung beeinträchtigt gewesen ist [198]. Wie beim Krankheitsbild der *Epidermolysis bullosa hereditaria* des Menschen steht das vollständige Fehlen von Hemidesmosomen im Vordergrund. Hemidesmosomen sind transmembranäre Komplexe, die das Laminin der Basalmembran u. a. über Plectin mit den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts von epithelialen Zellen verbinden [199, 200]. $\alpha_6\beta_4$ ist als einziges Integrin in der Lage, intrazellulär Intermediärfilamente zu binden und trägt damit maßgeblich zur Verankerung und Stabilisierung von epithelialen Zellverbänden am Substratum bei.

Das Gen *ITGB1*, welches für die β_1 -Integrin-Untereinheit (*CD29*, *FNRB*, *VLA-beta*) codiert, wurde auf Chromosom 10p11.2 lokalisiert [201]. Während heterozygote β_1 -knock-out-Mäuse in ihrer Entwicklung von gesunden Tieren nicht zu unterscheiden sind, sterben homozygote Embryos bereits in einem frühen Entwicklungsstadium kurz nach der Implantation [202]. Die β_1 -Untereinheit bildet mit zahlreichen α -Untereinheiten Integrin-Heterodimere aus [14], von denen in der vorliegenden Untersuchung jedoch nur die

Integrine $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$ betrachtet worden sind.

Das Gen *ITGB4* auf Chromosom 17q25 kodiert für die β_4 -Integrin-Untereinheit (*CD104*) [196]. Die 190 kD große β -Untereinheit bildet mit der α_6 -Untereinheit als einzigem Bindungspartner das $\alpha_6\beta_4$ -Heterodimer. Die außergewöhnlich große zytoplasmatische Domäne der β_4 -Untereinheit mit einer Länge von etwa 1000 Aminosäuren weist keine Homologie zu den Sequenzen der anderen β -Untereinheiten auf und scheint entscheidend für die Transduktion der Signalwirkung von $\alpha_6\beta_4$ zu sein [203]. Das Ausschalten des *ITGB4* Gens in Mäusen führt wie der α_6 -knock-out zu einer Desintegration von Epithelien [204].

1.4.3 Integrin-Expression im Plattenepithel des Ösophagus

Im Stratum basale der meisten Epithelien werden die Integrine $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ an den basolateralen Zellgrenzen exprimiert. Die Integrine $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ weisen eine verstärkte Expression an den der Basalmembran zugewandten Zelloberflächen auf, was im Falle des $\alpha_6\beta_4$ -Integrins die Verteilung der Hemidesmosomen widerspiegelt. In zahlreichen immunhistochemischen Studien wurde eine beinahe ubiquitäre Verbreitung der β_1 -Untereinheit beobachtet. Neben Epithelien und Endothelien zeigen auch Zellen mesodermalen Ursprungs wie Leukozyten, Thrombozyten, Fibroblasten und Myozyten sowie Zellen des peripheren und zentralen Nervensystems eine β_1 -Expression [186]. Aufgrund der vielen möglichen Bindungspartner muss die Diskriminierung der Integrin-Heterodimere mit Beteiligung der β_1 -Untereinheit anhand der α -Untereinheiten erfolgen. In Epithelien weisen die Integrine $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_3\beta_1$ auf den Zelloberflächen insgesamt eine zirkumferenzielle Verteilung auf, wobei auf den basalständigen Zellen eine verstärkte α_2 - und α_3 -Expression festgestellt wird. Mehr noch zeigt sich dieses Verteilungsmuster für die α_6 -Untereinheit mit einer besonderen Betonung der Expression auf den basalen Zelloberflächen. Allerdings kann die α_6 -Untereinheit auch als $\alpha_6\beta_4$ -Heterodimer vorliegen, so dass eine Unterscheidung anhand der β_4 -Expression vorgenommen werden kann. Diese beschränkt sich in Epithelien fast ausschließlich auf die basale Zellschicht. Das $\alpha_6\beta_4$ -Integrin wird außerdem auf den Schwann'schen Zellen der Myelinscheiden peripherer Nerven gefunden [205].

Die Mukosa des Ösophagus ist zum zentralen Lumen hin durch ein mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel begrenzt. Eine Studie von Dobson et al. zur Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle in der Ösophagusk Mukosa ergab ein im Vergleich zu anderen Plattenepithelien leicht verändertes Expressionsmuster der Integrin-Untereinheiten α_2 , α_3 , α_6 , β_1 und β_4 (siehe Tabelle 5) [206]. Für die genannten Untereinheiten wurde stets eine starke Expression im Stratum basale beschrieben, wobei die Stärke der Expression mit zunehmender Entfernung der Zellen von der basalen Zellschicht abnahm. Während die α_2 -, α_3 - und β_1 -Untereinheit im gesamten Ösophagusepithel exprimiert wurden, beschränkte sich die Expression der α_6 -Untereinheit auf das Stratum basale und Stratum spinosum. Die Expression der β_4 -Untereinheit war auf das Stratum basale begrenzt. Die α_2 -Untereinheit wies eine starke Expression im Stratum basale auf, wurde im Stratum spinosum nur in geringem Maße exprimiert, um im Stratum squamosum wieder stärker exprimiert zu werden.

Tabelle 5. Expression der Integrin-Untereinheiten α_2 , α_3 , α_6 , β_1 und β_4 im Ösophagus-Plattenepithel [206].

Integrin-Untereinheit	Stratum basale		Stratum spinosum		Stratum squamosum
	Basal	Apikal	Basal	Apikal	
α_2	+++	+++	+ / -	+	++
α_3	+++	++	++ / +	+	+ / -
α_6	++	+	++	+	-
β_1	+++	+++	++	++ / +	+
β_4	+++	++	-	-	-

1.4.4 Integrin-Expression bei soliden Tumoren

Bei gastrointestinalen Tumoren ist neben vielen weiteren Einflussgrößen insbesondere auch das Expressionsverhalten der Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) an der Entstehung und Entwicklung eines invasiven Karzinoms beteiligt [207]. Die Integrine sind – im Zusammenspiel mit anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen – über ein komplexes Signalnetzwerk an der Regulation der Genexpression epithelialer Zellen und folglich an der Kontrolle von Wachstum, Proliferation und Differenzierung beteiligt [13, 166]. Ausgehend von der Annahme, dass sich die dysregulierte Genexpression in invasiv wachsenden Karzinomen unter anderem auch in einer alterierten Integrin-Expression äußern müsse, ist bei zahlreichen Tumorentitäten das Expressionsverhalten der Integrine untersucht worden [17-19].

So scheint beispielsweise bei der Entstehung colorektaler Karzinome zunächst die räumliche Verteilung der Integrin-Expression im Tumorgewebe verloren zu gehen, während der Übergang vom Adenom zum Adenokarzinom mit einem Verlust der Integrin-Expression assoziiert ist [208]. Während in normaler Colonmukosa die Integrin-Untereinheiten α_2 , α_3 , α_6 , β_1 und β_4 exprimiert werden und α_6 , β_1 und β_4 in den benignen Läsionen ein ähnliches Expressionsniveau und eine weitestgehend homogene Expression aufwiesen, zeigt sich mit Ausnahme der α_6 -Untereinheit in den meisten Karzinomen eine verminderte Expression oder der vollständige Verlust der untersuchten Integrine [209, 210]. Beim Pankreaskarzinom hingegen wurde bei einigen Tumoren eine Integrin-Expression beobachtet, die dem Expressionsverhalten im korrespondierenden Normalgewebe ähnelte [211].

Bei soliden Tumoren wurden häufig prognostisch relevante Zusammenhänge zwischen der Oberflächenexpression der Integrine und dem Invasions- und Metastasierungsverhalten der Tumoren beobachtet [20, 186, 212-217]. Die Integrin-Expression in den untersuchten Tumorkollektiven variierte erheblich, ohne dass sich einheitliche Veränderungen feststellen ließen. Das Expressionsverhalten unterschied sich nicht nur zwischen unterschiedlichen Tumorentitäten – verschiedene Untersuchungen zum gleichen Tumortyp lieferten z. T. kontroverse Ergebnisse [186]. Aus dieser Beobachtung leitet sich die Notwendigkeit ab, die Integrin-Expression für jeden Tumortyp gesondert zu studieren. Zur Integrin-Expression beim Ösophaguskarzinom liegen vergleichsweise wenige Studien vor, wobei bislang lediglich die Expression einzelner Integrine exemplarisch untersucht worden ist [218-223].

1.5 Ziele der Studie

Aufgrund ihrer prognostischen Bedeutung bei vielen soliden Tumoren könnte die Bestimmung eines Integrin-Expressionsprofils auch beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zusätzliche Informationen zur Aggressivität der Tumoren bzw. zum Verlauf der Tumorerkrankung liefern und damit zu einer umfassenderen Charakterisierung und verfeinerten Typisierung des Ösophaguskarzinoms beitragen.

Ziel dieser Studie war es, beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus die Expression der Integrine $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ im Tumorgewebe zu charakterisieren und auf ihre Bedeutung für den Verlauf und die Prognose der Tumorerkrankung zu prüfen. Dazu wurde mit einer Immunfluoreszenzfärbung simultan die Expression der Integrin-Untereinheiten α_2 , α_3 , α_6 , β_1 und β_4 an einer Serie von Tumoren dargestellt und mit der physiologischen Expression in der korrespondierenden Ösophagasmukosa verglichen. Beurteilt wurden die Expressionsstärken und das Verteilungsmuster der Integrin-Untereinheiten in den Tumorproben. Die Ergebnisse wurden mit den pathohistologischen Parametern der Tumoren korreliert und hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung für das postoperative Überleben der Patienten analysiert.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Die Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt. Eine Einwilligung zur Studienteilnahme wurde von allen beteiligten Patienten schriftlich niedergelegt. Von 36 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, bei denen im Zeitraum von April 1992 bis Dezember 1999 im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf eine *en-bloc*-Resektion des Ösophagus mit abdominaler und mediastinaler Lymphadenektomie durchgeführt worden war, konnte Gewebematerial gewonnen und asserviert werden. Die OP-Präparate wurden im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. U. Helmchen) aufgearbeitet und gemäß den Richtlinien der 5. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC hinsichtlich des Tumorstadiums (TNM), des Differenzierungsgrades (G) sowie des Resektionsstatus (R) histopathologisch beurteilt [224].

Das Patientenkollektiv bestand aus 30 Männern (83%) und 6 Frauen (17%) (siehe Tabelle 6). Der Altersmedian betrug 57,5 Jahre (36–73 Jahre), das mittlere Lebensalter $57,1 \pm 8,9$ Jahre. In 23 Fällen (64%) war der Primärtumor im mittleren Drittel, in 8 Fällen (22%) im unteren und in 5 Fällen (14%) im oberen Drittel des Ösophagus lokalisiert. Gemäß TNM-Klassifikation wurden die Primärtumorstadien von 3 Tumoren (8%) als pT1, 9 Tumoren (25%) als pT2, 22 Tumoren (61%) als pT3 und 2 Tumoren (6%) als pT4 eingestuft. Hinsichtlich des Lymphknotenbefalls verteilte sich das Kollektiv mit 14 Patienten (39%) auf das Stadium pN0 und 22 Patienten (61%) auf das Stadium pN1. Bei 2 Patienten (6%) wurde intraoperativ eine Organfernmetastasierung festgestellt und histopathologisch gesichert (pM1). In 2 Fällen (6%) wurde ein Tumorbefall distanter zervikaler bzw. abdominaler Lymphknotenstationen (pM1LYM) festgestellt. Entsprechend der UICC-Stadiengruppierung befanden sich 2 Patienten (6%) im Tumorstadium I, 12 Patienten (33%) im Tumorstadium IIa, 5 Patienten (14%) im Tumorstadium IIb, 14 Patienten (39%) im Tumorstadium III, 1 Patient (2%) im Tumorstadium IVa und 2 Patienten (6%) im Tumorstadium IVb. In 33 Fällen (92%) konnte eine R0-Situation erreicht werden. In 3 Fällen (8%) ergab die histologische Untersuchung den Nachweis von tumorinfiltrierten Resektaträndern (R1).

In einer parallel laufenden Studie zur „Inzidenz und prognostischen Bedeutung von frühdisseminierten Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark bei Patienten mit resektablem Ösophaguskarzinom“, die von der Arbeitsgruppe „Abdominalchirurgische Onkologie“ der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt worden war, waren intraoperativ gewonnenes Knochenmark sowie histopathologisch als „tumorfrei“ befundete Lymphknoten immunzyto- bzw. immunhistochemisch auf okkult disseminierte Tumorzellen hin untersucht worden [158, 225]. Ein Teil dieser Ergebnisse wurde ebenfalls für die vorliegende Studie herangezogen.

Tabelle 6. *Patientenkollektiv.*

Klinisch-pathologische Parameter	n Patienten (%)
Patienten (n=36)	
Männlich	30 (83%)
Weiblich	6 (17%)
Altersmedian: 57,5 Jahre (36 – 73 Jahre)	
Mittleres Alter: 57,1 ± 8,9 Jahre	
Lokalisation	
Oberes Drittel	5 (14%)
Mittleres Drittel	23 (64%)
Unteres Drittel	8 (22%)
Differenzierungsgrad	
G1	1 (3%)
G2	26 (72%)
G3	9 (25%)
Primärtumorstadium/T-Klassifikation	
pT1	3 (8%)
pT2	9 (25%)
pT3	22 (61%)
pT4	2 (6%)
Lymphknotenstadium/N-Klassifikation	
pN0	14 (39%)
pN1	22 (61%)
Lymphknotenmetastasen	
pLK ≤ 3	27 (75%)
pLK > 3	9 (25%)
Lymphknotenfernmastasen	
pM0	34 (94%)
pM1(LYM)	2 (6%)
Fernmetastasierung/M-Klassifikation	
M0	34 (94%)
M1	2 (6%)
Residualtumor/R-Klassifikation	
R0	33 (92%)
R1	3 (8%)
UICC-Stadiengruppierung	
Stadium I	2 (6%)
Stadium Iia	12 (33%)
Stadium Iib	5 (14%)
Stadium III	14 (39%)
Stadium Iva	1 (2%)
Stadium Ivb	2 (6%)

Von 34 der 36 Patienten (94%) konnten postoperativ Daten zum weiteren Verlauf der Erkrankung erhoben werden. Hierbei wurden in halbjährlichen Abständen die weiterbehandelnden Ärzte der Patienten kontaktiert und anhand eines Fragebogens Informationen über Zeitpunkt und Lokalisation von aufgetretenen Lokalrezidiven und Fernmetastasen bzw. im Sterbefall Informationen über Todeszeitpunkt und Todesursache ermittelt. Der postoperative Beobachtungszeitraum betrug zwischen 2 und 108 Monaten (Mittelwert: 22,5 Monate). Dabei wurde das Datum der Operation als Beginn und der letzte Besuch des Patienten beim Hausarzt bzw. der Todestag als Ende des Nachbeobachtungszeitraumes festgelegt. Die summierte Beobachtungszeit von allen Patienten betrug 765 Monate (engl. *total follow-up time*). Innerhalb des Beobachtungszeitraumes entwickelten 19 der 34 Patienten (56%) ein Rezidiv. Bei 11 Patienten (32%) trat ein Lokalrezidiv auf und bei gleichfalls 11 Patienten (32%) wurden Fernmetastasen diagnostiziert. Von diesen Patienten wiesen 6 Patienten (18%) sowohl ein Lokalrezidiv als auch eine Fernmetastasierung auf. Während der Nachbeobachtungszeit verstarben insgesamt 27 der 34 Patienten (79%). 17 Patienten (50%) verstarben an ihrer Tumorerkrankung, wohingegen bei 6 Patienten (18%) kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Tod und Krebsleiden nachgewiesen werden konnte. 4 Patienten (12%), die während ihres initialen Krankenhausaufenthaltes an den unmittelbaren Folgen der Tumoroperation gestorben waren, und 2 Patienten (6%), bei denen intraoperativ eine Fernmetastasierung (M1) festgestellt worden war, wurden von den postoperativen Überlebensanalysen ausgeschlossen. Insgesamt standen somit für die postoperativen Überlebensanalysen 28 von 36 Patienten (78%) zur Verfügung.

2.2 Gewebeaufbereitung

Von allen Patienten wurden aus dem Operationsresektat repräsentative Tumorgewebeproben gewonnen, in *Tissue-Tek O.C.T.* Kryomedium (Sakura Finetek Europe BV, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und unverzüglich in flüssigem Stickstoff tief gefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C gelagert. Mithilfe eines Kryotoms (Microm HM 505 E, Microm International GmbH, Walldorf/Baden) wurden aus den Tumorproben konsekutive Gewebeschnitte mit einer Dicke von 5 µm hergestellt und auf Objektträger (Histobond, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) aufgebracht. Diese wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Darstellung der Integrin-Untereinheiten wurde eine indirekte Fluoreszenzfärbemethode angewendet. Dabei bindet zunächst ein unmarkierter Primärantikörper spezifisch an das darzustellende Antigen auf den Gewebeschnitten. Ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper, der gegen verschiedene Epitope der Immunglobulinketten des Primärantikörpers gerichtet ist, bindet und markiert anschließend den Primärantikörper. Im Vergleich zur direkten Immunfluoreszenzfärbung, bei der das Antigen mit nur einem fluoreszenzmarkierten Antikörper dargestellt wird, erreicht die indirekte Fluoreszenzfärbemethode eine höhere Sensitivität. Die so markierten Strukturen wurden mit einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht, dessen Leuchtquelle nach entsprechender Filterung die Antikörper-gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission von Licht mit einer charakteristischen Wellenlänge anregt. Die Färbeargebnisse wurden mit einer CCD-Kamera optoelektrisch aufgenommen und in Form digitalisierter Bilderserien auf einem elektronischen

Datenträger gespeichert.

2.3.1 Primärantikörper

Zur Darstellung der Integrin-Untereinheiten α_2 , α_3 , β_1 und β_4 wurden spezifische murine monoklonale Antikörper des Immunglobulin-Subtyps IgG₁ eingesetzt. Die α_6 -Integrin-Untereinheit wurde durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper des Immunglobulin-Subtyps IgG_{2a} aus der Ratte detektiert (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7. *Primärantikörper**.

Klon	Spezifität	Ig-Subtyp	Spezies	Verdünnung	Referenzen
AK-7	α_2 -Integrin-Untereinheit	IgG ₁ , κ	Maus	1:200	[226-228]
C3 II.1	α_3 -Integrin-Untereinheit	IgG ₁ , κ	Maus	1:200	[228]
GoH3	α_6 -Integrin-Untereinheit	IgG _{2a} , κ	Ratte	1:200	[229]
MAR4	β_1 -Integrin-Untereinheit	IgG ₁ , κ	Maus	1:200	[230]
450-9D	β_4 -Integrin-Untereinheit	IgG ₁ , λ	Maus	1:200	[231]

* Alle Primärantikörper wurden von BD PharMingen, San Diego, Kalifornien, USA, bezogen.

Alle Primärantikörper wurden in einer Tris-HCl-Pufferlösung (Antibody Diluent, DakoCytomation GmbH, Hamburg), die ein stabilisierendes Protein und 0,015 mol/l Natriumazid enthält, verdünnt. Anhand von Schnittpräparaten von normaler Ösophagus- und Colonmukosa, deren Epithelien die untersuchten Integrin-Untereinheiten regelhaft exprimieren [206, 209], wurden die einzelnen Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen auf ein optimales Färbeergebnis hin titriert. Dabei zeigte die Verdünnung aller verwendeten Antikörper im Verhältnis 1:200 (2,5 µg/ml) eine kräftige, spezifische Anfärbung der Keratinozyten bzw. Enterozyten bei Ausbleiben einer unspezifischen Hintergrundfärbung. Zum Ausschluss falsch negativer Resultate dienten als Positivkontrolle Gewebeschnitte von normaler Colonmukosa, die stets mitgefärbt wurden. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurde zu jedem Präparat ein konsekutiver Schnitt ohne Primärantikörper im Verdünnungsansatz mitgefärbt. Als Isotyp-Kontrolle für die Antikörper der Immunglobulin-Subklasse IgG₁ diente der murine Antikörper *MOPC-21* (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA). Dieser entstammt einer Plasmazytom-Zelllinie, die nach intraperitonealer Applikation in BALB/c Mäusen Antikörper des Subtyps IgG₁, κ gegen ein unbekanntes Hapten freisetzt. Für die Immunglobulin-Subklasse IgG_{2a}, κ wurde der Antikörper *A110-2* des gleichen Subtyps (BD PharMingen, San Diego, Kalifornien, USA) verwendet, welcher nach Immunisierung von Ratten gegen das Hämocyanin einer Napfschnecken-Gattung gewonnen wird.

2.3.2 Sekundärantikörper

Zur Visualisierung der gebundenen Primärantikörper wurden mit *Rhodamin Red-X* (RRX, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) konjugierte Antikörper verwendet (siehe Tabelle 8). Bei dem Fluoreszenzfarbstoff handelt sich um einen Succinimidylester von Lissamin-Rhodamin B, der nach Anregung mit grün-gelbem Licht

im Wellenlängenbereich von 535–595 nm rotes Licht emittiert und im Gegensatz zu anderen Rhodamin-Derivaten die Eigenschaften der konjugierten Proteine kaum beeinflusst. Durch die Koppelung an Amino-hexansäure entsteht zwischen Rhodamin Red-X und dem konjugierten Antikörper ein räumlicher Abstand, welcher das Fluorochrom von der Proteinoberfläche abhebt und zu einer verbesserten Färbeintensität führt [232]. Darüber hinaus zeichnen sich Immunfluoreszenzfärbungen mit Rhodamin Red-X als Fluorochrom durch eine geringe unspezifische Anfärbung des Hintergrunds und eine hohe Stabilität der Fluoreszenz aus. Die RRX-Sekundärantikörper wurden im Esel generiert und sind gegen Epitope auf den schweren und leichten Ketten der Primärantikörper gerichtet. Entsprechend den Vorgaben des Herstellers wurden die Sekundärantikörper in der niedrigsten empfohlenen Verdünnung von 1:200 (6,5 µg/ml) eingesetzt.

Tabelle 8. Sekundärantikörper*.

Antikörper	Spezies	Verdünnung
Rhodamine Red-X-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Esel	1:200
Rhodamine Red-X-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG (H+L)	Esel	1:200

* Alle Primärantikörper wurden über Dianova GmbH, Hamburg, von Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA, bezogen.

Fluoreszenz aus. Die RRX-Sekundärantikörper wurden im Esel generiert und sind gegen Epitope auf den schweren und leichten Ketten der Primärantikörper gerichtet. Entsprechend den Vorgaben des Herstellers wurden die Sekundärantikörper in der niedrigsten empfohlenen Verdünnung von 1:200 (6,5 µg/ml) eingesetzt.

Für die Kerngegenfärbung wurde das Fluorochrom 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol (*DAPI*) verwendet. Dieser Farbstoff bindet spezifisch an AT-Basenpaare und interkaliert mit GC-Basenpaaren der DNA [233, 234]. Die Anfärbung der DNA erfolgte bei der Versiegelung der gefärbten Präparate mit einem Einschlussmittel, welches DAPI in einer Konzentration von 1,5 µg/ml enthält (Vectashield Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA).

2.3.3 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen

Die bis zum Zeitpunkt der Färbung bei -20°C gelagerten Gewebeschnittpräparate wurden für 30' bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 1'30'' in eisgekühltem Aceton fixiert. Nachdem die Schnittpräparate in Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (engl. *phosphate buffered saline, PBS*; pH 7,4) rehydriert und gewaschen (3 x 5') worden waren, wurden die Gewebeschnitte mit einer Casein-haltigen serumfreien Proteinlösung (DAKO Protein Block Serum-free, DakoCytomation GmbH, Hamburg) für 20' inkubiert. Dieser Behandlungsschritt unterdrückt unspezifische Anfärbungen des Gewebehintergrundes, welche durch hydrophobe Wechselwirkungen der Antikörper mit Komponenten des Bindegewebes entstehen können. Sämtliche Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach

erneutem Waschen in PBS (3 x 5') wurden die Gewebeschnitte mit den Primärantikörpern inkubiert, die zuvor in einer Pufferlösung (Antibody Diluent, DakoCytomation GmbH, Hamburg) im Verhältnis 1:200 verdünnt worden waren. Nach 60' wurden die Antikörperverdünnungen von den Objektträgern abgeklopft und diese im Anschluss 3 x 5' in PBS gewaschen. Darauf folgte für 60' die Inkubation mit den RRX-konjugierten Sekundärantikörpern, die im Verhältnis von 1:200 in der gleichen Antikörper-Verdünnungslösung angesetzt worden waren. Anschließend wurden die Schnitte noch einmal für 3 x 5' in PBS gewaschen. Abschließend wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem viskösen, DAPI-haltigen Einschlussmedium überschichtet, welches das Ausbleichen der Fluoreszenz vermindert. Zuletzt wurden die Gewebeschnitte mit Deckgläsern versehen, die mithilfe eines Montageklebers (Marabu-Fixogum, Marabuwerke GmbH & Co. KG, Tamm) am Objektträger fixiert wurden. Die gefärbten Schnittpräparate wurden bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4°C gelagert.

2.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der immunfluoreszenzgefärbten Gewebeschnitte erfolgte mit einem Leica DMRXA Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems AG, Wetzlar). Die Präparate wurden dabei durch das Objektiv, welches gleichzeitig als Kondensor fungiert, beleuchtet. Die zur Anregung der Fluorochrome erforderliche Wellenlänge des Lichts wird mit einem Eingangsbandfilter (Anregungsfilter) aus dem weißen Licht einer Quecksilberdampf-Lampe herausgefiltert, die ein Lichtspektrum mit Wellenlängen zwischen 360 nm und 700 nm bietet (siehe Tabelle 9). Das gefilterte Licht wird über einen dichromatischen Spiegel auf das Gewebepräparat gelenkt.

Tabelle 9. Fluorochrome und zugehörige Fluoreszenzfilter.

Fluorochrom	Exzitations-maximum	Emissions-maximum	Anregungsfilter	Emissionsfilter	Strahlenteiler
DAPI	340 nm	488 nm	360 ± 40 nm	470 ± 40 nm	400 nm
Rhodamin Red-X	570 nm	590 nm	565 ± 30 nm	620 ± 60 nm	585 nm
FITC	492 nm	520 nm	480 ± 40 nm	527 ± 30 nm	505 nm

Zwischen den Exzitations- und Emissionsmaxima von RRX und DAPI besteht ein ausreichend großer Abstand, so dass die unterschiedlich markierten Gewebestrukturen unabhängig voneinander dargestellt werden können. Jeder Gewebeschnitt wurde darüber hinaus mit einem Filter betrachtet, der zur selektiven Darstellung von mit *Fluorescein-Isothiocyanat* (FITC) markierten Strukturen verwendet wird. Da keine Markierung mit FITC-konjugierten Antikörpern erfolgte und das Licht, welches von DAPI und RRX emittiert wurde, den FITC-spezifischen Filter nicht passieren kann, erhält der Betrachter auf diese Weise einen Eindruck des unmarkierten bzw. ungefärbten Gewebepräparats. So konnte die spezifische Markierung der Gewebestrukturen mit RRX sicher von einer möglichen Eigenfluoreszenz des Gewebes abgegrenzt werden, welche sich in der Regel in allen Filtern zeigt.

Die Bilddokumentation der gefärbten Gewebepreparate erfolgte durch die Verknüpfung einer EDV-gesteuerten CCD-Kamera (Photometrics Sensys, Visitron Systems GmbH, Puchheim) mit dem Fluoreszenzmikroskop. Mit dem EDV-Programm Leica QFISH Version V 2.2 (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) wurden digitalisierte Bilderserien aufgenommen, bewertet und gespeichert (siehe Abbildung 3).

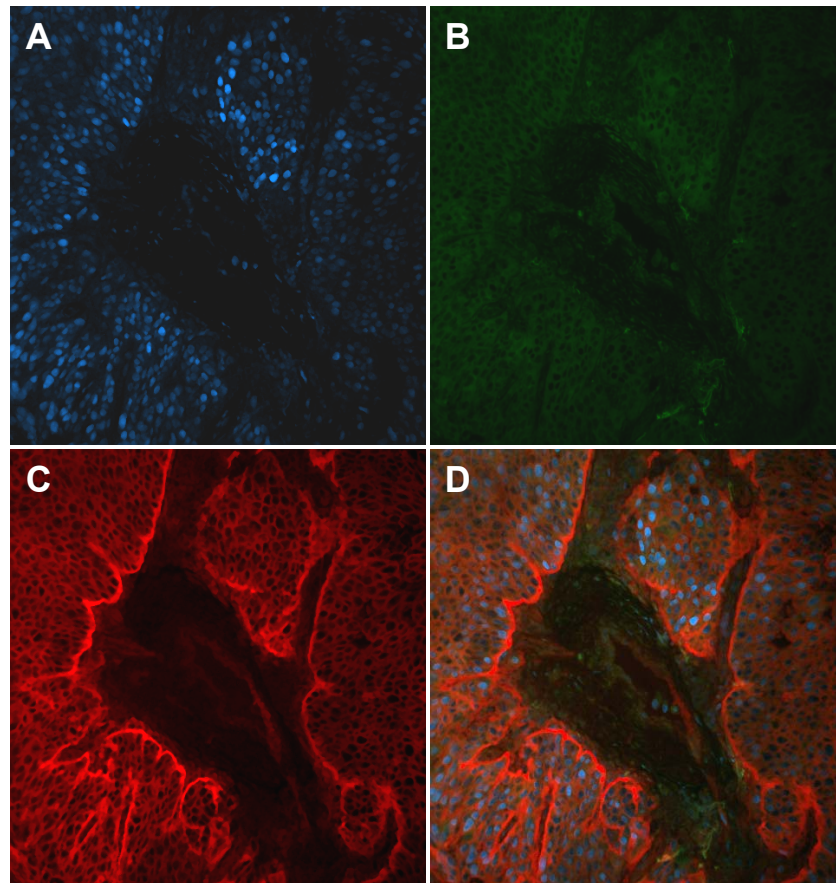


Abbildung 3. Falschfarben-Darstellung eines mit Rhodamin Red-X markierten, spezifisch gegen die α_6 -Integrin-Untereinheit gefärbten Schnittpräparats aus Tumorgewebe. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (Ausschnittsvergrößerung ca. 100fach, aufgenommen mit einer CCD-Kamera, Verarbeitung und Dokumentation mit dem Leica QFISH Programm). Serienaufnahme mit verschiedenen Fluoreszenz-Filtern zur Darstellung von (A) DAPI-markierten Strukturen, (B) FITC-markierten Strukturen (Leeraufnahme) und (C) RRX-markierten Strukturen. (D) Überlagerung der Serienaufnahmen.

2.3.5 Hämalaun-Eosin-Färbung

Zur Darstellung der Gewebemorphologie wurde parallel zur Immunfluoreszenzfärbung ein konsekutiver Gewebeschnitt von jeder Tumorprobe mit der *Hämalaun-Eosin-Methode* gefärbt (siehe Abbildung 4).

Nach Trocknung der Gefrierschnitte für 30' bei Raumtemperatur wurden die Objektträger in einer absteigenden Alkoholreihe von 100% über 98% und 96% bis auf 80% Isopropanol für jeweils 2 x 2' fixiert. Nach einer kurzen Rehydrierung in destilliertem Wasser erfolgte die Anfärbung in *Hämalaun nach P. Mayer* (Merck KGaA,

Darmstadt) für 5'. Hämalun bindet u. a. an die negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuren, was in einer bläulichen Anfärbung der Kernstruktur resultiert. Anschließend wurden die Präparate kurz in destilliertes Wasser getaucht und für 3' mit 1%igem Eosin gegengefärbt. Eosin bindet elektrostatisch an positiv geladene Gruppen von Proteinen und färbt das Zytoplasma und Bindegewebsstrukturen rötlich an. Im Anschluss wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 80% über 96% auf 100% Isopropanol für jeweils 2 x 2' dehydriert. Nach Behandlung der Gewebeschnitte mit Rotihistol für 2 x 2' wurden die Schnittpräparate mit dem Einschlussmedium *Entellan Neu* (Merck KGaA, Darmstadt) überschichtet, welches die abschließend aufgelegten Deckgläser nach Lufttrocknung über Nacht dauerhaft fest mit dem Objektträger verband.

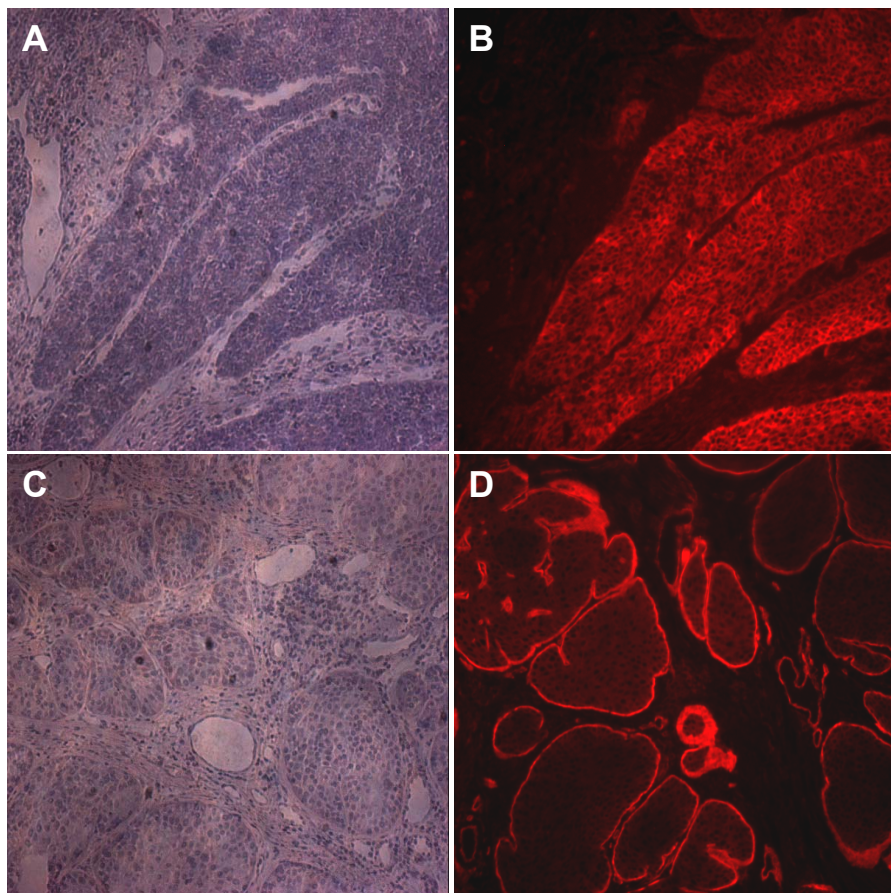


Abbildung 4. H.E.- und Immunfluoreszenz-Färbung von konsekutiven Schnitten zweier Tumoren. (A) (C) H.E.-Färbung. (B) Immunfluoreszenzfärbung gegen die α_2 -Integrin-Untereinheit und (D) gegen die α_6 -Integrin-Untereinheit. Falschfarben-Darstellung des an den Sekundärantikörper konjugierten Fluorochroms Rhodamin Red-X (rot).

2.4 Auswertung

In verschiedenen Bereichen eines gefärbten Gewebeschnitts wurden jeweils das Invasionsverhalten des Tumors, die Farbeintensitäten der untersuchten Integrin-Untereinheiten im Tumorgewebe sowie deren Färbemuster bewertet. Die Beurteilung der Präparate erfolgte ohne Kenntnis der Patientendaten durch zwei unabhängige Auswerter. Waren hierbei einzelne Präparate unterschiedlich beurteilt worden, wurden diese nochmals

gemeinsam untersucht und ein Konsens hergestellt.

2.4.1 Beurteilung des Invasionsverhaltens

Zunächst wurden die Tumorgewebepräparate anhand der mit der H.E.-Methode gefärbten Schnittpräparate lichtmikroskopisch nach histomorphologischen Kriterien beurteilt. Erfasst wurden hierbei das Invasionsverhalten der Tumoren an den Invasionsrändern sowie das simultane Vorhandensein von normaler Ösophagismukosa mit Übergang zum invasiven Karzinom. Diese histomorphologischen Kriterien gingen in die Bewertungen der immunfluoreszenzgefärbten Gewebeschnitte ein.

In Anlehnung an eine Studie von Sarbia et al. zur prognostischen Signifikanz verschiedener histopathologischer Parameter beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, in welcher das Invasionsmuster der Tumoren (engl. *pattern of invasion*) als unabhängiger Prognosefaktor identifiziert werden konnte, wurde das Invasionsverhalten der Primärtumoren in drei Kategorien zusammengefasst (siehe Tabelle 10 und Abbildung 5) [235]. Hierbei wurden Tumoren, die sich mit einem geradlinigen und gut abgrenzbaren Invasionsrand eher verdrängend gegen die angrenzenden Gewebestrukturen vorschieben, von solchen mit stärker infiltrativem Wachstum unterschieden. Die stärker infiltrativ wachsenden Tumoren wurden entsprechend ihres Invasionsmusters wiederum in zwei Kategorien unterteilt. Tumoren, die in soliden Zellverbänden mit zapfen-, streifen-, schnur- oder inselartiger Struktur das angrenzende Gewebe infiltrieren, bildeten eine Gruppe. Davon abgegrenzt wurden Tumoren, die sich durch das Vorhandensein kleiner, invadierender Zellgruppen auszeichneten, ohne dass eine übergeordnete strukturelle Form erkennbar erhalten geblieben wäre. Da sich die Gewebeproben in Größe und Tumoranteil unterschieden, wurden in einem Schnittpräparat diejenigen Bereiche der Invasionsränder zur Beurteilung des Invasionsverhaltens herangezogen, die sich in ihrer Morphologie am deutlichsten von normaler Ösophagismukosa abhoben.

Tabelle 10. Beurteilung des Invasionsverhaltens (in Anlehnung an Sarbia et al. [235]).

Invasionsmodus	Kategorie 1	Kategorie 2	Kategorie 3
Tumormorphologie	Verdrängendes Wachstum mit kontinuierlichem Tumorrand	Infiltrierendes Wachstum solider Tumorzellverbände	Infiltrierendes Wachstum kleiner Zellgruppen

2.4.2 Beurteilung der Integrin-Expression

Aus den mit einer CCD-Kamera aufgenommenen Abbildungen der gefärbten Gewebeschnitte können mit dem EDV-Programm Leica QFISH dimensionslose Rohwerte für die Helligkeit (engl. *raw intensities*) des von den angeregten Fluoreszenzfarbstoffen emittierten Lichts bestimmt werden. Diese dienten als Maß für die Färbintensität. Die Expression der einzelnen Integrin-Untereinheiten im Tumorgewebe wurde semiquantitativ anhand der ermittelten Färbintensitäten und ihrem jeweiligen prozentualen Vorkommen im untersuchten Tumorgewebe bewertet (*Expressionsstärke*). Als qualitatives Merkmal wurde die Verteilung der Integrin-Untereinheiten im Tumorgewebe (*Expressionsmuster*) festgehalten.

Serienschnitte aus Colonmukosa, die unter den gleichen Bedingungen wie die Ösophagusgewebeproben

asserviert, mit den verschiedenen Primärantikörpern gefärbt und anschließend mit RRX fluoreszenzmarkiert worden waren, lieferten orientierende Rohwerte für die in den fluoreszenzmarkierten Tumorgewebeproben zu erwartenden Helligkeiten. Bei einer Belichtungszeit von 1500 Millisekunden (ms) ließen sich stärker angefärbte Strukturen gut von weniger intensiv angefärbten Bereichen abgrenzen. Das QFISH-Programm ermittelte bei dieser Belichtungszeit für ungefärbte Gewebeschnitte bzw. für nicht angefärbte Areale von gefärbten Gewebeschnitten Intensitätswerte bis maximal 110 (Leerwerte). Für die am stärksten angefärbten Bereiche wurden stets Werte über 1000 ermittelt. Basierend auf diesen Werten wurde eine positive Anfärbung ab einem Intensitätswert von 150 angenommen, Bereiche mit Werten unter 150 wurden als *nicht angefärbt* (–) bewertet. Alle fluoreszenzgefärbten Tumorgewebeproben wurden bei weit geöffneter Blende mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen.

Zur Bewertung der Expressionsstärken wurden die gemessenen Rohwerte der Lichtintensität wie folgt kategorisiert: Angefärbte Bereiche bzw. Strukturen mit Intensitätswerten über 1000 wurden als *stark exprimierend* (+++), Bereiche mit Werten zwischen 500 und 1000 als *mäßiggradig exprimierend* (++) und Bereiche mit Werten zwischen 150 und 500 als *schwach exprimierend* (+) definiert (siehe Tabelle 11). In jedem Schnittpräparat wurden mindestens drei repräsentative Ausschnitte bei 100facher und 400facher Vergrößerung analysiert. In jedem Ausschnitt wurde die Expression der Tumorzellen im Randbereich (*Invasionsrand*) der Expression in den zentralen Anteilen (*Tumorzentrum*) der angeschnittenen Tumorzellverbände gegenübergestellt. Die Anfärbung der Tumorzellmembranen mit direktem Kontakt zur ECM am unmittelbaren Übergang zwischen Tumorgewebe und angrenzendem Normalgewebe (*Grenzschicht Tumor/ECM*) wurde gesondert beurteilt. Innerhalb eines Ausschnitts wurde für jeden Bereich (*Grenzschicht*, *Invasionsrand*, *Tumorzentrum*) zunächst der prozentuale Anteil der positiv angefärbten Tumorzellen geschätzt. Anschließend wurden in jedem Bereich die Rohintensitäten der angefärbten Tumorzellen gemessen und entsprechend des Bewertungsschemas einer Expressionsstärke zugeordnet. Erstreckten sich die Werte der Rohintensitäten in einem Tumorbereich über mehrere Bewertungskategorien, wurde dem diesem abschließend diejenige Expressionsstärke zugewiesen, die prozentual am häufigsten vertreten war.

Waren im Schnittpräparat simultan Anteile normaler Ösophagusschleimhaut vorhanden, wurden für die untersuchten Integrin-Untereinheiten analog zur Bewertung der Expression in den verschiedenen Bereichen des Tumorgewebes auch im *Stratum basale*, *Stratum spinosum* und *Stratum squamosum* des Epithels jeweils die dominierenden Expressionsstärken ermittelt. Auf diese Weise konnte die Integrin-Expression im Tumorgewebe unmittelbar mit der physiologischen Expression der Integrin-Untereinheiten in der autologen, normalen Ösophagasmukosa verglichen werden.

Tabelle 11. Bestimmung der Expressionsstärken.

Raw intensity*	< 150	150 – 500	500 – 1000	> 1000
Expressionsstärke	Keine Expression	Schwache Expression	Mäßiggradige Expression	Starke Expression
	(–)	(+)	(++)	(+++)

* Dimensionslose Rohwerte für die Färbintensität ermittelt mit dem EDV-Programm Leica QFISH.

2.4.3 Hierarchische Ähnlichkeitsanalysen

Die hierarchische Ähnlichkeitsanalyse der ermittelten qualitativen und semiquantitativen Daten ermöglicht es, innerhalb eines Kollektivs Subgruppen (engl. *cluster*) von Patienten zu identifizieren, die sich hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens ähneln. Die Ergebnisse zur Expression der verschiedenen Integrin-Untereinheiten wurden für die einzelnen Patienten in Datensätzen zusammengefasst. Mit den EDV-Programmen *Cluster* und *TreeView*, welche kostenfrei auf der Internetseite <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm> verfügbar sind, wurden diese Datensätze mit der Complete-Linkage-Clustering-Methode analysiert und schematisch dargestellt (siehe Abbildung 8) [236]. Den unterschiedlichen Wertekategorien ordnete das Programm einen roten Farbton zu, dessen Helligkeit bei ordinalen Werten mit ihrer Größe zunahm. Nullwerte wurden in Schwarz und fehlende Werte in Grau angezeigt. Den entstandenen Clustern wurde ein hierarchisches *Dendrogramm* zugeordnet, in dem sich die Ähnlichkeit zwischen zwei Datensätzen in der Länge der verbindenden Verästelung widerspiegelte: Je kürzer sich die Länge einer Aufzweigung darstellte, desto größer war die Ähnlichkeit zwischen den verbundenen Datensätzen. Datensätze, die am Ende einer Aufzweigung unmittelbar benachbart angeordnet sind, zeigen jeweils die größte Ähnlichkeit zueinander. Hingegen sind Gruppen von benachbarten Datensätzen, die von einer übergeordneten Aufzweigung eingefasst werden, den angrenzenden Subgruppen anderer Aufzweigungen nicht notwendigerweise am ähnlichsten.

2.4.4 Statistische Analysen

Für die statistische Analyse wurden nicht parametrische Variablen mit *4-Felder-Tafeln* und dem *Chi-Quadrat-Test* (χ^2 -Test) ausgewertet. Die Gleichheit zweier binominaler Verhältnisse wurde mit dem *Fisher's exact test* überprüft, wobei das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt wurde. Die postoperativen Überlebensanalysen wurden nach der *Kaplan-Meier-Methode* durchgeführt und zur Berechnung der statistischen Signifikanz der *Log-Rang-Test* herangezogen. Um die Unabhängigkeit der in den univariaten Überlebensanalysen als signifikant identifizierten Prognoseparameter zu untersuchen, wurden multivariate *Cox-Regressionsanalysen* durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Tumormorphologie und Invasionsverhalten

Das Invasionsverhalten wurde zunächst anhand der Hämalaun-Eosin-gefärbten Schnittpräparate beurteilt. Der zugeordnete Invasionsmodus wurde im Anschluss bei der Durchsicht der immunfluoreszenzgefärbten Gewebeschnitte verifiziert. In 30 von 36 Präparaten (83%) wurden simultan Tumorareale mit unterschiedlichen Invasionsmustern beobachtet. Zur Bewertung wurden abschließend diejenigen Bereiche der Invasionsränder herangezogen, die sich in ihrer Morphologie am deutlichsten von normaler Ösophagusmukosa abhoben.

3 von 36 Tumoren (8%) zeigten ein eher verdrängendes Wachstum mit einem kontinuierlichen Tumorrand zum angrenzenden Normalgewebe und ohne Ablösung von Tumorzellinseln (*Kategorie 1*) (siehe Tabelle 12 und Abbildung 5). Tumoren mit stärker invasivem Wachstum in Form von größeren, soliden Tumorzellformationen (*Kategorie 2*), die in umgebendes Normalgewebe infiltrieren, fanden sich in 6 Fällen (17%). In 27 Fällen (75%) wurde ein infiltratives Wachstum in Form von kleineren, losgelösten Tumorzellgruppen beobachtet (*Kategorie 3*).

Tabelle 12. Invasionsverhalten von 36 Primärtumoren.

Invasionsmodus	Kategorie 1	Kategorie 2	Kategorie 3
Tumormorphologie	Verdrängendes Wachstum mit kontinuierlichem Tumorrand	Infiltrierendes Wachstum solider Tumorzellverbände	Infiltrierendes Wachstum kleiner Zellgruppen
n Tumoren (%)	3 (8%)	6 (17%)	27 (75%)

Bei der Korrelation dieser Ergebnisse mit etablierten pathohistologischen Parametern ergaben sich folgende Resultate: Von den 3 Tumoren der *Kategorie 1* war 1 Tumor (33%) mäßiggradig (G2) und 2 Tumoren (67%) schlecht differenziert (G3). 4 der 6 Tumoren der *Kategorie 2* (67%) waren mäßiggradig differenziert, während 2 Tumoren (33%) eine schlechte Differenzierung aufwiesen. Von 27 Tumoren der *Kategorie 3* zeigte 1 Tumor eine gute Differenzierung (4%). 21 Tumoren (78%) wiesen ein mäßiggradige und 5 Tumoren (18%) eine schlechte Differenzierung auf.

Von den 3 Tumoren der *Kategorie 1* war jeweils 1 Tumor als pT1- (33%), pT2- (33%) und pT3-Tumor (33%) eingestuft worden. Von den 6 Tumoren der *Kategorie 2* befanden sich 2 Tumoren (33%) im Stadium pT1, 1 Tumor (17%) im Stadium pT2 und 3 Tumoren (50%) im Stadium pT3. Von 27 Tumoren der *Kategorie 3* waren 7 Tumoren (26%) dem Stadium pT2, 18 Tumoren (67%) dem Stadium pT3 und 2 Tumoren (7%) dem Stadium pT4 zugeordnet worden. Insgesamt fiel auf, dass eine Dissoziation infiltrierender Tumorzellen (*Kategorie 3*) bei pT3- und pT4-Tumoren deutlich häufiger nachweisbar war als bei pT1- und pT2-Tumoren und alle pT4-Tumoren der *Kategorie 3* zugeordnet worden waren (siehe Abbildung 6).

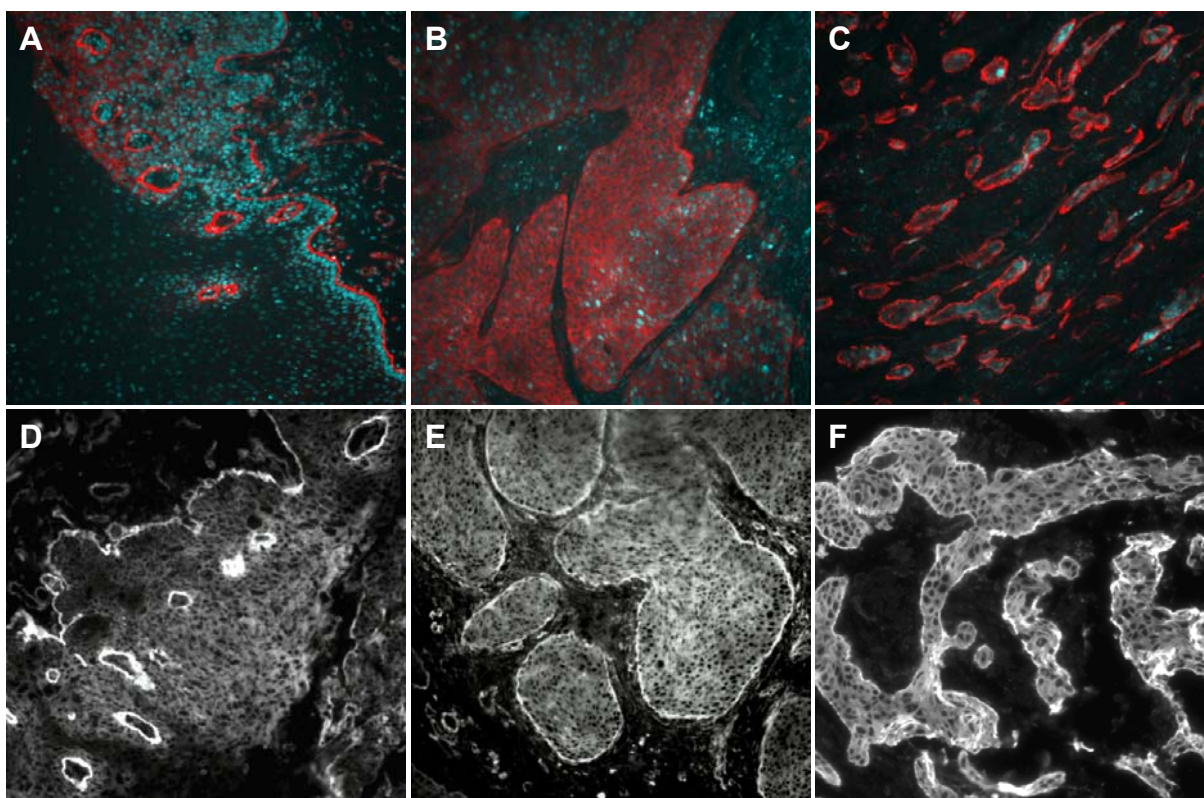


Abbildung 5. Unterschiedliche Invasionsmuster bei verschiedenen Primärtumoren. Darstellung der Integrin-Expression im Tumorgewebe durch Fluoreszenzmarkierung mit Rhodamin Red-X. **Obere Reihe:** Falschfarbendarstellung der mit RRX markierten Integrin-Untereinheiten (rot) mit Überblendung der mit DAPI gefärbten Kernstrukturen (blau). **Untere Reihe:** Graustufendarstellung der Integrin-Expression. **(A) (D)** Verdrängendes Wachstum mit kontinuierlichem Tumorrand (*Kategorie 1*). **(B) (E)** Infiltrierendes Wachstum solider Zellverbände (*Kategorie 2*). **(C) (F)** Infiltrierendes Wachstum kleiner Zellgruppen (*Kategorie 3*).

Für alle Invasionsmuster zeigte sich eine ähnliche prozentuale Verteilung der Lymphknotenstadien (siehe Abbildung 6): Von 3 Tumoren der *Kategorie 1* befand sich 1 Tumor (33%) im Stadium pN0. 2 Tumoren (67%) befanden sich im Stadium pN1. 2 von 6 Tumoren der *Kategorie 2* (33%) wurden dem Stadium pN0 zugeordnet, während 4 Tumoren (67%) das Stadium pN1 aufwiesen. Von den 27 Tumoren der *Kategorie 3* entfielen 11 Tumoren (41%) auf das Stadium pN0 und 16 Tumoren (59%) auf das Stadium pN1. 1 Tumor der *Kategorie 2* (17%) war in nicht-regionäre Lymphknoten metastasiert (pM1(LYM)). Von 27 Tumoren der *Kategorie 3* wies 1 Tumor (4%) ebenfalls das Stadium pM1(LYM) auf. Eine Fernmetastasierung (M1) trat bei 2 von 27 Patienten (7%) mit Tumoren der *Kategorie 3* auf, während Tumoren mit einer geringeren zellulären Dissoziation keine Fernmetastasen zeigten ($p=0,557$).

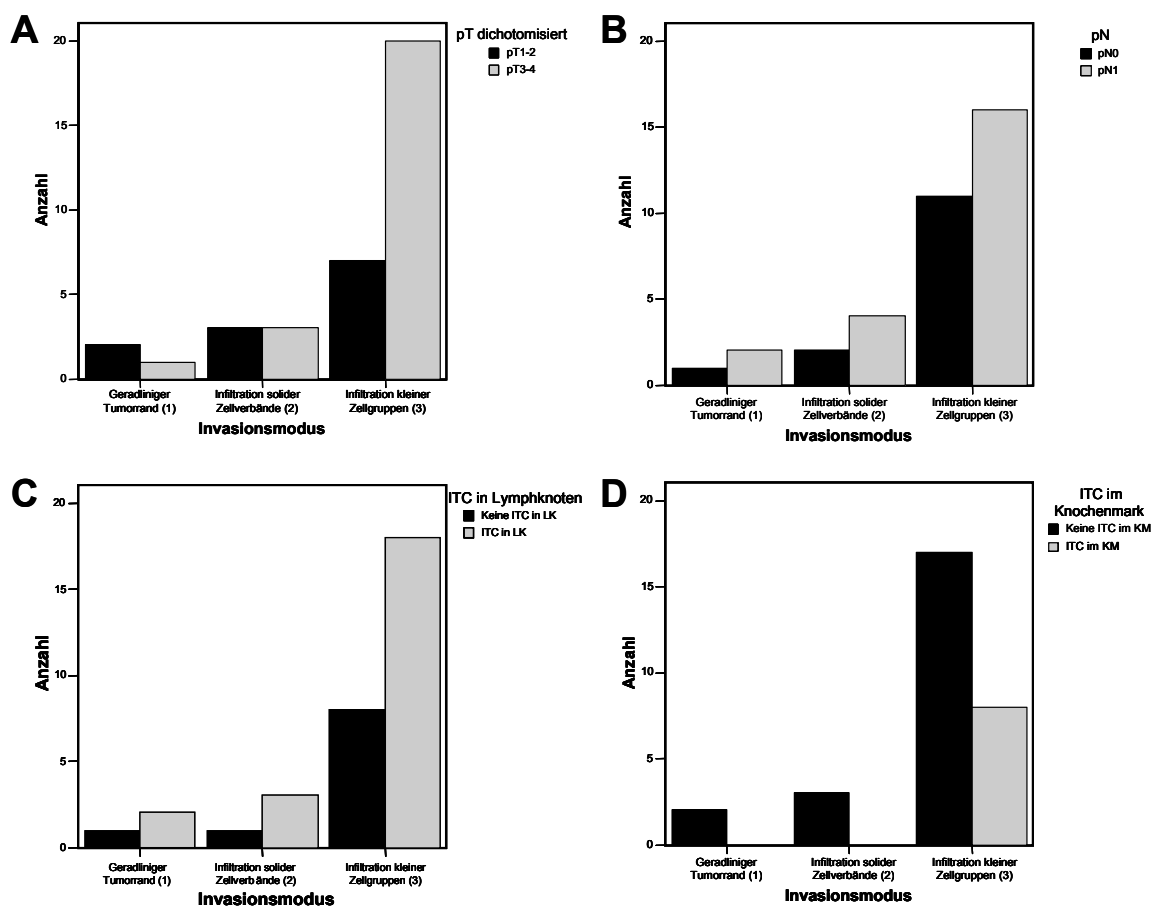


Abbildung 6. Verteilung der Invasionsmuster nach pathohistologischen Parametern. Die Zahlen in Klammern repräsentieren die *Kategorien 1–3* zur Beurteilung des Invasionsverhaltens. **(A)** Die Mehrzahl der Tumoren mit infiltrativem Wachstum in Form kleiner Zellgruppen (*Kategorie 3*) entfiel auf die Stadien pT3–4, während bei Tumoren mit geringerer zellulärer Dissoziation (*Kategorie 1* und *2*) Tumoren der Stadien pT1–2 in gleicher oder höherer Anzahl vertreten waren ($p=0,112$). **(B)** Die Lymphknotenstadien (pN) wiesen für alle Kategorien eine ähnliche Verteilung auf, wobei die Zahl der Patienten mit regionärer Lymphknotenmetastasierung (pN1) stets überwog. **(C)** In allen Kategorien waren bei der Mehrzahl der Patienten in regionären Lymphknoten (LK) isolierte Tumorzellen (ITC) nachgewiesen worden. **(D)** Der Nachweis von isolierten Tumorzellen (ITC) im Knochenmark (KM) gelang lediglich bei Patienten mit Tumoren der *Kategorie 3* ($p=0,185$).

1 Tumor (33%) der *Kategorie 1* entfiel auf das UICC Stadium IIa und 2 Tumoren (67%) auf das UICC Stadium IIb. 2 Tumoren (33%) der *Kategorie 2* wurden dem UICC Stadium I, 1 Tumor (17%) dem Stadium IIb, 2 Tumoren (33%) dem Stadium III und 1 Tumor (17%) dem Stadium IVa zugeordnet. Von den Tumoren der *Kategorie 3* entsprachen 11 Tumoren (41%) dem UICC Stadium IIa, 2 Tumoren (7%) dem Stadium IIb, 12 Tumoren (44%) dem Stadium III und 2 Tumoren (7%) dem Stadium IVb.

Bei 33 von 36 Patienten (92%) waren die histopathologisch als „tumorfrei“ beurteilten Lymphknoten immunhistochemisch auf „okkult“ disseminierte Tumorzellen untersucht worden (siehe Abschnitt 2.1). Bei der Korrelation des immunhistochemischen Lymphknotenstatus mit den Ergebnissen zur Histomorphologie zeigte sich, dass isolierte Tumorzellen in „tumorfreien“ Lymphknoten bei 2 von 3 Tumoren (67%) der *Kategorie 1*, bei 3 von 4 Tumoren (75%) der *Kategorie 2* und bei 18 von 26 Tumoren (69%) der *Kategorie 3* nachgewiesen worden waren. Zusätzlich waren intraoperativ Knochenmarksproben von 30 der 36 Patienten (83%) entnommen

und immunzytochemisch auf isolierte Tumorzellen untersucht worden. Dabei fanden sich isolierte Tumorzellen im Knochenmark bei 8 von 25 Tumoren (32%) der *Kategorie 3* (siehe Abbildung 6). Bei Patienten mit Tumoren der *Kategorien 1* und *2* wurden keine isolierten Tumorzellen in den Knochenmarksproben nachgewiesen ($p=0,185$).

Insgesamt ergaben sich bei den Korrelationen der Ergebnisse zum Invasionsverhalten mit etablierten pathohistologischen Parametern keine signifikanten Zusammenhänge.

Tabelle 13. *Invasionsverhalten und pathohistologische Parameter.*

	Invasionsmodus [*]			p-Wert ^{**}
	Kategorie 1	Kategorie 2	Kategorie 3	
Gesamtkollektiv (n=36)	3 (8%)	6 (17%)	27 (75%)	
Differenzierungsgrad				
G1	0	0	1 (4%)	NS
G2	1 (33%)	4 (67%)	21 (78%)	
G3	2 (67%)	2 (33%)	5 (18%)	
Primärtumorstadium				
pT1-2	2 (67%)	3 (50%)	7 (26%)	NS
pT3-4	1 (33%)	3 (50%)	18 (74%)	
Lymphknotenstadium				
pN0	1 (33%)	2 (33%)	11 (41%)	NS
pN1	2 (67%)	4 (67%)	16 (59%)	
Lymphknotenfernmastasen				
pM0	3 (100%)	5 (83%)	26 (96%)	NS
pM1(LYM)	0	1 (17%)	1 (4%)	
Fernmetastasen				
M0	3 (100%)	6 (100%)	25 (93%)	NS
M1	0	0	2 (7%)	
UICC-Klassifikation				
Stadium I-II	3 (100%)	3 (50%)	13 (48%)	NS
Stadium III-IV	0	3 (50%)	14 (52%)	
Isolierte Tumorzellen (ITC)				
Lymphknoten (n=33)				
N0(i-)	1 (33%)	1 (25%)	8 (31%)	NS
N0(i+)	2 (67%)	3 (75%)	18 (69%)	
Knochenmark (n=30)				
M0(i-)	2 (100%)	3 (100%)	17 (68%)	NS
M0(i+)	0	0	8 (32%)	

* Siehe Tabelle 12.

** NS: Nicht signifikant.

3.2 Integrin-Expression

Das Expressionsverhalten der α_2 -, α_3 -, α_6 -, β_1 - und β_4 -Integrin-Untereinheiten wurde mittels einer Immunfluoreszenzfärbung an 36 Primärtumoren von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus untersucht. Die Expression im Randbereich der angeschnittenen Tumorzellverbände (*Invasionsrand*) wurde getrennt von der Expression in den zentralen Tumoranteilen (*Tumorzentrum*) beurteilt. Die unmittelbar an das Normalgewebe grenzenden Zellmembranen am Invasionsrand imponierten in einem Teil der Präparate als eine kontinuierliche Linie, die sich mit ihrer Färbeintensität deutlich von der Anfärbung des übrigen Tumorgewebes abhob. Dieses Merkmal (*Grenzschicht Tumor/ECM*) wurde gesondert betrachtet. Die Integrin-Expression im Tumorgewebe wurde in jedem Schnittpräparat anhand von mindestens drei repräsentativen Ausschnitten beurteilt. Dabei wurde für die Bereiche *Grenzschicht*, *Invasionsrand* und *Tumorzentrum* jeweils die prozentuale Verteilung der Tumorzellen auf die unterschiedlichen Expressionsstärken *schwach* (+), *mäßiggradig* (++) , *stark* (+++) bzw. *keine Expression* (–) bestimmt (siehe Tabelle 11). In allen Bereichen wiesen stets über 60% der angefärbten Tumorzellen Rohintensitätswerte auf, die einer einzelnen Expressionsstärke zugeordnet werden konnten. Diese dominierende Expressionsstärke wurde dem jeweiligen Tumorbereich abschließend als Merkmal zugewiesen (siehe Tabelle 14).

Bei einem Teil der Tumoren wurde ein *polarisiertes Expressionsverhalten* mit einer intensiven Anfärbung der Tumorzellen am Invasionsrand beobachtet. Mit zunehmendem Abstand zum Normalgewebe verminderte sich die Intensität der Anfärbung, um in einigen Fällen im Zentrum der Tumorzellverbände die festgelegte Nachweisgrenze zu unterschreiten (siehe Tabelle 11). Zeigte sich für eine Integrin-Untereinheit bei mindestens 75% des Tumorgewebes das beschriebene *polarisierte Expressionsmuster*, wurde dies als Merkmal des Tumors berücksichtigt. Bei der Beurteilung der Expressionsmuster stand die visuelle Beurteilung der Schnittpräparate durch den Untersucher im Vordergrund, da sich die Unterschiede zwischen den gemessenen Färbeintensitäten der Tumorzellen im Bereich des Invasionsrandes und Intensitäten der zentralen Tumoranteile nur bei einem Teil der Tumoren in einer höheren Expressionsstärke am Invasionsrand niederschlugen. In den übrigen Präparaten mit erkennbarer Polarisierung erstreckten sich die gemessenen Rohintensitäten nicht notwendigerweise über die Bewertungsgrenzen der Expressionsstärken hinweg. Da es sich bei der Ausprägung des Expressionsmusters um ein qualitatives Merkmal handelt, wurde auch bei einer lediglich visuell erkennbaren Polarisierung in mindestens 75% des angefärbten Tumorgewebes eine Polarisierung der Expression als Merkmal des Tumors festgehalten.

Wiesen mindestens 75% der positiv angefärbten Tumorzellen entweder eine *homogene Expression* mit einheitlicher Expressionsstärke oder eine *polarisiertes Expressionsmuster* mit konstanten Expressionsstärken auf, wurde dem Tumor für die betrachtete Integrin-Untereinheit eine *einheitliche Expression* zugeschrieben. Waren die Expressionsstärken innerhalb eines geordneten Expressionsmusters uneinheitlich oder lag nur in einem begrenzten Teil des Tumorgewebes (<75%) ein geordnetes Expressionsmuster mit konstanten Expressionsstärken vor oder war jegliche Ordnung in Bezug auf Stärke und Verteilung der Expression mehrheitlich oder vollständig aufgehoben, wurde dem Tumor für die betrachtete Integrin-Untereinheit eine *heterogene Expression* zugeschrieben.

Tabelle 14. Kriterien zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung*.

Expressionsstärke	n Patienten (%)				
	+ / ++ / +++	–	+	++	+++
Epithel					
<i>Grenzschicht Epithel/BM**</i>	<i>b + c + d (%)</i>	<i>a (%)</i>	B (%)	<i>c (%)</i>	<i>d (%)</i>
Stratum basale	f + g + h (%)	e (%)	f (%)	G (%)	h (%)
Stratum spinosum	j + k + l (%)	i (%)	J (%)	k (%)	l (%)
Stratum squamosum	n + o + p (%)	M (%)	n (%)	o (%)	p (%)
Tumorgewebe					
<i>Grenzschicht Tumor/ECM**</i>	<i>b + c + d (%)</i>	<i>a (%)</i>	<i>b (%)</i>	C (%)	<i>d (%)</i>
Invasionsrand	f + g + h (%)	e (%)	F (%)	g (%)	h (%)
Tumorzentrum	j + k + l (%)	i (%)	J (%)	k (%)	l (%)
Expressionsmuster	Positiv angefärbtes Tumorgewebe (%)				
Polarität erhalten	75 – 100% mit polarisiertem Expressionsmuster				
Polarität aufgehoben	< 75% mit polarisiertem Expressionsmuster				
Einheitliche Expression	75 – 100% mit einheitlichem Expressionsmuster				
Heterogene Expression	< 75% mit einheitlichem Expressionsmuster				

* Auswertung am Beispiel eines fiktiven Schnittpräparats. Die Variablen (Buchstaben) stehen stellvertretend für die prozentuale Verteilung der positiv angefärbten Zellen in den einzelnen Epithelschichten bzw. Tumorbereichen auf die verschiedenen Expressionsstärken. Die durch **Fettdruck** hervorgehobenen Großbuchstaben repräsentieren jeweils die in einer Epithelschicht bzw. einem Tumorbereich prozentual am häufigsten vertretene und damit **dominierende Expressionsstärke**. Diese wurde dem jeweiligen Bereich abschließend als Merkmal zugeordnet.

** Konnte auf den Zelloberflächen mit direktem Kontakt zur Basalmembran (BM) bzw. ECM visuell eine verstärkte Expression abgegrenzt werden, wurde diese unabhängig von der Expression im übrigen Gewebe bewertet.

Waren im Schnittpräparat simultan Anteile normaler Ösophagusschleimhaut vorhanden, wurde auch im *Stratum basale*, *spinosum* und *squamosum* des mehrschichtigen Epithels jeweils die vorherrschende Expressionsstärke der betrachteten Integrin-Untereinheit bestimmt (siehe Tabelle 14). Die Zelloberflächen der basalständigen Keratinozyten mit direktem Kontakt zur Basalmembran imponierten in einem Teil der Präparate ebenfalls als eine kontinuierlich abgrenzbare Linie, die sich in ihrer Färbeintensität deutlich von den übrigen Zellen des Plattenepithels unterschied. Dieses Merkmal (*Grenzschicht Epithel/Basalmembran*) wurde gesondert beurteilt. So konnten bei einem Teil der Tumorproben Expressionsmuster und Expressionsstärken im Tumorgewebe unmittelbar mit dem physiologischen Expressionsverhalten von normalem Ösophagusepithel verglichen werden. In 11 von 36 Gewebepreparaten (31%) wurde ein direkter Übergang von normalem Epithel zum invasiven Karzinom beobachtet.

Die für die verschiedenen Epithelschichten und Tumorbereiche ermittelten Expressionsstärken zu jeder Integrin-Untereinheit wurden anschließend einer hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse unterzogen (siehe Abschnitt 2.4.3 und Abbildung 8). Diese Methode erlaubt zunächst eine anschauliche Darstellung der Expressionsprofile der einzelnen Tumoren im gegenseitigen Vergleich. Patienten, deren Tumoren ein ähnliches Expressionsverhalten aufweisen, werden zu Subgruppen zusammengefasst und können auf gemeinsame Merkmale hin überprüft werden. Darüber hinaus ist es möglich, die Expression einer Integrin-Untereinheit in einem bestimmten Tumorbereich für das gesamte Kollektiv zu überblicken und mit der Expression in anderen Tumorebenen oder Epithelschichten zu vergleichen.

3.2.1 α_2 -Integrin-Untereinheit

Bei der Beurteilung der Expression der α_2 -Integrin-Untereinheit konnte bei 19 von 36 Patienten (53%) simultan die Expression im Tumorgewebe und im normalen Ösophagusepithel beurteilt werden (siehe Tabelle 15). Bei der Analyse der Expressionsstärken in der Mukosa wies das Stratum basale in 17 Fällen (89%) eine schwache (+) und in 2 Fällen (11%) eine mäßiggradige Expression (++) auf. Das Stratum spinosum zeigte in 19 Fällen (100%) eine schwache Expression (+). In 6 Präparaten (32%) wurde im Stratum squamosum eine schwache Expression (+) beobachtet, während in 13 Fällen (68%) keine Expression (–) nachgewiesen wurde. Die α_2 -Expression auf den Zelloberflächen der basalständigen Keratinozyten mit direktem Kontakt zur Basalmembran hob sich nicht von der Expression der übrigen Zellen ab. In allen 19 Präparaten zeigte sich mit zunehmendem Abstand zur Basalmembran eine graduelle Abnahme der Färbeintensitäten im Sinne einer Polarisierung der α_2 -Expression im Ösophagusepithel (siehe Abbildung 7). Darüber hinaus wiesen sowohl die muskulären Gefäßwände als auch die Muskulatur in den Ösophaguswandschichten eine spezifische Anfärbung für die α_2 -Integrin-Untereinheit auf.

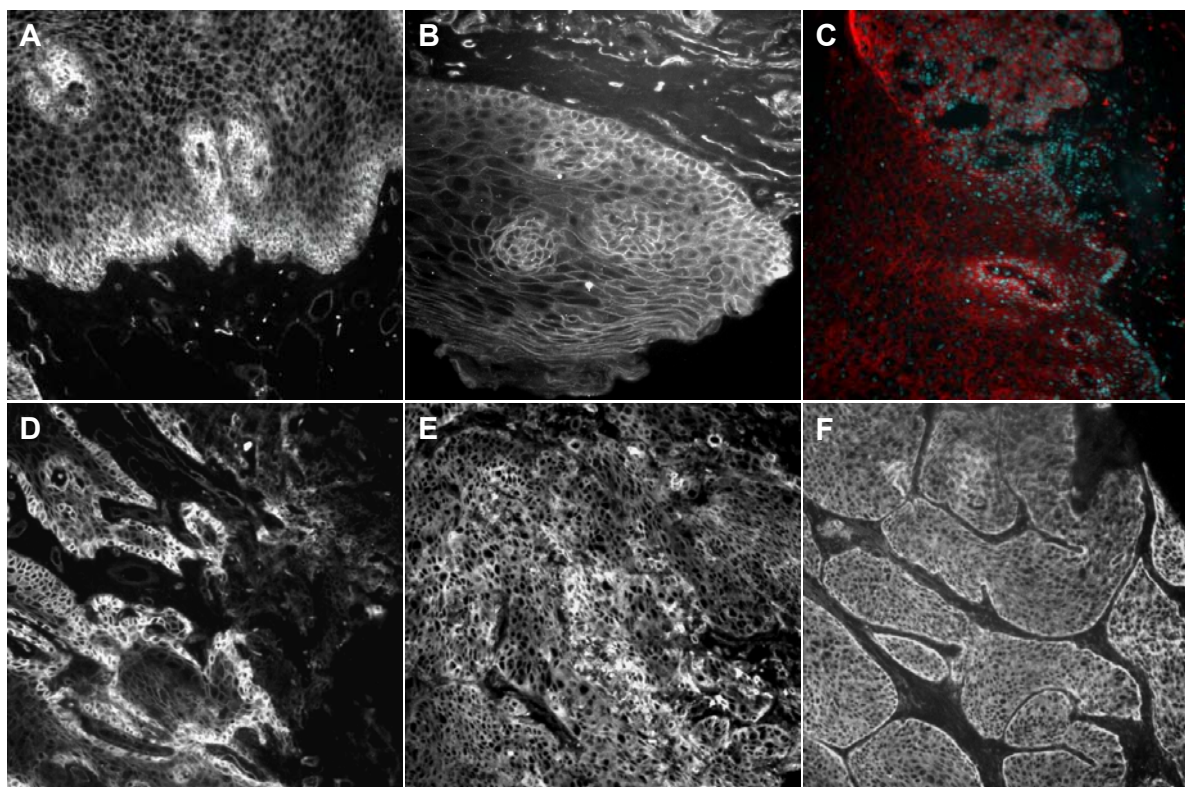


Abbildung 7. α_2 -Integrin-Expression. (A) (B) Polarisierte Expression (+) in der Ösophagasmukosa. (C) Falschfarbendarstellung: Aufhebung der polarisierten Expression (+) am Übergang von normaler Mukosa (unterer Bildabschnitt) zum invasiven Karzinom (pT1). (D) Tumorgewebe mit polarisiertem Expressionsmuster (+). Die Tumorzellen zeigen an den Invasionsrändern eine stärkere Expression als im Zentrum der Tumorzellverbände. (E) Tumorgewebe mit heterogenem Expressionsverhalten (+). (F) Tumorgewebe mit homogener, unpolarisierter Expression (+). Am unmittelbaren Übergang von Tumor- zum Normalgewebe heben sich die Zellmembranen mit einer stärkeren Expression von den übrigen Tumorzellen ab (*Grenzschicht Tumor/ECM*).

Im Tumorgewebe wurde die α_2 -Untereinheit von 35 der 36 Tumoren (97%) exprimiert. Die Bewertung der α_2 -Expressionsstärken ergab an den Invasionsrändern in 28 Präparaten (78%) eine schwache (+), in 5 Präparaten (14%) eine mäßiggradige (++) und in 2 Präparaten (5%) eine starke Expression (+++). 1 Primärtumor (3%) zeigte weder am Invasionsrand noch im Tumorzentrum eine Anfärbung (–) für die α_2 -Untereinheit. In 2 Präparaten (5%) hob sich eine *Grenzschicht Tumor/ECM* mit einer schwachen (+), in 1 Präparat (3%) mit einer mäßiggradigen Expression (++) vom übrigen Tumorgewebe ab

Bei der Beurteilung der Schnittpräparate im Hinblick auf die im Epithel beobachtete Polarisierung der α_2 -Expression zeigte sich, dass diese bei 5 Tumoren (14%) erhalten und in 31 Fällen (86%) aufgehoben war. 13 Tumoren (36%) wiesen ein einheitliches Expressionsmuster auf, worunter sich 9 Tumoren (25%) mit homogener Expression befanden. Bei 22 Patienten (61%) zeigte sich eine heterogene α_2 -Expression (siehe Abbildung 7).

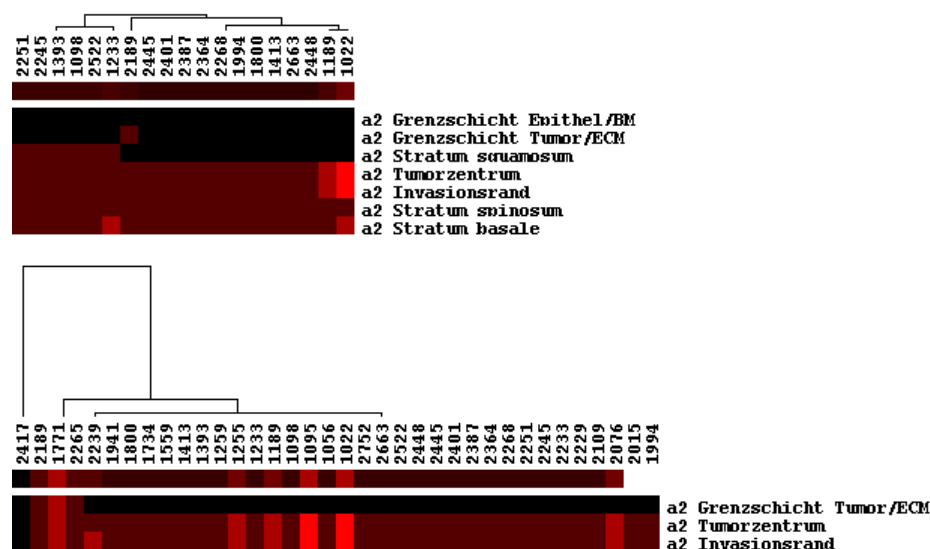


Abbildung 8. Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse der α_2 -Integrin-Expression. Dargestellt sind die Expressionsprofile der Primärtumoren, die mit ihrer Patientenidentifikationsnummer spaltenweise aufgereiht sind. Hellrote Quadrate repräsentieren eine starke (+++), mittelrote Quadrate eine mäßiggradige (++) und dunkelrote Quadrate eine schwache Expressionsstärke (+). Bereiche, die keine Expression aufwiesen (–), sind als schwarzes Quadrat dargestellt. Die Verteilung der Expressionsstärken in den verschiedenen Gewebearealen (*Grenzschicht Epithel/BM*, *Stratum basale*, *spinosum* und *squamosum*; *Grenzschicht Tumor/ECM*, *Invasionsrand*, *Tumorzentrum*) ist zeilenweise gruppiert. **Jede Spalte beschreibt das Expressionsprofil eines Gewebepreparats, jede Zeile stellt die Verteilung der Expressionsstärken innerhalb einer Epithelschicht bzw. eines Tumorbereichs dar.** Benachbarte Zeilen weisen eine ähnliche Verteilung der Expressionsstärken auf. Gleichermäßen besitzen Patienten ein ähnliches Expressionsprofil, wenn sie nebeneinander angeordnet sind. Hob sich die Expression am direkten Übergang zum Normalgewebe als *Grenzschicht* von der Expression im übrigen Epithel bzw. Tumorgewebe ab, wurde die dort vorherrschende Expressionsstärke festgehalten. Ein schwarzes Quadrat impliziert hier, dass *keine Grenzschicht* beobachtet wurde. Über den Patientenidentifikationsnummern ist ein Baumdiagramm (*Dendrogramm*) abgebildet, welches die Tumorproben nach der Ähnlichkeit ihres Expressionsverhaltens zu Subgruppen (*Clustern*) zusammenfasst. Benachbarte Proben sind einander ähnlicher als weiter voneinander entfernt angeordnete. Je kürzer eine Verästelung im Dendrogramm ist, desto größer ist die Ähnlichkeit zwischen den verbundenen Proben bzw. Clustern. **Oberes Diagramm:** Expressionsprofile von 19 Primärtumoren, die Anteile normaler Ösophagasmukosa enthielten. **Unteres Diagramm:** Expressionsprofile von 36 Primärtumoren. 34 Tumoren (94%) wiesen am Invasionsrand und im Tumorzentrum die gleichen Expressionsstärken auf. Bei 8% (3/36) zeigte sich am Übergang vom Tumor zum Normalgewebe (*Grenzschicht Tumor/ECM*) eine verstärkte Expression. Bei 1 Tumor wurde keine Expression nachgewiesen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Tabelle 15. α_2 -Integrin-Expression in Ösophagasmukosa und Tumorgewebe*.

Expressionsstärken	n Patienten (%)				
	+/++/+++	–	+	++	+++
Epithel (n=19)					
<i>Grenzschicht Epithel/BM**</i>	0	19 (100%)	0	0	0
Stratum basale	19 (100%)	0	17 (89%)	2 (11%)	0
Stratum spinosum	19 (100%)	0	19 (100%)	0	0
Stratum squamosum	6 (32%)	13 (68%)	6 (32%)	0	0
Tumorgewebe (n=36)					
<i>Grenzschicht Tumor/ECM**</i>	3 (8%)	33 (92%)	2 (5%)	1 (3%)	0
Invasionsrand	35 (97%)	1 (3%)	28 (78%)	5 (14%)	2 (5%)
Tumorzentrum	35 (97%)	1 (3%)	29 (81%)	4 (11%)	2 (5%)
Expressionsmuster (n=36)					
n Patienten (%)					
Polarität erhalten	5 (14%)				
Polarität aufgehoben	31 (86%)				
Einheitliche Expression	14 (39%)				
Heterogene Expression	22 (61%)				

* Die **dominierende Expressionsstärke** in einer Epithelschicht bzw. in einem Tumorbereich ist durch **Fettdruck** hervorgehoben.

** Konnte auf den Zelloberflächen mit direktem Kontakt zur Basalmembran (BM) bzw. ECM visuell eine verstärkte Expression abgegrenzt werden, wurde diese unabhängig von der Expression im übrigen Gewebe bewertet.

3.2.2 α_3 -Integrin-Untereinheit

In 18 von 36 Tumorgewebepreparaten (50%) konnte simultan die Expression der α_3 -Integrin-Untereinheit im Tumorgewebe und im normalen Epithel beurteilt werden (siehe Tabelle 16). Das Stratum basale wies bei 15 von 18 Patienten (83%) eine schwache (+) und bei 2 Patienten (11%) eine mäßiggradige Expression (++) auf. Das Stratum spinosum zeigte in 15 Fällen (83%) eine schwache Expression (+), während in 3 Fällen (17%) keine Expression (–) nachgewiesen wurde. Im Stratum squamosum von 2 Präparaten (11%) wurde eine schwache Expression (+) beobachtet, während in 16 Präparaten (89%) keine α_3 -Expression (–) nachgewiesen wurde. In 12 Fällen (66%) hob sich eine *Grenzschicht Epithel/Basalmembran* mit einer schwachen (+) und in 3 Fällen (17%) mit einer mäßiggradigen Expression (++) von den übrigen Keratinozyten ab. In 3 Fällen (17%) grenzten sich die der Basalmembran anliegenden Zelloberflächen nicht mit einer verstärkten Expression vom übrigen Stratum basale ab. In allen 18 Präparaten zeigte sich analog zur α_2 -Untereinheit eine Polarisierung der α_3 -Expression (siehe Abbildung 9). Darüber hinaus zeigten sowohl die Muskulatur in den Ösophaguswandschichten als auch die muskulären Gefäßwände eine spezifische Anfärbung für die α_3 -Integrin-Untereinheit.

Die α_3 -Untereinheit wurde von 35 der 36 Tumoren (97%) exprimiert. Die Bewertung der Expressionsstärken an den Invasionsrändern ergab bei 25 Tumoren (69%) eine schwache (+), bei 9 Tumoren (25%) eine mäßiggradige (++) und bei 1 Tumor (3%) eine starke Expression (+++). 1 Tumor (3%) zeigte weder am Invasionsrand noch im Tumorzentrum eine Anfärbung (–). In den zentralen Tumoranteilen (*Tumorzentrum*) wiesen 26 Patienten (72%) eine schwache (+) und 5 Patienten (14%) eine mäßiggradige Expression (++) auf.

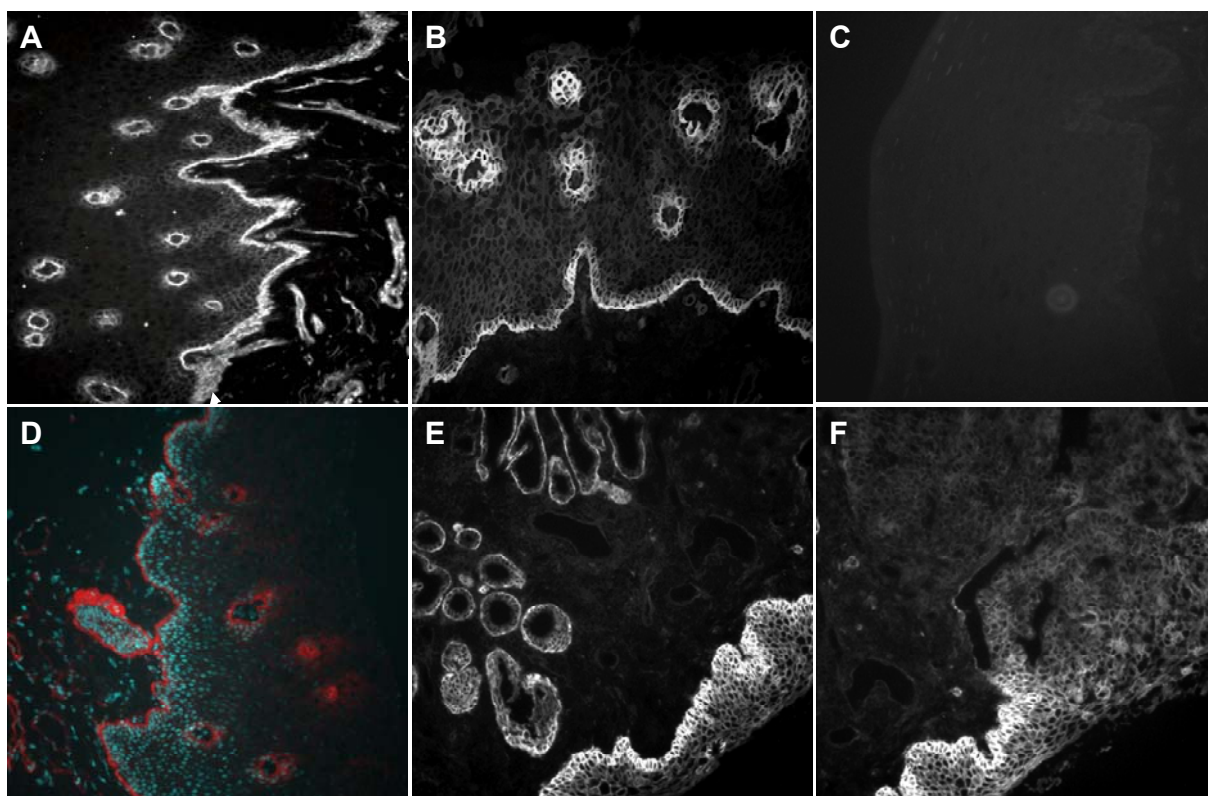


Abbildung 9. α_3 -Integrin-Expression. (A) Polarisierte Expression (+) in der Ösophagasmukosa. Am rechten Bildrand ist die Muskulatur von Gefäßwänden spezifisch angefärbt (++). (B) Polarisierte Expression (++) in der Ösophagasmukosa. (C) Kein Fluoreszenzsignal (-) bei Verwendung der IgG₁-Isotypkontrolle (MOPC21) anstelle des Primärantikörpers. (D) Falschfarbendarstellung: Polarisierte Expression (rot) in der Ösophagasmukosa (+). Überlagerung der DAPI-gefärbten Kernstrukturen (blau). (E) (F) Aufhebung der polarisierten Expression (+) am Übergang von normaler Mukosa zum invasiven Karzinom. (A) (B) (D) Die an die Basalmembran grenzenden Zelloberflächen zeichnen sich deutlich als kontinuierliche Linie vom Stratum basale ab (*Grenzschicht Epithel/Basalmembran*).

Bei 5 Patienten (14%) fand sich keine Expression im Tumorzentrum (-). In 6 Präparaten (17%) hob sich eine *Grenzschicht Tumor/ECM* mit einer schwachen (+), in 3 Präparaten (8%) mit einer mäßiggradigen Expression (++) von der Expression auf den übrigen Zellen ab. Bei 27 Patienten (75%) konnte keine verstärkte Expression (-) abgegrenzt werden.

Bei der Beurteilung der Polarisierung zeigte sich, dass bei 14 von 36 Tumoren (39%) eine polarisierte Expression erhalten war, während die übrigen 22 Tumoren (61%) keine Polarisierung aufwiesen. 15 von 36 Tumoren (42%) wiesen ein einheitliches Expressionsmuster auf, worunter sich 4 Tumoren (11%) mit einer homogenen Expression befanden. Bei 21 Patienten (58%) zeigte sich eine heterogene α_3 -Expression (siehe Abbildung 10).

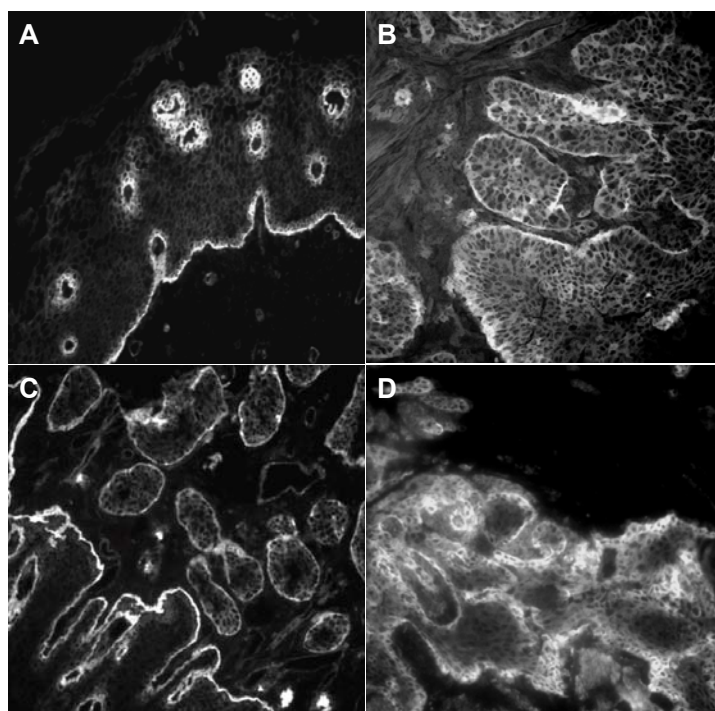


Abbildung 10. α_3 -Integrin-Expression. (A) Polarisierte Expression in der Mukosa und (B) Tumorgewebe mit aufgehobener Polarisierung im selben Präparat. Am Übergang vom Epithel bzw. Tumorgewebe zur ECM zeichnen sich die Zelloberflächen mit einer mäßiggradigen Expression (++) von den übrigen Tumorzellen ab. (C) Tumorgewebe mit erhaltener Polarisierung. Die an das Normalgewebe grenzenden Zellmembranen zeichnen sich mit einer verstärkten Expression (++) deutlich von der Expression im übrigen Tumorgewebe ab. (D) Heterogene Expression mit z. T. erhaltener Polarität.

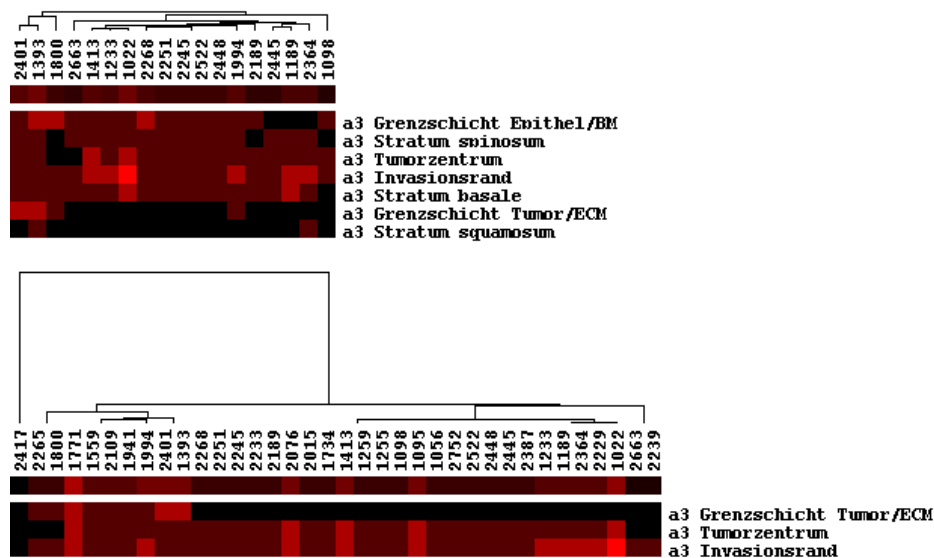


Abbildung 11. α_3 -Integrin-Expression: Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse der Primärtumoren (Erläuterung siehe Abbildung 8). **Oberes Diagramm:** Expressionsverhalten von 18 Tumorproben, die Anteile normaler Ösophagismukosa enthielten. In 15 Präparaten (83%) ließ sich eine *Grenzschrift Epithel/Basalmembran* diskriminieren, wohingegen sich bei lediglich 4 Tumoren (22%) eine *Grenzschrift Tumor/ECM* abhob. **Unteres Diagramm:** Expressionsprofile von 36 Primärtumoren. 10 Tumoren (28%) zeigten am *Invasionsrand* eine höhere Expressionsstärke als im *Tumorzentrum*. Bei 9 Tumoren (25%) hob sich eine *Grenzschrift Tumor/ECM* von der α_3 -Expression im übrigen Tumorgewebe ab. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Tabelle 16. α_3 -Integrin-Expression in Ösophagismukosa und Tumorgewebe*.

Expressionsstärken	n Patienten (%)				
	+/++/+++	–	+	++	+++
Epithel (n=18)					
<i>Grenzschicht Epithel/BM**</i>	15 (83%)	3 (17%)	12 (66%)	3 (17%)	0
Stratum basale	17 (94%)	1 (6%)	15 (83%)	2 (11%)	0
Stratum spinosum	15 (83%)	3 (17%)	15 (83%)	0	0
Stratum squamosum	2 (11%)	16 (89%)	2 (11%)	0	0
Tumorgewebe (n=36)					
<i>Grenzschicht Tumor/ECM**</i>	9 (25%)	27 (75%)	6 (17%)	3 (8%)	0
Invasionsrand	35 (97%)	1 (3%)	25 (69%)	9 (25%)	1 (3%)
Tumorzentrum	31 (86%)	5 (14%)	26 (72%)	5 (14%)	0
Expressionsmuster (n=36)					
n Patienten (%)					
Polarität erhalten	14 (39%)				
Polarität aufgehoben	22 (61%)				
Einheitliche Expression	15 (42%)				
Heterogene Expression	21 (58%)				

* Die **dominierende Expressionsstärke** in einer Epithelschicht bzw. in einem Tumorbereich ist durch **Fettdruck** hervorgehoben.

** Konnte auf den Zelloberflächen mit direktem Kontakt zur Basalmembran (BM) bzw. ECM visuell eine verstärkte Expression abgegrenzt werden, wurde diese unabhängig von der Expression im übrigen Gewebe bewertet.

3.2.3 α_6 -Integrin-Untereinheit

In 19 von 36 Präparaten (53%) konnte simultan die Expression der α_6 -Integrin-Untereinheit im Tumorgewebe und im normalen Epithel beurteilt werden (siehe Tabelle 17). Das Stratum basale zeigte bei 14 von 19 Patienten (74%) eine schwache (+), bei 4 Patienten (21%) eine mäßiggradige (++) und bei 1 Patienten (5%) eine starke Expression (+++). Das Stratum spinosum wies in 17 Fällen (90%) eine schwache Expression (+) und in 1 Fall (5%) eine starke Expression (+++) auf, während bei 1 Patienten (5%) keine Expression (–) nachgewiesen wurde. Im Stratum squamosum wurde in 1 Fall (5%) eine schwache (+) und in 1 Fall (5%) eine mäßiggradige Expression (++) festgestellt. Bei 17 Patienten (89%) zeigte sich keine Expression (–). In allen Gewebeproben hob sich eine *Grenzschicht Epithel/Basalmembran* vom übrigen Epithel ab: 1 Präparat (5%) wies eine schwache α_6 -Expression (+) auf, 5 Präparate (26%) zeigten eine mäßiggradige (++) und 13 Präparate (68%) eine starke Expression (+++). In allen 19 Gewebeproben zeigte sich für die α_6 -Untereinheit eine polarisierte Expression im Epithel, wie sie auch bei den beiden anderen untersuchten α -Untereinheiten beobachtet wurde. Das im submukösen Bindegewebe verlaufende Nervengewebe wies eine spezifische Anfärbung für die α_6 -Integrin-Untereinheit auf. Des Weiteren war eine Expression auf den Gefäßendothelien zu beobachten (siehe Abbildung 12).

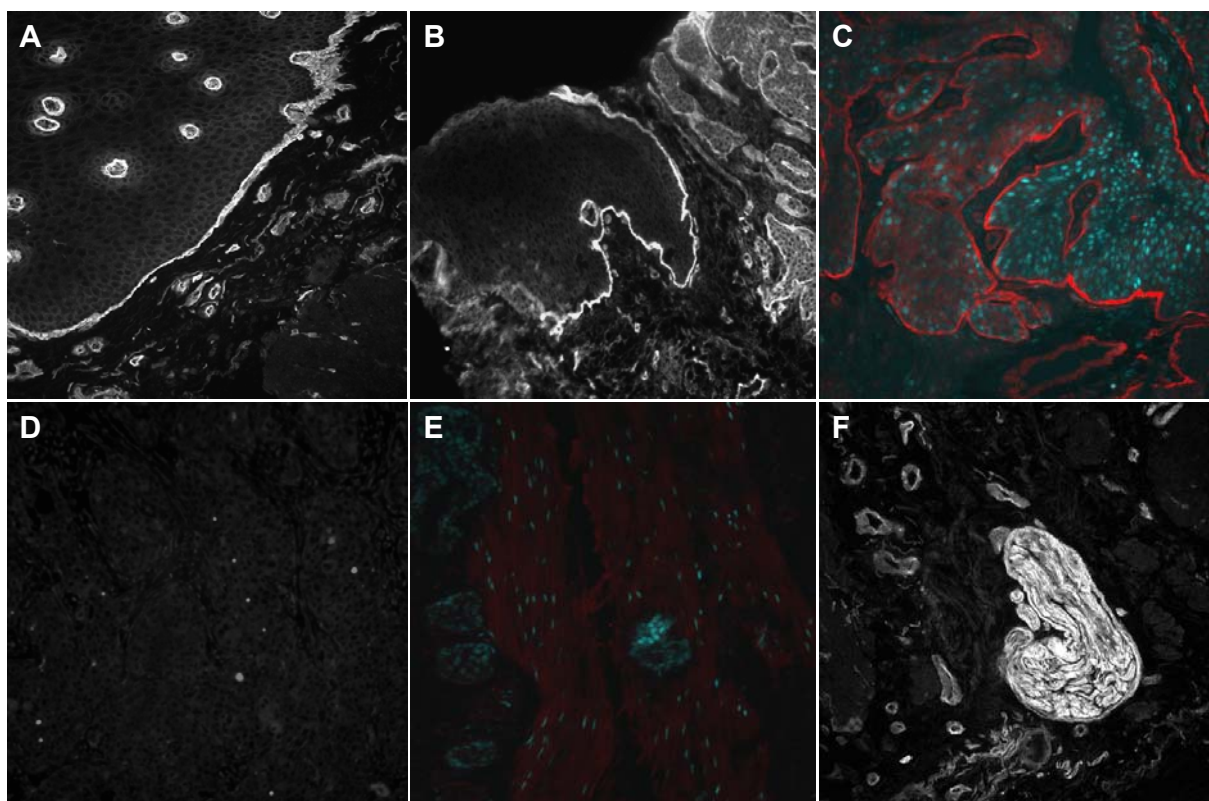


Abbildung 12. α_6 -Integrin-Expression. (A) Polarisierte Expression in der Ösophagusmukosa. Am Übergang vom Epithel zum Bindegewebe zeichnet sich eine kontinuierliche Linie mit starker Expression (+++) ab. (B) Mukosa mit polarisierter Expression und Tumorgewebe mit unpolarisierter, homogener Expression im selben Präparat. An den jeweiligen Grenzflächen von Epithel und Tumorgewebe zum angrenzenden Gewebe findet sich eine starke α_6 -Expression (+++). (C) Falschfarbendarstellung: α_6 -Integrin-Expression (rot) mit Überlagerung der Kernstrukturen (blau). (D) Kein Fluoreszenzsignal im Tumorgewebe bei Verwendung der IgG_{2a}-Isotypkontrolle anstelle des Primärantikörpers. (E) Falschfarbendarstellung: Kein Fluoreszenzsignal in den Tumorzellinseln bei Verwendung der IgG_{2a}-Isotypkontrolle. Einblendung der Kernstrukturen (blau). Von der Muskulatur geht eine schwache Autofluoreszenz aus (-). (F) Spezifische Anfärbung von Nervengewebe (+++) und Gefäßwänden (++) in der Tela submucosa.

Die α_6 -Untereinheit wurde von allen 36 Tumoren (100%) exprimiert. Die Bewertung der Expressionsstärken an den Invasionsrändern ergab bei 20 Tumoren (56%) eine schwache (+), bei 12 Tumoren (33%) eine mäßiggradige (++) und bei 4 Tumoren (11%) eine starke Expression (+++). Die Expression in den zentralen Tumoranteilen (*Tumorzentrum*) war bei 24 Patienten (67%) schwach (+), bei 9 Patienten (25%) mäßiggradig (++) und bei 3 Patienten (8%) stark (+++) ausgeprägt. Bei 35 Patienten (97%) zeichnete sich eine *Grenzschicht Tumor/ECM* ab, die in 4 Präparaten (11%) eine schwache (+), in 12 Präparaten (33%) eine mäßiggradige (++) und in 19 Präparaten (53%) eine starke Expression (+++) aufwies (siehe Abbildung 13). In einem Fall (3%) konnte keine verstärkte Expression (-) von der Expression im übrigen Tumorgewebe abgegrenzt werden.

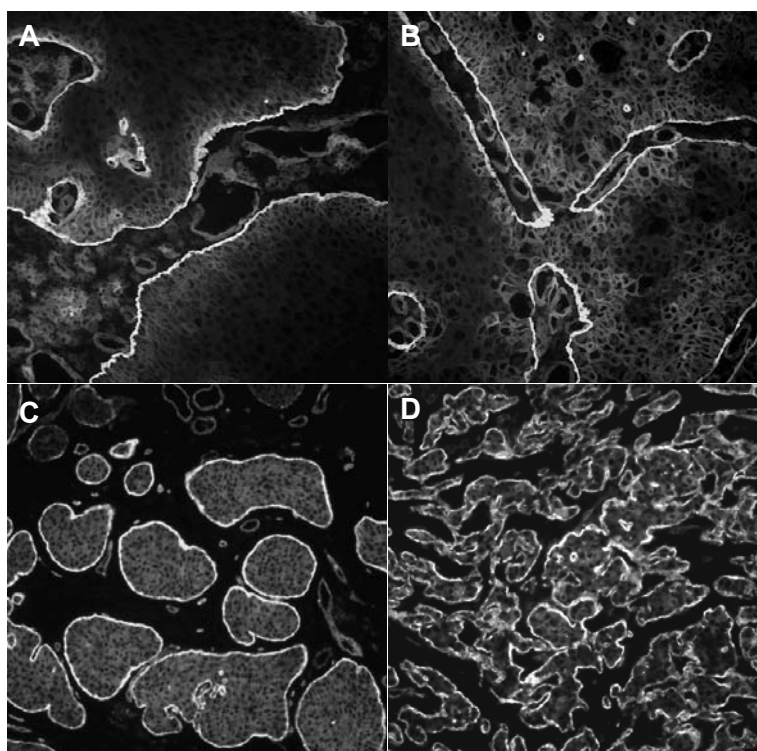


Abbildung 13. α_6 -Integrin-Expression. (A) (B) Polarisierte, mäßiggradige Expression (++) am Invasionsrand und schwache Expression (+) in den zentralen Tumoranteilen. Die Zelloberflächen mit Kontakt zur ECM (*Grenzschicht Tumor/ECM*) heben sich mit einer starken Expression (+++) deutlich von den übrigen Tumorzellen ab. (C) (D) Homogene, schwache Expression (+) bei aufgehobener Polarisierung. Die Zelloberflächen mit Kontakt zur ECM (*Grenzschicht Tumor/ECM*) heben sich mit einer mäßiggradigen bis starken Expression (++) deutlich von den übrigen Tumorzellen ab.

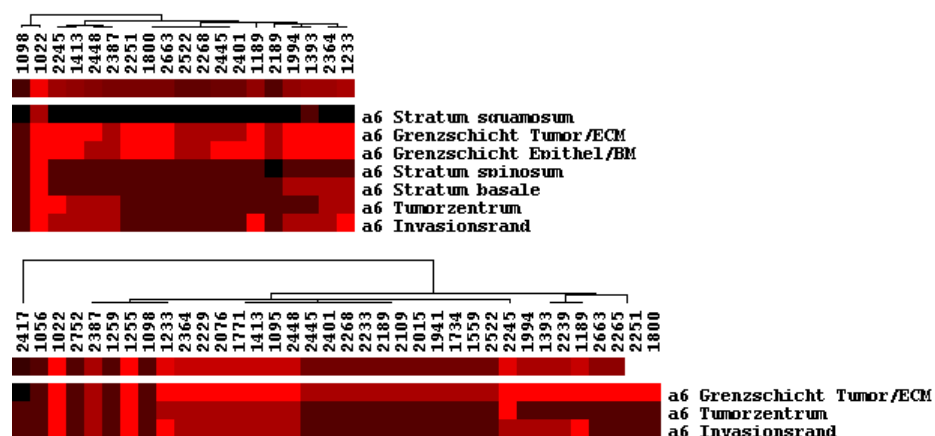


Abbildung 14. α_6 -Integrin-Expression: Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse der Primärtumoren (Erläuterung siehe Abbildung 8). **Oberes Diagramm:** Expressionsverhalten von 19 Tumorproben, die Anteile normaler Ösophagusmukosa enthielten. In allen Präparaten hob sich die Expression an den Übergängen zum umgebenden Gewebe mit einer *Grenzschicht* ab. In 16 Tumoren (84%) stimmten die Expressionsstärken der *Grenzschichten Epithel/Basalmembran* und *Tumor/ECM* überein. **Unteres Diagramm:** Expressionsprofile von 36 Primärtumoren. 30 der 36 Tumoren (83%) wiesen an den Invasionsrändern und in den zentralen Tumoranteilen (*Tumorzentrum*) die gleichen Expressionsstärken auf. In 35 Tumoren (97%) wurde eine *Grenzschicht Tumor/ECM* beobachtet. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Bei der Beurteilung des Expressionsverhaltens im Tumorgewebe zeigten 10 Tumoren (28%) eine Polarisierung der α_6 -Expression, welche derjenigen des Epithels ähnelte (siehe Abbildung 13). In 26 Fällen (72%) wurde keine Polarisierung festgestellt. 21 Patienten (58%) zeigten ein einheitliches Expressionsmuster, während 15 Patienten (42%) eine heterogene α_6 -Expression aufwiesen. 12 Patienten (33%) mit einheitlichem Expressionsmuster zeigten eine homogene Expression der α_6 -Untereinheit.

Tabelle 17. α_6 -Integrin-Expression in Ösophagasmukosa und Tumorgewebe*.

Expressionsstärken	n Patienten (%)				
	+/++/+++	–	+	++	+++
Epithel (n=19)					
Grenzschicht Epithel/BM**	19 (100%)	0	1 (5%)	5 (26%)	13 (69%)
Stratum basale	19 (100%)	0	14 (74%)	4 (21%)	1 (5%)
Stratum spinosum	18 (95%)	1 (5%)	17 (90%)	0	1 (5%)
Stratum squamosum	2 (11%)	17 (90%)	1 (5%)	1 (5%)	0
Tumorgewebe (n=36)					
Grenzschicht Tumor/ECM**	35 (97%)	1 (3%)	4 (11%)	12 (33%)	19 (53%)
Invasionsrand	36 (100%)	0	20 (56%)	12 (33%)	4 (11%)
Tumorzentrum	36 (100%)	0	24 (67%)	9 (25%)	3 (8%)
Expressionsmuster (n=36)					
Polarität erhalten	10 (28%)				
Polarität aufgehoben	26 (72%)				
Einheitliche Expression	21 (58%)				
Heterogene Expression	15 (42%)				

* Die **dominierende Expressionsstärke** in einer Epithelschicht bzw. in einem Tumorbereich ist durch **Fettdruck** hervorgehoben.

** Konnte auf den Zelloberflächen mit direktem Kontakt zur Basalmembran (BM) bzw. ECM visuell eine verstärkte Expression abgegrenzt werden, wurde diese unabhängig von der Expression im übrigen Gewebe bewertet.

3.2.4 β_1 -Integrin-Untereinheit

Bei 16 von 30 bewerteten Präparaten (53%) konnte die Expression der β_1 -Integrin-Untereinheit simultan im Tumorgewebe und im normalen Ösophagusepithel beurteilt werden (siehe Tabelle 18). In 14 Fällen (88%) zeigte das Stratum basale eine schwache (+) und in 1 Fall (6%) eine mäßiggradige Expression (++). In 1 Präparat wurde – abgesehen von der Grenzschicht Epithel/Basalmembran – keine β_1 -Expression (–) im Epithel nachgewiesen. Das Stratum spinosum zeigte in 15 Fällen (94%) eine schwache Expression (+). In 2 Präparaten (12%) wurde im Stratum squamosum eine schwache Anfärbung (+) beobachtet, während in 14 Fällen (88%) keine Expression (–) nachgewiesen wurde. In 6 Präparaten (38%) ließ sich eine Grenzschicht Epithel/Basalmembran mit einer schwachen (+) und in 1 Präparat mit einer mäßiggradigen Expression (++) abgrenzen. In 9 Fällen (56%) war keine Grenzschicht (–) auszumachen, die sich mit einer verstärkten Expression vom übrigen Epithel abgehoben hätte. Wie bei der Expression der α -Untereinheiten wurde in allen 16 Präparaten eine Polarisierung der β_1 -Expression beobachtet

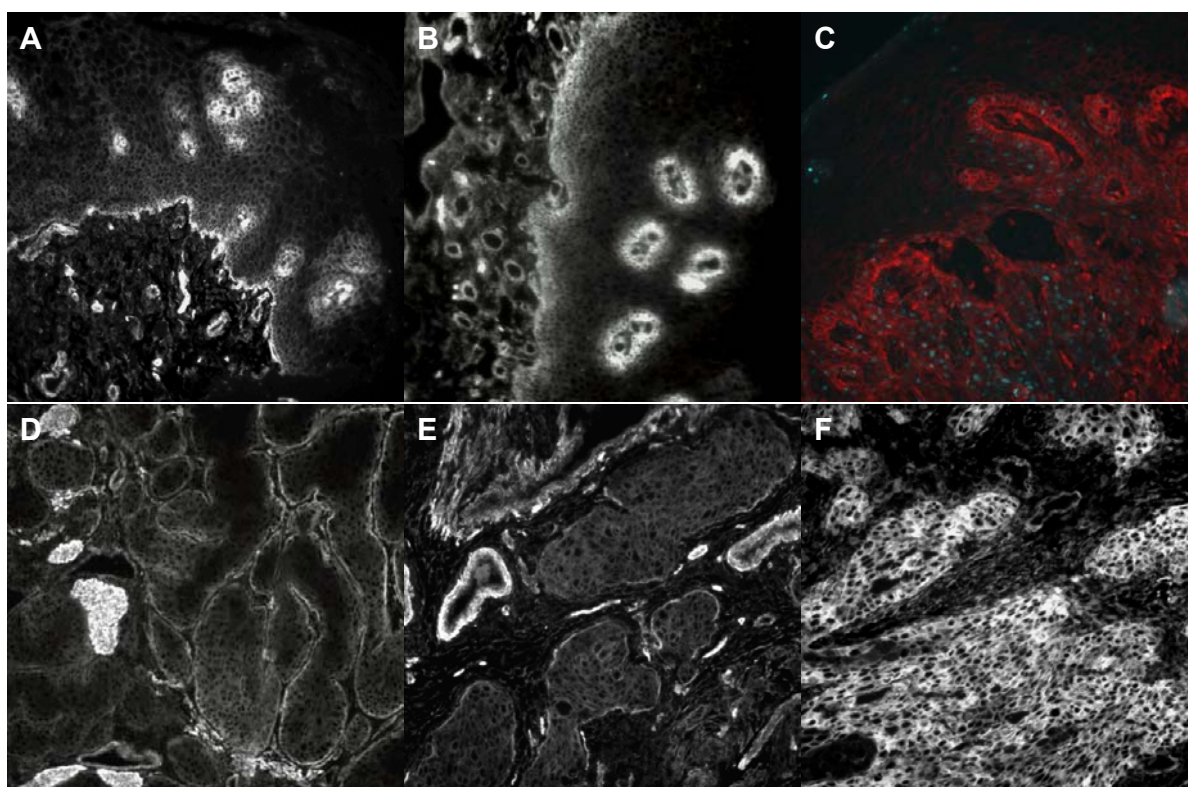


Abbildung 15. β_1 -Integrin-Expression. (A) (B) Polarisierte schwache Expression (+) im Epithel. (C) Falschfarbendarstellung: Übergang vom Epithel zum Tumorgewebe. (D) Polarisierte Expression im Tumorgewebe. (E) Fehlende Polarisierung der Expression. Schwache Expression im Tumorgewebe (+), mäßiggradige bis starke Expression auf Myozyten (++) / (+++). (F) Heterogene, mäßiggradige Expression (++) im Tumorgewebe. (D) (E) Schwache Expression im Tumorgewebe (+), mäßiggradige Expression (++) an den zum angrenzenden Gewebe weisenden Zelloberflächen (Grenzschicht Tumor/ECM).

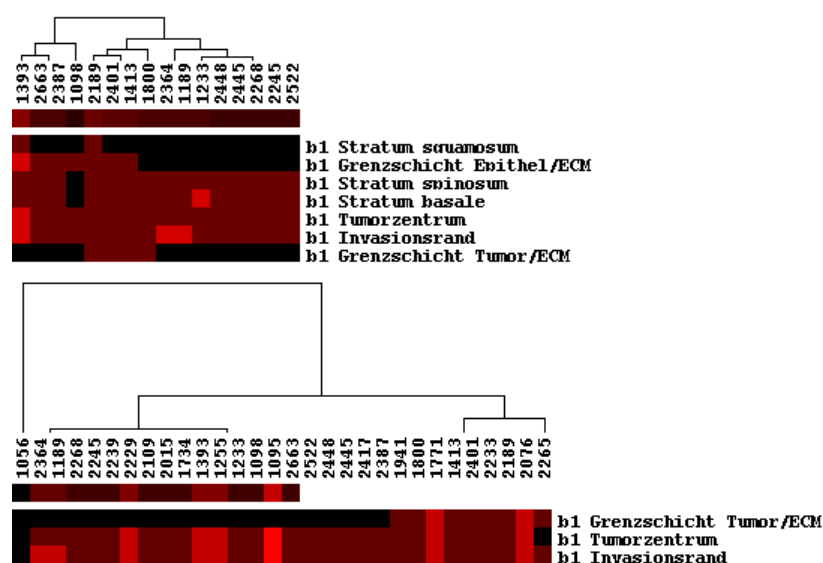


Abbildung 16. β_1 -Integrin-Expression: Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse der Primärtumoren (Erläuterung siehe Abbildung 8). **Oberes Diagramm:** Expressionsverhalten von 16 Tumorproben, die Anteile normaler Ösophagasmukosa enthielten. **Unteres Diagramm:** Expressionsprofile von 30 Primärtumoren. 26 Tumoren (87%) wiesen im gesamten Tumorgewebe eine einheitliche Expressionsstärke auf. Weitere Erläuterungen siehe Text.

(siehe Abbildung 15). Darüber hinaus wies das Bindegewebe eine diffuse schwache Anfärbung (+) für die β_1 -Untereinheit auf, die sich nur geringfügig über der Nachweisgrenze bewegte (siehe Tabelle 11). Sowohl die Muskulatur in den Ösophaguswandschichten als auch die muskulären Gefäßwände zeigten eine schwache bis starke Expression der β_1 -Untereinheit (+/++/+++).

Die β_1 -Untereinheit wurde von 29 der 30 Tumoren (97%) exprimiert. Bei der Bewertung der Expressionsstärken im Tumorgewebe zeigten 21 von 30 (70%) Tumoren an den Invasionsrändern eine schwache (+), 7 (23%) eine mäßiggradige (++) und 1 Tumor (3%) eine starke Expression (+++). Die Expression in den zentralen Tumoranteilen (*Tumorzentrum*) war bei 22 Patienten (73%) schwach (+), bei 5 Patienten (17%) mäßiggradig (++) und bei 1 Patienten (3%) stark ausgeprägt (+++). 1 Patient (3%) wies keine β_1 -Expression (-) im *Tumorzentrum* auf und in 1 Präparat (3%) wurde im gesamten Tumorgewebe keine Expression (-) nachgewiesen. In 7 Präparaten (23%) hob sich eine *Grenzschicht Tumor/ECM* mit einer schwachen (+) und in 2 Präparaten (7%) mit einer mäßiggradigen Expression (++) von der Expression auf den übrigen Zellen ab. Bei 21 Patienten (70%) konnte keine verstärkte Expression abgegrenzt werden.

Bei der Beurteilung der Expressionsmuster im Tumorgewebe wiesen 6 Tumoren (20%) eine polarisierte β_1 -Expression auf (siehe Abbildung 16). In den übrigen 24 Fällen (80%) wurde keine Polarisierung beobachtet. 15 Patienten (50%) zeigten ein einheitliches Expressionsmuster, während 15 Patienten (50%) eine heterogene Expression aufwiesen. 10 von 30 Präparaten (33%) wiesen eine homogene Expression der α_6 -Untereinheit auf.

Tabelle 18. β_1 -Integrin-Expression in Ösophagismukosa und Tumorgewebe*.

Expressionsstärken	n Patienten (%)				
	+/++/+++	–	+	++	+++
Epithel (n=16)					
<i>Grenzschicht Epithel/BM**</i>	7 (44%)	9 (56%)	6 (38%)	1 (6%)	0
Stratum basale	15 (94%)	1 (6%)	14 (88%)	1 (6%)	0
Stratum spinosum	15 (94%)	1 (6%)	15 (94%)	0	0
Stratum squamosum	2 (12%)	14 (88%)	2 (12%)	0	0
Tumorgewebe (n=30)					
<i>Grenzschicht Tumor/ECM**</i>	9 (30%)	21 (70%)	7 (23%)	2 (7%)	0
Invasionsrand	29 (97%)	1 (3%)	21 (70%)	7 (23%)	1 (3%)
Tumorzentrum	28 (93%)	2 (7%)	22 (73%)	5 (17%)	1 (3%)
Expressionsmuster (n=30)					
n Patienten (%)					
Polarität erhalten	6 (20%)				
Polarität aufgehoben	24 (80%)				
Einheitliche Expression	15 (50%)				
Heterogene Expression	15 (50%)				

* Die **dominierende Expressionsstärke** in einer Epithelschicht bzw. in einem Tumorbereich ist durch **Fettdruck** hervorgehoben.

** Konnte auf den Zelloberflächen mit direktem Kontakt zur Basalmembran (BM) bzw. ECM visuell eine verstärkte Expression abgegrenzt werden, wurde diese unabhängig von der Expression im übrigen Gewebe bewertet.

3.2.5 β_4 -Integrin-Untereinheit

Die Beurteilung der Expression der β_4 -Untereinheit gestaltete sich dahingehend problematisch, dass die Färbeintensitäten in einigen Fällen nur geringfügig über bzw. unter der Nachweisgrenze lagen (siehe Tabelle 11). Ergab sich für den überwiegenden Teil eines Bereichs eine β_4 -Expression unterhalb der Nachweisgrenze, wurde dieser als *nicht exprimierend* (-) gewertet.

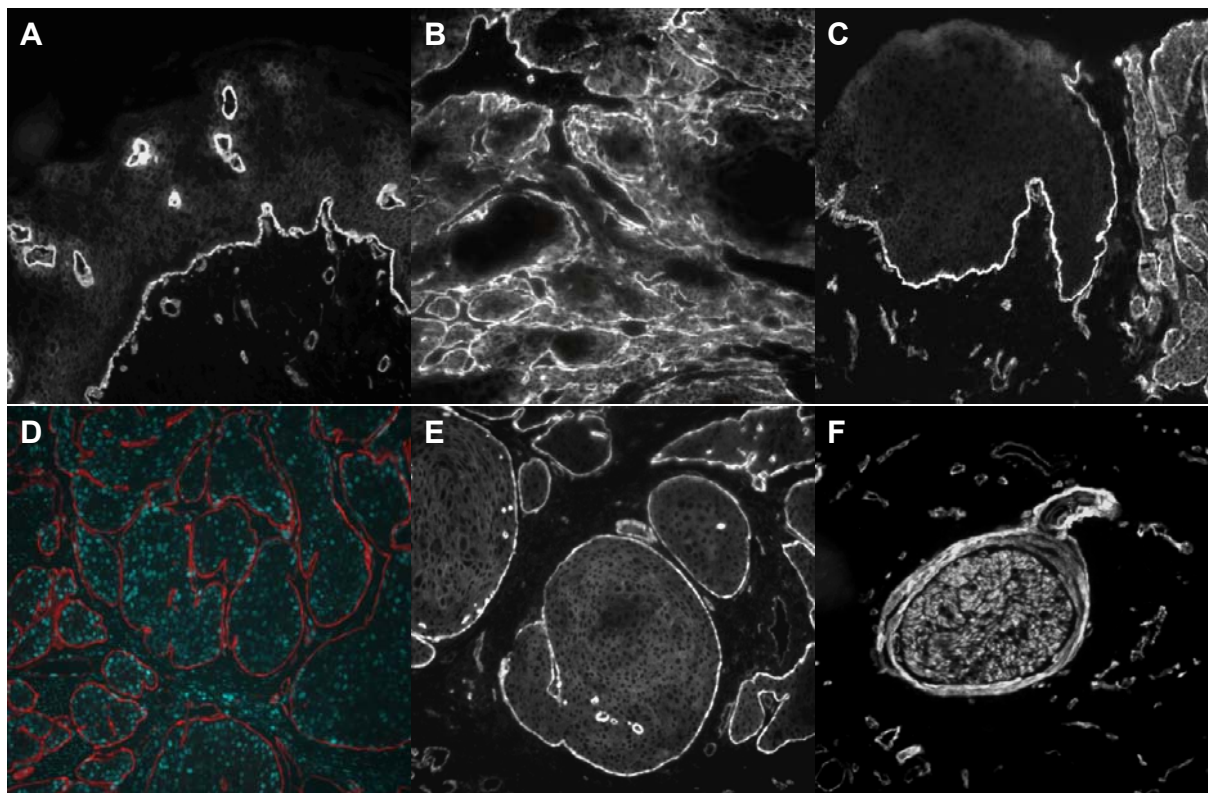


Abbildung 17. β_4 -Integrin-Expression. (A) Polarisierte Expression im Epithel und (B) erhaltene Polarisation des Tumorgewebes im selben Präparat. (C) Polarisierte Expression im Epithel und Tumorgewebe mit aufgehobener Polarisation. (D) Falschfarbendarstellung: Mäßiggradige Expression (++) am Übergang zwischen Tumor und Bindegewebe (rot) bei fehlender Expression (-) im übrigen Tumorgewebe. Überblendung der Kernstrukturen (blau). (E) Einheitliches Expressionsmuster (+) in den Tumorzellverbänden mit deutlich abgrenzbarer, verstärkter Expression (++) auf den Zelloberflächen am Übergang zum umgebenden Normalgewebe (*Grenzschicht Tumor/ECM*). (F) Nerv quer geschnitten. Mäßiggradige Expression (++) auf Nervenfasern und Perineurium.

Bei 18 von 34 beurteilten Präparaten (53%) konnte die Expression der β_4 -Integrin-Untereinheit simultan im Tumorgewebe und im normalen Ösophagusepithel beurteilt werden (siehe Tabelle 19). In 14 von 18 Präparaten (78%) zeigte das Stratum basale eine schwache Expression (+), während in 4 Präparaten (22%) keine Expression (-) festgestellt wurde. Das Stratum spinosum zeigte bei 8 Patienten (44%) eine schwache Expression (+). Bei 10 Patienten (56%) wurde keine Expression (-) beobachtet. Das Stratum squamosum ließ in keiner Probe eine Expression oberhalb der Nachweisgrenze erkennen (-). Demgegenüber hob sich in allen Fällen eine *Grenzschicht Epithel/Basalmembran* mit einer verstärkten Expression vom übrigen Epithel ab (siehe Abbildung 17): In 10 Präparaten (56%) zeigte sich eine schwache (+) und in 8 Präparaten (44%) ein

mäßiggradige Expression (++). In allen Epithelien wurde eine Abnahme der Expressionsstärke im Sinne einer Polarisierung beobachtet, wobei in 4 Präparaten (22%) lediglich entlang der *Grenzschicht Epithel/Basalmembran* eine Expression nachgewiesen wurde.

33 von 34 Tumoren (97%) exprimierten die β_4 -Untereinheit. Bei der Beurteilung der Expressionsstärken an den Invasionsrändern zeigten 26 Tumoren (76%) eine schwache Expression (+). 23 Tumoren (68%) wiesen in den zentralen Anteilen ebenfalls eine schwache Expression (+) auf. Bei 32 Tumoren (94%) hob sich eine *Grenzschicht Tumor/ECM* vom übrigen Tumorgewebe ab – in 21 Fällen (62%) mit einer schwachen (+) und in 11 Fällen (32%) mit einer mäßiggradigen Expression (++).

Bei der Bewertung der Expressionsmuster im Tumorgewebe war in 9 Präparaten (26%) eine polarisierte Expression erhalten, wohingegen in 25 Präparaten (74%) keine Polarisierung beobachtet wurde. Präparate, die eine β_4 -Expression lediglich entlang der *Grenzschicht Tumor/ECM* zeigten, wurden dabei der Gruppe von Tumoren mit polarisiertem Expressionsmuster zugerechnet. 22 Tumoren (65%) zeigten ein einheitliches Expressionsmuster, worunter sich 15 Tumoren (50%) mit homogener Expression befanden. Bei 12 Patienten (35%) zeigte sich eine heterogene β_4 -Expression. Außerdem wiesen Nervengewebe und Endothelien in allen Präparaten eine spezifische Anfärbung für die β_4 -Integrin-Untereinheit auf.

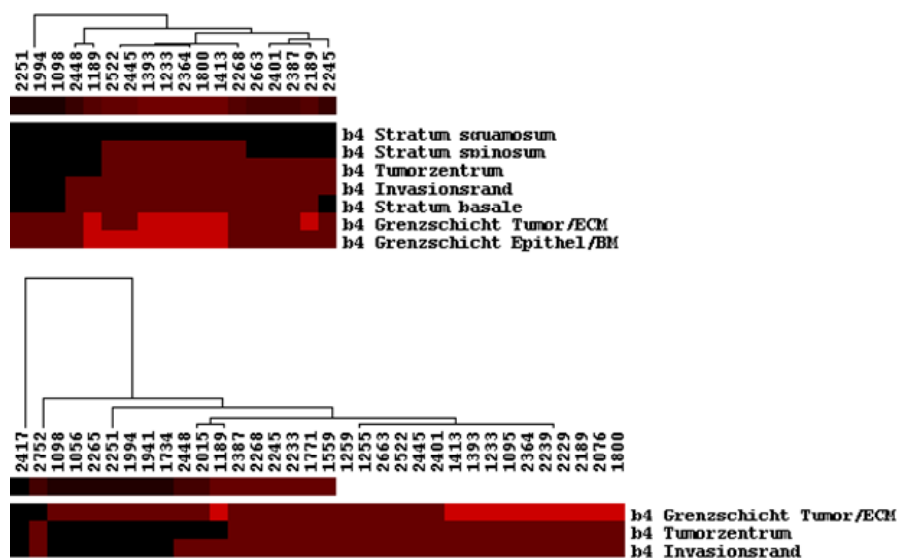


Abbildung 18. β_4 -Integrin-Expression: Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse der Primärtumoren (Erläuterung siehe Abbildung 8). **Oberes Diagramm:** Expressionsverhalten von 18 Tumorstichproben, die Anteile normaler Ösophagismukosa enthielten. In 15 Präparaten (83%) stimmten die Expressionsstärken von Tumorgewebe und autologem Epithel überein. **Unteres Diagramm:** Expressionsprofile von 34 Primärtumoren. 23 Tumoren (68%) wiesen im gesamten Tumorgewebe eine einheitliche Expressionsstärke auf. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Tabelle 19. β_4 -Integrin-Expression in Ösophagismukosa und Tumorgewebe*.

Expressionsstärken	n Patienten (%)				
	+/++/+++	-	+	++	+++
Epithel (n=18)					
<i>Grenzschicht Epithel/BM**</i>	18 (100%)	0	10 (56%)	8 (44%)	0
Stratum basale	14 (78%)	4 (22%)	14 (78%)	0	0
Stratum spinosum	8 (44%)	10 (56%)	8 (44%)	0	0
Stratum squamosum	0	18 (100%)	0	0	0
Tumorgewebe (n=34)					
<i>Grenzschicht Tumor/ECM**</i>	32 (94%)	2 (6%)	21 (62%)	11 (32%)	0
Invasionsrand	26 (76%)	8 (24%)	26 (76%)	0	0
Tumorzentrum	23 (68%)	11 (32%)	23 (68%)	0	0
Expressionsmuster (n=34)					
n Patienten (%)					
Polarität erhalten	9 (26%)				
Polarität aufgehoben	25 (74%)				
Einheitliche Expression	22 (65%)				
Heterogene Expression	12 (35%)				

* Die **dominierende Expressionsstärke** in einer Epithelschicht bzw. in einem Tumorbereich ist durch **Fettdruck** hervorgehoben.

** Konnte auf den Zelloberflächen mit direktem Kontakt zur Basalmembran (BM) bzw. ECM visuell eine verstärkte Expression abgegrenzt werden, wurde diese unabhängig von der Expression im übrigen Gewebe bewertet.

3.3 Auswertung und statistische Analysen

3.3.1 Integrin-Expression im Plattenepithel des Ösophagus

In allen Primärtumorproben, die Anteile normaler Ösophagismukosa enthielten, wurde im Plattenepithel eine polarisierte Expression der untersuchten Integrin-Untereinheiten beobachtet, wobei die Expression in allen Präparaten auf den basalständigen Zellen am stärksten ausgeprägt war. Mit der Ausdifferenzierung der Keratinozyten nahm die Expression vom Stratum basale über das Stratum spinosum und Stratum squamosum zum Ösophaguslumen hin graduell ab. Obgleich die Färbintensitäten zum Teil zwischen den verschiedenen Patientenproben variierten, zeigten sich innerhalb der einzelnen Präparate stets konstante Expressionsstärken in den verschiedenen Schichten des Epithels.

Die Expression der α_3 -, α_6 -, β_1 - und β_4 -Untereinheiten hob sich am direkten Übergang vom Epithel zur Lamina propria deutlich als eine scharf abgrenzbare, kontinuierliche Linie (*Grenzschicht Epithel/Basalmembran*) von der Expression auf den übrigen Keratinozyten ab. Das Phänomen wurde bei der α_6 - und β_4 -Untereinheit in allen Präparaten (19/19 bzw. 18/18), bei der α_3 -Untereinheit in 83% der Fälle (15/18) und bei der β_1 -Untereinheit in 44% der Fälle (7/16) beobachtet. Demgegenüber wies die α_2 -Untereinheit keine verstärkte Expression an der Grenze zwischen Epithel und Basalmembran auf. Für jede Epithelschicht ergab sich eine dominierende Expressionsstärke, so dass ein Profil der physiologischen Integrin-Expression im Plattenepithel des Ösophagus entstanden ist, welches zur Bewertung der Integrin-Expression im Tumorgewebe herangezogen wurde (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20. Polarisierte Integrin-Expression im mehrschichtigen Plattenepithel des Ösophagus*.

Integrin-Untereinheit	Grenzschicht Epithel/ Basalmembran	Stratum		
		basale	spinosum	squamosum
α_2	- (-)	+ (++)	+ (+)	- (+/-)
α_3	+ (++)	+ (++)	+ (+/-)	- (+/-)
α_6	+++ (+++)	+ (++)	+ (+/-)	- (++)
β_1	- (++)	+ (++)	+ (+/-)	- (+/-)
β_4	+ (++)	+ (+/-)	- (+/-)	- (-)

* Die **dominierenden Expressionsstärken** sind in **Fettdruck** vorangestellt. Das Spektrum der beobachteten Expressionsstärken ist in Klammern angeführt.

3.3.2 Integrin-Expression im Tumorgewebe

Die Integrin-Expression in den Tumoren unterschied sich von der gleichförmigen und polarisierten Expression im Epithel. Zunächst wurden die Expressionsstärken im Randbereich der Tumoren (*Invasionsrand*) mit der Expression im korrespondierenden Epithel (*Stratum basale*) verglichen (siehe Tabelle 21) und die Expression im Randbereich der Tumoren (*Invasionsrand*) der Expression in den zentralen Tumoranteilen (*Tumorzentrum*) gegenübergestellt (siehe Tabelle 22). Eine anschauliche Darstellung zum Expressionsverhalten der Primärtumoren bieten die Übersichtsgrafiken zu den hierarchischen Ähnlichkeitsanalysen (siehe Abschnitte 3.2, 3.3.6 und 3.3.7).

In Präparaten, die neben Tumorgewebe auch Anteile gesunder Ösophagsmukosa enthielten, stimmten die Expressionsstärken in Tumorgewebe und Epithel mehrheitlich überein (67–84%). Bei einem Teil der Tumoren zeigte sich eine stärkere Expression im Tumorgewebe (5–33%), während in einzelnen Fällen eine geringere Expression oder der Verlust der Expression beobachtet wurden (5–17%). In den meisten Tumorproben stimmten auch innerhalb des Tumorgewebes die Expressionsstärken überein (68–94%), z. T. wurde eine stärkere Expression an den Invasionsrändern beobachtet (3–28%). Der vergleichsweise häufige Verlust der β_4 -Untereinheit bei 23% (8/34) der Tumoren war auf Färbeintensitäten zurückzuführen, die nur geringfügig unter der festgesetzten Nachweisgrenze für eine schwache Expression lagen und als *nicht exprimierend* (–) gewertet worden waren (siehe Abschnitt 3.2.5). Bei den übrigen Untereinheiten wurde eine verminderte Expression oder ein Expressionsverlust nur in Einzelfällen festgestellt.

Bei der Gesamtbewertung der quantitativen Expression im Tumorkollektiv diente jeweils diejenige Expressionsstärke als Referenz, die sich bei der Untersuchung der Expression im normalen Ösophagus-Plattenepithel für eine Integrin-Untereinheit als dominierend erwiesen hatte (siehe Tabelle 20). Für Primärtumoren, bei denen im Tumorgewebe (*Invasionsrand* und/oder *Tumorzentrum*) eine höhere Expressionsstärke (++)/+++ als die im *Stratum basale* vorherrschende Expressionsstärke (+) ermittelt worden war, wurde eine *Überexpression* (engl. *overexpression* oder *up-regulation*) der betroffenen Untereinheit angenommen. Bei Tumoren mit fehlender Expression (–) wurde von einer verminderten Expression bzw. einem

Verlust im Sinne einer *Niederregulation* (engl. *down-regulation*) ausgegangen (siehe Tabelle 23).

Tabelle 21. Expressionsstärken in Tumorgewebe und Epithel.

Integrin-Untereinheit	Invasionsrand → Stratum basale		
	Einheitliche Expression	Verstärkte Expression	Verminderte Expression/Verlust
α_2	84% (16/19)	11% (2/19)	5% (1/19)
α_3	67% (12/18)	33% (6/18)	0
α_6	68% (13/19)	32% (6/19)	0
β_1	69% (11/16)	25% (4/16)	6% (1/16)
β_4	78% (14/18)	5% (1/18)	17% (3/18)

Tabelle 22. Expressionsstärken im Tumorgewebe.

Integrin-Untereinheit	Invasionsrand → Tumorzentrum		
	Einheitliche Expression	Verstärkte Expression	Verminderte Expression/Verlust
α_2	94% (34/36)	3% (1/36)	3% (1/36)
α_3	69% (25/36)	28% (10/36)	3% (1/36)
α_6	83% (30/36)	14% (5/36)	3% (1/36)
β_1	87% (26/30)	10% (3/30)	3% (1/30)
β_4	68% (23/34)	9% (3/34)	23% (8/34)

Tabelle 23. Überexpression und Niederregulation im Tumorgewebe.

Integrin-Untereinheit	Tumorgewebe → Stratum basale		
	Normalexpression (+)*	Überexpression (++/+++)*	Niederregulation (-)*
α_2	78% (28/36)	19% (7/36)	3% (1/36)
α_3	69% (25/36)	28% (10/36)	3% (1/36)
α_6	56% (20/36)	44% (16/36)	0
β_1	70% (21/30)	27% (8/30)	3% (1/30)
β_4	76% (26/34)	0	24% (8/34)

* Expressionsstärken der Bereiche *Invasionsrand* und/oder *Tumorzentrum*.

Bei Patienten mit Primärtumorstadium pT3–4 war eine Überexpression häufiger ausgeprägt als bei Patienten mit Stadium pT1–2 (siehe Abbildung 19), was sich im Falle der α_2 -Untereinheit als signifikant erwies ($p=0,041$). Zwischen der Überexpression oder Niederregulation der untersuchten Integrin-Untereinheiten im Tumorgewebe und den pathohistologischen Parametern ergaben sich darüber hinaus keine weiteren signifikanten Zusammenhänge. Ein Einfluss auf das postoperative Überleben der Patienten wurde nicht festgestellt.

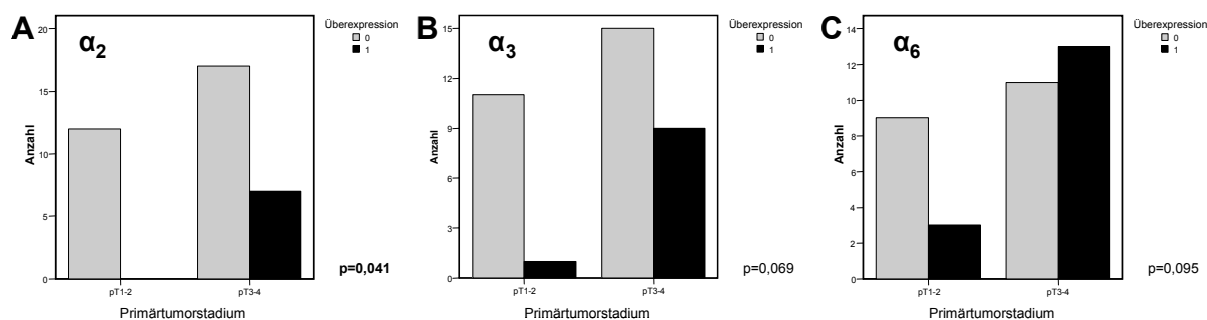


Abbildung 19. Überexpression der α_2 -, α_3 - und α_6 -Integrine im Tumorgewebe. Patienten der Primärtumorstadien pT3–4 wiesen häufiger eine Überexpression der untersuchten α -Untereinheiten auf als Patienten der Stadien pT1–2. (A) Überexpression der α_2 -Untereinheit ($p=0,041$). (B) Überexpression der α_3 -Untereinheit ($p=0,069$). (C) Überexpression der α_6 -Untereinheit ($p=0,095$).

3.3.3 Integrin-Expression am Übergang von Epithel und Tumor zur ECM

Die Integrin-Expression auf den Zelloberflächen mit direktem Kontakt zum angrenzenden Normalgewebe trat bei einem Teil der Präparate als eine linienförmige Struktur in Erscheinung (*Grenzschicht Epithel/Basalmembran* und *Grenzschicht Tumor/ECM*), die sich mit einer deutlich stärkeren Anfärbung von der Expression auf den übrigen Keratinozyten bzw. Tumorzellen abhob (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24. Verstärkte Expression am Übergang von Epithel/Tumor zum Normalgewebe.

Integrin-Untereinheit	<i>Grenzschicht Epithel/Basalmembran</i>	<i>Grenzschicht Tumor/ECM</i>
α_2	0	8% (3/36)
α_3	83% (15/18)	25% (9/36)
α_6	100% (19/19)	97% (35/36)
β_1	44% (7/16)	30% (9/30)
β_4	100% (18/18)	94% (32/34)

Alle Präparate mit einem Anteil normaler Ösophagismukosa besaßen für die α_6 - und β_4 -Untereinheit eine *Grenzschicht* mit verstärkter Expression, die sich in ähnlicher Ausprägung bei 97% (35/36) bzw. 94% (32/34) der Tumoren wieder fand. Die α_2 -Untereinheit wurde am Übergang von Tumor zum Normalgewebe nur von einzelnen Primärtumoren (3/36) verstärkt exprimiert. Gegenüber 83% (15/18) der Präparate, die einen Anteil normaler Ösophagismukosa enthielten und eine *Grenzschicht Epithel/Basalmembran* zeigten, wiesen lediglich 25% (9/36) der Tumoren eine *Grenzschicht Tumor/ECM* mit verstärkter α_3 -Expression auf ($p=0,0002$). Die β_1 -Untereinheit grenzte sich in 44% (7/16) der untersuchten Epithelien und in 30% (9/30) der Tumoren mit einer verstärkten Expression an den Übergängen zur ECM des Normalgewebes ab. Die Färbeintensitäten der *Grenzschichten* lagen in den Präparaten stets über den Intensitätswerten im übrigen Epithel bzw. Tumorgewebe, allerdings trat der Intensitätsunterschied nur bei der α_6 - und β_4 -Untereinheit mehrheitlich mit höheren Expressionsstärken in Erscheinung (siehe hierarchische Ähnlichkeitsanalysen in Abschnitt 3.2).

In den Tumorpräparaten mit einem Anteil normaler Ösophagismukosa wurden die Expressionsstärken der *Grenzschichten* von Tumor und Epithel miteinander verglichen (siehe Tabelle 25): Für α_6 und β_4 zeigte sich bei 84% (16/19) bzw. 83% (15/18) eine einheitliche Expressionsstärke, wohingegen die α_3 - und β_1 -Expression bei 67% bzw. 25% entlang der *Grenzschicht Tumor/ECM* schwächer ausgeprägt waren als im korrespondierenden Epithel. Eine höhere Expressionsstärke entlang der *Grenzschicht Tumor/ECM* wurde bei allen Untereinheiten lediglich in Einzelfällen beobachtet. Die Untersuchung der α_2 -Expression an den Übergängen von Tumorgewebe und Epithel zum angrenzenden Normalgewebe erbrachte in 95% (18/19) der Fälle keine umschriebene verstärkte Expression, die sich in Form einer *Grenzschicht* abhob.

Tabelle 25. Expressionsstärken am Übergang vom Tumorgewebe bzw. Epithel zum Normalgewebe.

Integrin-Untereinheit	<i>Grenzschicht Tumor/ECM</i> → <i>Grenzschicht Epithel/Basalmembran</i>		
	Einheitliche Expression	Verstärkte Expression	Verminderte Expression/Verlust
α_2	95% (18/19)	5% (1/19)	0
α_3	11% (2/18)	6% (1/18)	67% (12/18)
α_6	84% (16/19)	5% (1/19)	11% (2/19)
β_1	19% (3/16)	6% (1/16)	25% (4/16)
β_4	83% (15/18)	6% (1/18)	11% (2/18)

Bei der Gesamtbetrachtung des Tumorkollektivs wurde eine *Überexpression* der untersuchten Integrin-Untereinheiten am Übergang vom Tumor zum infiltrierten Normalgewebe angenommen, wenn für die *Grenzschicht Tumor/ECM* eine höhere Expressionsstärke vorlag, als für die *Grenzschicht Epithel/Basalmembran* im normalen Ösophagus-Plattenepithel bestimmt worden war (siehe Tabelle 20). Bei Tumoren mit einer geringeren Expressionsstärke am unmittelbaren Tumorrand wurde eine *Niederregulation* der jeweiligen Integrin-Untereinheit angenommen (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26. Überexpression und Niederregulation am Tumorrand.

Integrin-Untereinheit	Grenzschicht Tumor/ECM → Grenzschicht Epithel/Basalmembran					
	Normalexpression			Überexpression		Niederregulation
α_2	92% (33/36)	(-)		8% (3/36)	(+/++)	0
α_3	17% (6/36)	(+)		8% (3/36)	(++)	75% (27/36) (-)
α_6	53% (19/36)	(+++)		0		47% (17/36) (++/+-)
β_1	70% (21/30)	(-)		30% (9/30)	(+/+++)	0
β_4	62% (21/34)	(+)		32% (11/34)	(++)	6% (2/34) (-)

Die Korrelation der Ergebnisse mit pathohistologischen Parametern ergab, dass Patienten mit einer Überexpression der β_1 -Untereinheit am unmittelbaren Tumorrand signifikant seltener eine Lymphknotenmetastasierung (pN1) aufwiesen ($p=0,018$) (siehe Abbildung 20). Primärtumoren mit geringer Differenzierung (G3–4) zeigten häufiger eine Niederregulation der α_6 -Untereinheit entlang der *Grenzschicht Tumor/ECM* als Patienten mit besser differenzierten Tumoren (G1–2) ($p=0,083$). Ein ähnlicher Zusammenhang bestand für die β_4 -Untereinheit: Tumoren mit einem Verlust der β_4 -Expression im

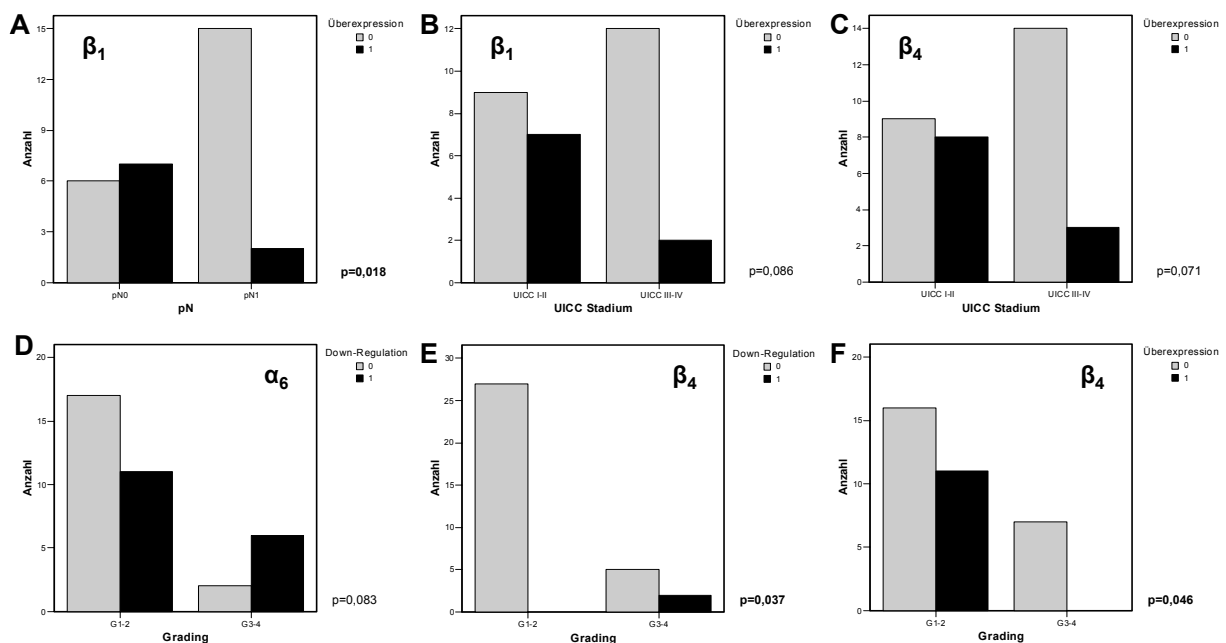


Abbildung 20. Grenzschicht Tumor/ECM: Überexpression und Niederregulation. (A) Bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (pN0) überwog die Zahl der Tumoren mit einer Überexpression der β_1 -Untereinheit ($p=0,018$). (B) (C) Tumoren mit β_1 - bzw. β_4 -Überexpression waren tendenziell häufiger mit einem niedrigeren Tumorstadium (UICC I–II) assoziiert. (D) Bei schlecht differenzierten Tumoren (G3–4) überwogen Tumoren mit einer Niederregulation der α_6 -Untereinheit. (E) Die Niederregulation der β_4 -Untereinheit korrelierte signifikant mit einer schlechten Differenzierung (G3–4) der Tumoren ($p=0,037$). (F) Eine β_4 -Überexpression wurde lediglich bei stärker differenzierten Tumoren (G1–2) beobachtet ($p=0,046$).

Übergangsbereich, was als Niederregulation gewertet wurde, zeigten eine geringe Differenzierung (G3–4) ($p=0,037$), während Tumoren mit einer randständigen β_4 -Überexpression mehrheitlich gut oder mäßiggradig differenziert (G1–2) waren ($p=0,046$). Die Überexpression der β_1 - und β_4 -Untereinheit war tendenziell mit einem niedrigen Tumorstadium (UICC I–II) assoziiert ($p=0,086$ bzw. $p=0,071$).

Die α_6 -Expression auf den Tumorzellen mit direktem Kontakt zur ECM korrelierte mit dem rezidivfreien Überlebensintervall. Patienten, deren Tumoren eine starke Expression (+++) aufwiesen, lebten mit durchschnittlich 52 ± 12 Monaten länger rezidivfrei als Patienten, deren Tumoren im Übergangsbereich eine mäßiggradige, schwache oder fehlende Expression (++/+/–) aufwiesen und nach durchschnittlich 9 ± 2 Monaten ein Rezidiv entwickelten ($p=0,0049$). Darüber hinaus wurden keine weiteren signifikanten Zusammenhänge zwischen der Integrin-Expression am unmittelbaren Tumorrand und den pathohistologischen Parametern festgestellt.

3.3.4 Expressionsmuster und Polarisierung

Bei der Beurteilung der Expressionsmuster (*Polarisierung/einheitliche Expression*) stand die visuelle Beurteilung der Schnittpräparate durch den Untersucher im Vordergrund, da sich die Unterschiede der ermittelten Färbintensitäten zwischen stark und schwach angefärbten Bereichen sich nicht in allen Fällen in einer Differenz der zugeordneten Expressionsstärken widerspiegeln.

Tabelle 27. Expressionsverhalten der Integrin-Untereinheiten.

Expressionsmuster	Polarisierung		p-Wert**
	erhalten	aufgehoben*	
α_2-Untereinheit (n=36)			
Einheitliche Expression	4 (80%)	9 (29%)	0,047
Heterogene Expression	1 (20%)	22 (71%)	
α_3-Untereinheit (n=36)			
Einheitliche Expression	11 (79%)	4 (18%)	0,001
Heterogene Expression	3 (21%)	18 (82%)	
α_6-Untereinheit (n=36)			
Einheitliche Expression	9 (90%)	12 (46%)	0,019
Heterogene Expression	1 (10%)	14 (54%)	
β_1-Untereinheit (n=30)			
Einheitliche Expression	5 (83%)	10 (42%)	0,084
Heterogene Expression	1 (17%)	14 (58%)	
β_4-Untereinheit (n=34)			
Einheitliche Expression	7 (78%)	15 (60%)	0,297
Heterogene Expression	2 (22%)	10 (40%)	

* Tumoren mit homogenem Expressionsmuster sind grau unterlegt.

** Exakter Test nach Fisher, χ^2 -Test

Die im Epithel beobachtete *Polarisierung* der Expression war bei allen Untereinheiten mehrheitlich (61–86%) aufgehoben (siehe Tabelle 27). Je nach Untereinheit wiesen 18–60% der Tumoren ohne polarisierte Expression ein *einheitliches, homogenes Expressionsmuster* mit konstanten Expressionsstärken auf. Tumoren mit *polarisierter Expression* zeigten in 78–90% der Fälle konstante Expressionsstärken im Tumorgewebe, was ebenfalls als *einheitliche Expression* gewertet wurde. Hier ergab sich für die α -Untereinheiten ein signifikanter Zusammenhang zwischen *polarisierter Expression* und der Ausprägung eines *einheitlichen Expressionsmusters*.

Bei den Korrelationen mit den pathohistologischen Parametern stellte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der polarisierten Expression der α_6 -Untereinheit und der Anzahl von Lymphknotenmetastasen (pLK) heraus ($p=0,033$). Patienten mit polarisierter α_2 -, α_6 - und β_1 -Expression wiesen entweder nur eine geringe Anzahl befallener Lymphknoten ($pLK < 3$) oder überhaupt keine Lymphknotenmetastasierung auf (pN0) (siehe Abbildung 21). Bei Patienten mit polarisierter α_3 - bzw. β_4 -Expression wurde nur in Einzelfällen ein ausgedehnter Lymphknotenbefall ($pLK > 3$) beobachtet.

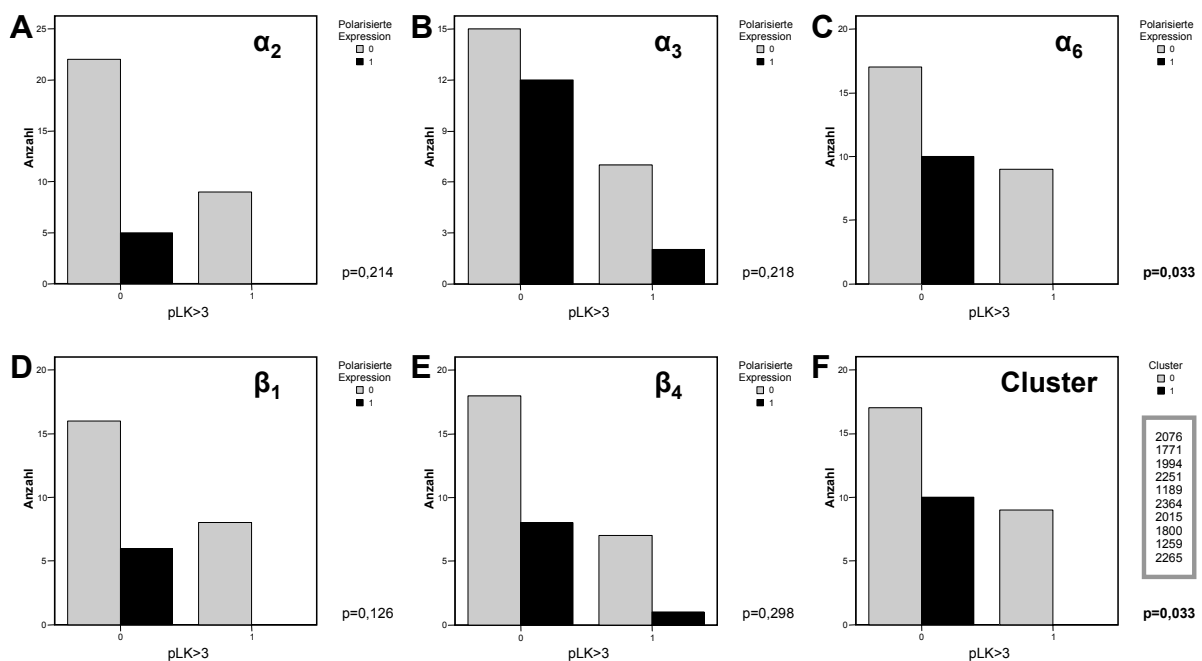


Abbildung 21. Polarisation der Integrin-Expression und Lymphknotenmetastasierung. Patienten mit einer polarisierten Integrin-Expression im Tumorgewebe weisen selten eine größere Anzahl histopathologisch befallener Lymphknoten ($pLK > 3$) auf: (A) Tumoren mit polarisierter α_2 -Expression. (B) Tumoren mit polarisierter α_3 -Expression. (C) Tumoren mit polarisierter α_6 -Expression. (D) Tumoren mit polarisierter β_1 -Expression. (E) Tumoren mit polarisierter β_4 -Expression. (F) Subgruppe (Cluster) von 10 Patienten mit polarisierter Expression für die Mehrzahl der untersuchten Integrin-Untereinheiten (siehe Abschnitt 3.3.7). Sowohl die Zugehörigkeit zum Patienten-Cluster als auch die Polarisation der α_6 -Expression korrelierte signifikant mit einer geringen Anzahl oder dem Fehlen von Lymphknotenmetastasen ($p=0,033$).

In den Kaplan-Meier-Analysen korrelierte die Polarisierung der α_6 - und β_4 -Expression mit den rezidivfreien Überlebenszeiten der Patienten: Mit durchschnittlich 59 ± 10 Monaten überlebten Patienten mit polarisierter β_4 -Expression ($n=6$) länger rezidivfrei als Patienten ohne Polarisierung ($n=20$), die nach im Mittel 19 ± 6 Monaten ein Rezidiv entwickelten ($p=0,0225$). Patienten, deren Tumoren eine polarisierte Expression der α_6 -Untereinheit aufwiesen ($n=8$), überlebten im Durchschnitt 54 ± 14 Monate rezidivfrei, wohingegen Patienten mit heterogener Expression ($n=20$) nach durchschnittlich 24 ± 8 Monaten ein Rezidiv entwickelten ($p=0,0504$). Patienten mit einer Polarisierung der β_1 -Expression im Tumorgewebe ($n=5$) besaßen mit im Mittel 50 ± 12 Monaten gegenüber Patienten ohne polarisierte Expression ($n=20$) mit durchschnittlich 20 ± 7 Monaten ein verlängertes rezidivfreies Überlebensintervall ($p=0,0700$).

Die Überlebensanalysen konnten anhand der Expressionsmuster keinen weiteren Parameter mit signifikantem Einfluss auf das postoperative Überleben der Patienten identifizieren. Allerdings gelang es, mit der *hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse* eine Gruppe von 10 Patienten zu abzugrenzen, deren Tumoren für die Mehrzahl der Untereinheiten ein *einheitliches und/oder polarisiertes Expressionsmuster* aufwiesen. Diese Patienten verfügten über ein gegenüber dem Restkollektiv tendenziell verlängertes rezidivfreies Überlebensintervall (siehe Abschnitt 3.3.7).

3.3.5 Integrin-Expression und das Invasionsverhalten der Primärtumoren

Bei den Korrelationen der Resultate der Untersuchungen zum Invasionsverhalten der Primärtumoren mit den Ergebnissen zur Integrin-Expression ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge. Zwischen dem Invasionsmodus der Primärtumoren und pathohistologischen Parametern bestanden ebenfalls keine signifikanten Korrelationen (siehe Tabelle 13).

3.3.6 Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse anhand der Expressionsstärken

Abschließend wurden die Expressionsprofile der Tumoren zu allen untersuchten Integrin-Untereinheiten gemeinsam einer hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse unterzogen (siehe Abbildung 22). Patienten, deren Tumoren ein ähnliches Expressionsprofil aufwiesen, wurden zu Subgruppen (*Clustern*) zusammengefasst und auf gemeinsame Merkmale überprüft. Die postoperativen Überlebenszeiten der jeweils selektierten Patienten wurden denen des Restkollektivs gegenübergestellt und mit der Kaplan-Meier-Methode auf eine prognostische Signifikanz hin untersucht.

In der Clusteranalyse zeigte sich, dass die Expressionsstärken am Invasionsrand und in den zentralen Tumoranteilen häufig übereinstimmen: Die Expressionsprofile der Bereiche *Invasionsrand* und *Tumorzentrum* wurden bei allen Untereinheiten nebeneinander angeordnet. Die α_2 -, α_3 - und β_1 -Untereinheiten grenzten sich in der Mehrzahl der Fälle nicht mit einer verstärkten Expression am Tumorrand vom übrigen Tumorgewebe ab, so dass die entsprechenden Expressionsprofile gemeinsam am unteren Rand des Diagramms gruppiert wurden. Die α_6 - und β_4 -Expression hob sich demgegenüber bei 89% der Tumoren (32/36) mit einer *Grenzschicht Tumor/ECM* vom übrigen Tumorgewebe ab. Die entsprechenden Expressionsprofile wurden unabhängig von den Profilen der übrigen Untereinheiten im oberen Teil des Diagramms zwischen der α_3 -Expression im Tumorrandbereich (*Invasionsrand*) und der α_3 -Expression im *Tumorzentrum* angeordnet.

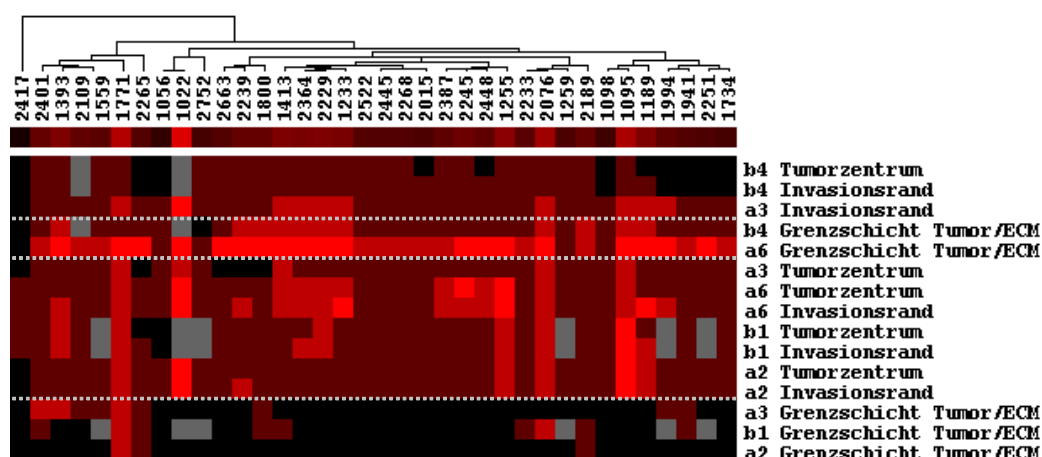


Abbildung 22. Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse der Primärtumoren anhand der Expressionsstärken. Expressionsstärken, die nicht beurteilt werden konnten, sind als graue Quadrate dargestellt. Die Verteilung der Expressionsstärken in den Bereichen *Invasionsrand* und *Tumorzentrum* wies bei allen Untereinheiten eine hohe Übereinstimmung auf, so dass diese jeweils benachbart im oberen Teil des Diagramms angeordnet wurden. Bei den α_2 -, α_3 - und β_1 -Untereinheiten zeichnete sich an den Tumorrändern in den meisten Fällen keine *Grenzschicht Tumor/ECM* ab, so dass die entsprechenden Profile gemeinsam am unteren Rand des Diagramms gruppiert wurden. Die α_6 - und β_4 -Expression hingegen hob sich in 89% der Fälle (32/36) mit einer verstärkten Expression als *Grenzschicht Tumor/ECM* vom übrigen Tumorgewebe ab. Die Profile wurden gemeinsam im oberen Teil des Diagramms angeordnet. Keine der anhand des Dendrogramms gebildeten Tumorsubgruppen (Cluster) korrelierte mit pathohistologischen Parametern. In den Überlebensanalysen konnte keine Subgruppe identifiziert werden, die sich hinsichtlich ihrer Prognose signifikant von den jeweils verbliebenen Patienten unterschied.

Keine der Patientensubgruppen, die anhand des Dendrogramms gebildet werden konnten, wies gemeinsame Merkmale auf, welche diese von den jeweils verbliebenen Patienten eindeutig abgrenzten oder signifikant mit pathohistologischen Parametern korrelierten. Keine Subgruppe unterschied sich hinsichtlich der postoperativen Überlebenszeiten signifikant von den jeweils nicht eingeschlossenen Patienten.

3.3.7 Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse anhand der Expressionsmuster

Auch die *Expressionsmuster* der Tumoren wurden mithilfe der hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse analysiert. Hier konnte eine Gruppe von 10 Patienten identifiziert werden, deren Tumoren für die Mehrheit der untersuchten Integrin-Untereinheiten eine polarisierte Expression und/oder eine einheitliche Expression aufwiesen (siehe Abbildung 23). 8 von 10 Tumoren (80%) dieser Patienten besaßen für die Mehrzahl der Untereinheiten ein einheitliches und/oder polarisiertes Expressionsmuster mit konstanten Expressionsstärken. Von den verbliebenen 26 Patienten zeigten 6 (23%) in ihren Tumoren weder eine einheitliche Expression noch eine erhaltene Polarisierung. Eine polarisierte Expression im Tumorgewebe wurde bei lediglich 7 der 26 Patienten (27%) entweder für eine (n=6) oder für zwei Integrin-Untereinheiten (n=1) beobachtet.

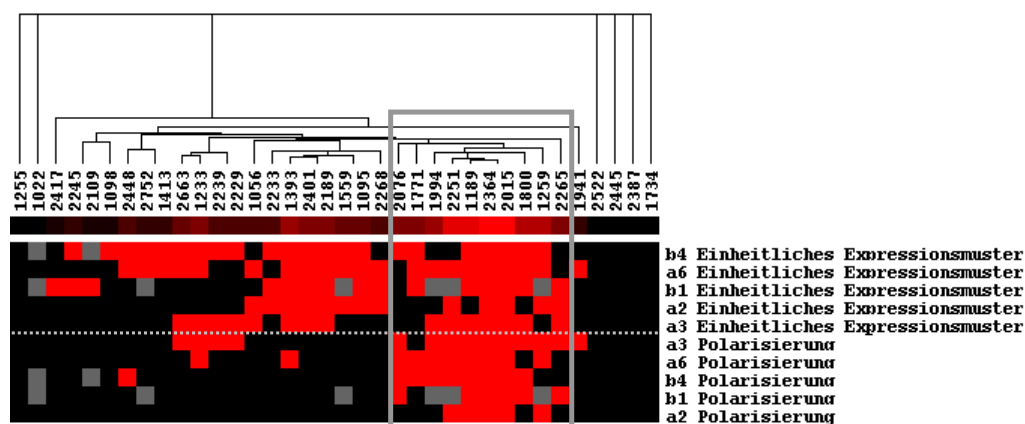


Abbildung 23. Hierarchische Ähnlichkeitsanalyse der Primärtumoren anhand der Expressionsmuster – Identifikation einer Patientensubgruppe mit verlängertem rezidivfreiem Überlebensintervall. Expressionsmerkmale, die nicht beurteilt werden konnten, sind als graue Quadrate dargestellt. Primärtumoren, die ein *einheitliches Expressionsmuster* mit konstanten Expressionsstärken bzw. eine *Polarisierung der Expression* aufwiesen, sind als hellrote Quadrate dargestellt. Die schwarzen Quadrate repräsentieren Tumoren, bei denen keine Polarisation erhalten bzw. kein homogenes oder polarisiertes Expressionsmuster mit konstanten Expressionsstärken zu beobachten war. 10 Patienten konnten zu einer Subgruppe (grau umrahmt) zusammengefasst werden, die im Gegensatz zum übrigen Kollektiv für die Mehrzahl der Untereinheiten ein einheitliches und/oder polarisiertes Expressionsmuster aufwiesen. Die Patientensubgruppe besaß gegenüber den übrigen Patienten ein verlängertes rezidivfreies Überlebensintervall ($p=0,0785$).

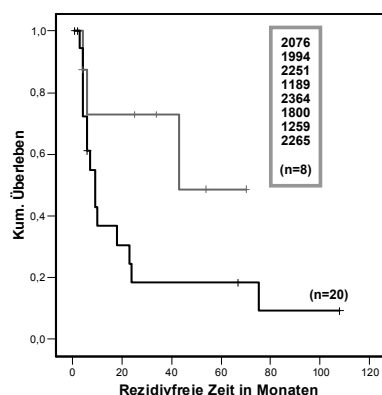


Abbildung 24. Kaplan-Meier-Analyse des rezidivfreien Überlebens für eine Patientensubgruppe mit mehrheitlich erhaltener polarisierter Integrin-Expression. Von 8 der 10 Patienten, die in der Ähnlichkeitsanalyse anhand ihrer Expressionsmuster als Subgruppe identifiziert werden konnten, standen postoperative Überlebensdaten zur Verfügung. Im Vergleich zu den übrigen Patienten mit postoperativen Überlebensdaten ($n=20$) wiesen die Patienten der Subgruppe ein tendenziell verlängertes rezidivfreies Intervall auf ($p=0,0785$).

Von 8 der 10 zu einem Cluster zusammengefassten Patienten standen postoperative Überlebensdaten zur Verfügung: Mit durchschnittlich 46 ± 11 Monaten überlebten diese Patienten tendenziell länger rezidivfrei als die übrigen Patienten ($n=20$), die mit durchschnittlich 25 ± 8 Monaten ohne Rezidiv blieben ($p=0,0785$) (siehe Abbildung 24).

Tabelle 28. Vergleich der Merkmalsausprägung zwischen Patienten der Subgruppe und dem Restkollektiv.

Patienten (n=36)	Subgruppe	Restkollektiv	p-Wert*
α₂-Expression			
Polarisierung erhalten	5 (50%)	0	0,001
Keine Polarisierung	5 (50%)	26 (100%)	
α₃-Expression			
Polarisierung erhalten	9 (90%)	5 (19%)	0,000
Keine Polarisierung	1 (10%)	21 (81%)	
α₆-Expression			
Polarisierung erhalten	8 (80%)	2 (8%)	0,000
Keine Polarisierung	2 (20%)	24 (92%)	
β₁-Expression (n=30)			
Polarisierung erhalten	6 (86%)	0	0,000
Keine Polarisierung	1 (24%)	23 (100%)	
β₄-Expression (n=34)			
Polarisierung erhalten	8 (80%)	1 (4%)	0,000
Keine Polarisierung	2 (20%)	23 (96%)	
Grenzschicht Tumor/ECM			
α ₆ -Expression (+++)	8 (80%)	11 (42%)	0,047
α ₆ -Expression (-/+ /++)	2 (20%)	15 (58%)	
Lymphknotenstadium			
pN0	6 (60%)	8 (31%)	0,110
pN1	4 (40%)	18 (59%)	
Lymphknotenmetastasen			
pLK ≤ 3	10 (100%)	17 (65%)	0,033
pLK > 3	0	9 (35%)	
Isolierte Tumorzellen in LK (n=33)			
N0 (i-)	0	10 (42%)	0,021
N0 (i+)	9 (100%)	14 (58%)	

* Exakter Test nach Fisher, χ^2 -Test

Die pathohistologischen Parameter und die Resultate der Untersuchungen zur Integrin-Expression für die Patienten der Subgruppe wurden analysiert und der Merkmalsausprägung im Restkollektiv gegenübergestellt (siehe Tabelle 28). Die Tumoren von 9 der 10 Patienten (90%) wiesen eine gute bis mäßige Differenzierung (G1–2) auf, lediglich 1 Tumor war schlecht differenziert (G3). Bei Patienten der Subgruppe wurde im Vergleich zum Restkollektiv seltener eine Lymphknotenmetastasierung (pN1) festgestellt ($p=0,110$), wobei keiner der 10 Patienten mehr als 3 histopathologisch gesicherte Lymphknotenmetastasen aufwies ($p=0,033$) (siehe Abbildung 21). Es fiel auf, dass sich bei sämtlichen Patienten der Subgruppe ($n=9$), deren Lymphknoten mit einem immunhistochemischen Assay auf isolierte Tumorzellen untersucht worden waren, in diesen isolierte Tumorzellen nachweisen ließen. Demgegenüber wiesen im restlichen Kollektiv nur 58% (14/24) der Patienten positive Tumorzellen in ihren Lymphknoten auf ($p=0,021$). Während im Restkollektiv bei 58% (15/26) der

Tumoren entlang der *Grenzschicht Tumor/ECM* eine Niederregulation der α_6 -Expression beobachtet wurde, wiesen 80% (8/10) der Cluster-Patienten in ihren Tumoren am Übergang zum infiltrierten Normalgewebe über eine starke Expression (+++) der α_6 -Untereinheit auf ($p=0,047$).

3.3.8 Einfluss der Integrin-Expression auf das rezidivfreie Überleben der Patienten

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Integrin-Expression und die pathohistologischen Parameter wurden mit Überlebensdaten von 28 der 36 Patienten (78%) korreliert (siehe Abschnitt 2.1). Die Dichotomisierung der Resultate zur Integrin-Expression im Tumorgewebe orientierte sich an der entsprechenden dominierenden Merkmalsausprägung im normalen Epithel (siehe Abschnitt 3.3.1). Bei der Korrelation des Invasionsverhaltens wurden die *Kategorien 1* und *2* zusammengefasst und der *Kategorie 3* gegenübergestellt.

In der *univariaten Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier* zeigten von den pathohistologischen Parametern die *UICC-Stadieneinteilung* und die *Anzahl der histopathologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen (pLK)* eine signifikante Korrelation zum rezidivfreien Überleben der Patienten (siehe Abbildung 25). Patienten der UICC-Stadien I–II ($n=18$) überlebten mit durchschnittlich 47 ± 11 Monaten signifikant länger rezidivfrei gegenüber Patienten der Stadien III–IV ($n=12$), die im Mittel nach 12 ± 5 Monaten ein Rezidiv entwickelten ($p=0,0228$). Patienten ($n=21$), bei denen maximal 3 Lymphknotenmetastasen ($pLK\leq 3$) festgestellt wurden, überlebten mit 45 ± 11 Monaten länger rezidivfrei gegenüber Patienten ($n=7$) mit einer höheren Anzahl befallener Lymphknoten ($pLK>3$) mit 8 ± 3 Monaten ($p=0,0078$). Im Hinblick auf die Integrin-Expression im Tumorgewebe hatten sich die Stärke der α_6 -Expression entlang der *Grenzschicht Tumor/ECM* und die *Polarisierung der β_4 -Expression im Tumorgewebe* als prognostisch signifikante Einflussgrößen erwiesen (siehe Abschnitte 3.3.3 und 3.3.4).

Um zu überprüfen, ob der prognostische Einfluss der Integrin-Expression im untersuchten Patientenkollektiv unabhängig von etablierten prognostischen Parametern ist, wurde eine *multivariate Regressionsanalyse nach Cox* durchgeführt: Neben der Anzahl der regionären Lymphknotenmetastasen besaß allein die α_6 -Expression am direkten Übergang von Tumorgewebe zum infiltrierten Normalgewebe (*Grenzschicht Tumor/ECM*) einen unabhängigen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben der Patienten (siehe Tabellen 29–31). Die starke Expression der α_6 -Untereinheit (+++) am unmittelbaren Tumorrand war mit einem signifikant geringeren Risiko verbunden, zu einem frühen postoperativen Zeitpunkt ein Tumorrezidiv zu entwickeln (relatives Risiko: 0,230; 95% Konfidenzintervall 0,070–0,753). Bei Patienten mit einer Lymphknotenmetastasierung (pN1), die mehr als 3 histopathologisch gesicherte Lymphknotenmetastasen umfasste ($pLK>3$), war das Risiko signifikant erhöht, ein Rezidiv zu entwickeln (relatives Risiko: 4,569; 95% Konfidenzintervall 1,453–14,368).

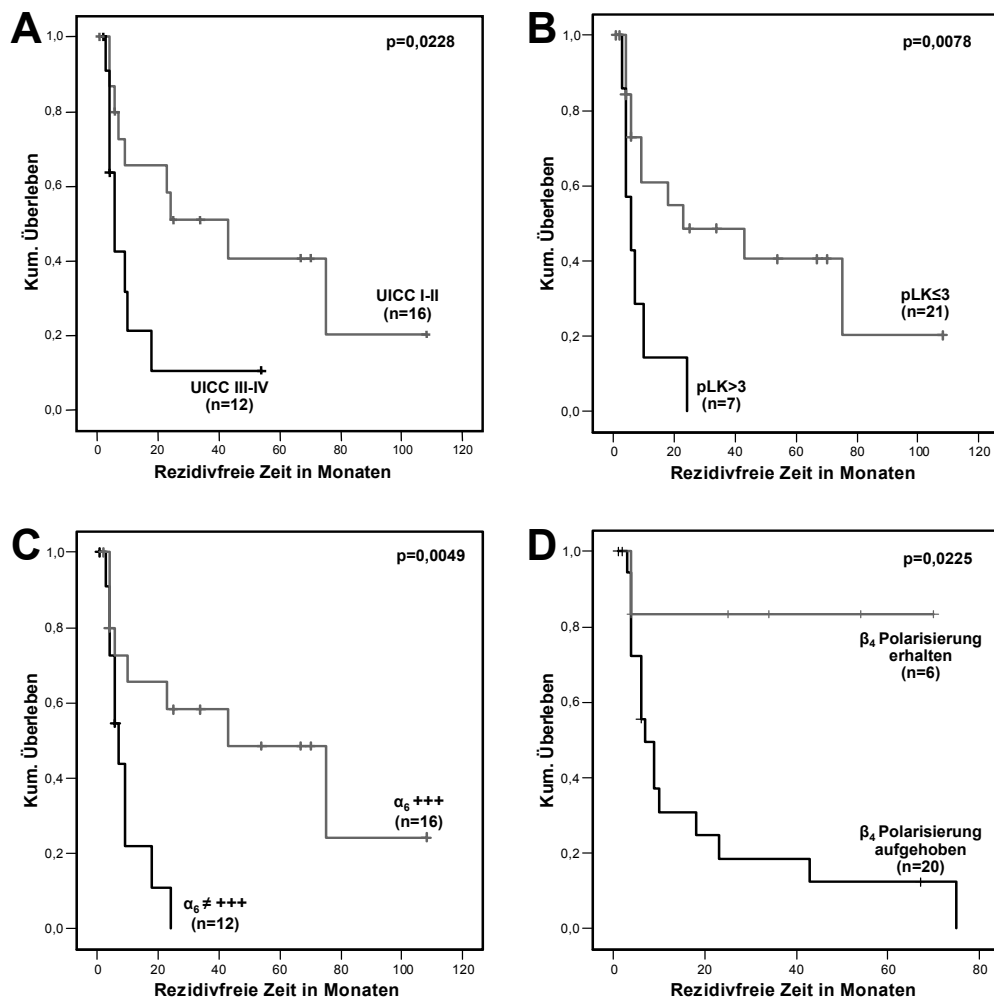


Abbildung 25. Kaplan-Meier-Analysen des rezidivfreien Überlebens (n=28). (A) UICC-Stadien I–II gegenüber UICC III–IV. (B) Anzahl der Lymphknotenmetastasen: pLK ≤ 3 gegenüber pLK > 3. (C) Niederregulation der α₆-Expression am Übergang von Tumor- zum Normalgewebe (*Grenzschicht Tumor/ECM*): Starke Expression (+++) gegenüber mäßiggradiger (++), schwacher (+) oder fehlender Expression (–). (D) Expressionsmuster der β₄-Untereinheit: Erhaltene Polarisierung gegenüber aufgehobener Polarisierung.

Tabelle 29. Cox-Regressionsanalyse des rezidivfreien Überlebens.

Prognosefaktor	Relatives Risiko	95% Konfidenzintervall	p-Wert
Primärtumorstadium (pT) pT1-2 vs. pT3-4	0,876	0,119 – 6,440	0,896
Lymphknotenstadium (pN) pN0 vs. pN1	0,497	0,69 – 3,560	0,486
Lymphknotenmetastasen pLK ≤ 3 vs. pLK > 3	4,569	1,453 – 14,368	0,009
UICC-Klassifikation UICC I-II vs. UICC III-IV	1,653	0,558 – 4,899	0,365
Differenzierungsgrad G1-2 vs. G3-4	1,224	0,227 – 6,594	0,814
α₆-Expression Grenzschrift Tumor/ECM (+++) vs. (- / + / ++)	0,232	0,072 – 0,742	0,014
Polarisierung der β₄-Expression „erhalten“ vs. „aufgehoben“	0,290	0,033 – 2,515	0,261

Tabelle 30. Prognostische Einflussgrößen.

Prognosefaktoren	n Patienten	p-Wert*	
		Univariate Analyse**	Multivariate Analyse***
Primärtumorstadium			
pT1-2	10 (36%)	0,8351	NS
pT3-4	18 (64%)		
Lymphknotenstadium			
pN0	11 (39%)	0,1081	NS
pN1	17 (61%)		
Lymphknotenmetastasen			
pLK ≤ 3	21 (75%)	0,0078	0,009
pLK > 3	7 (25%)		
UICC-Klassifikation			
Stadium I-II	16 (57%)	0,0228	NS
Stadium III-IV	12 (43%)		
Differenzierungsgrad			
G1-2	20 (71%)	0,1617	NS
G3-4	8 (29%)		
Isolierte Tumorzellen (ITC)			
Lymphknoten N0 (i-)	10 (37%)	0,6471	
N0 (i+)	17 (63%)		
Knochenmark M0 (i-)	18 (75%)	0,2746	
M0 (i+)	6 (25%)		
Invasionsmuster			
Kategorie 1-2	8 (29%)	0,7330	
Kategorie 3	20 (71%)		

* Die Korrelation zwischen den Einflussgrößen und dem rezidivfreien Überleben wurden mit dem Log-Rang-Test bestimmt. Ein signifikanter Unterschied wurde für $p < 0,05$ angenommen. NS = nicht signifikant.

** Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier

*** Regressionsanalyse nach Cox

Tabelle 31. Prognostische Einflussgrößen (Fortsetzung).

Prognosefaktoren		n Patienten	p-Wert*	
			Univariate Analyse**	Multivariate Analyse***
Expression: Grenzschicht Tumor/ECM				
α_2 -Untereinheit	(-)	25 (89%)	0,2226	0,014
	(+)	3 (11%)		
α_3 -Untereinheit	(-)	21 (75%)	0,4006	
	(+ / ++)	7 (25%)		
α_6 -Untereinheit	(- / + / ++)	12 (43%)	0,0049	
	(+++)	16 (57%)		
β_1 -Untereinheit	(-)	15 (68%)	0,3629	
	(+ / ++)	7 (32%)		
β_4 -Untereinheit	(- / +)	15 (58%)	0,1175	
	(++)	11 (42%)		
Expression: Invasionsrand				
α_2 -Untereinheit	(-)	6 (21%)	0,2444	
	(+)	22 (79%)		
α_3 -Untereinheit	(- / +)	19 (68%)	0,2248	
	(++ / +++)	9 (32%)		
α_6 -Untereinheit	(- / +)	15 (54%)	0,2740	
	(++ / +++)	13 (46%)		
β_1 -Untereinheit	(- / +)	15 (68%)	0,6056	
	(++ / +++)	7 (32%)		
β_4 -Untereinheit	(-)	7 (27%)	0,9500	
	(+)	19 (73%)		
Polarisierung der Expression				
α_2 -Untereinheit	0	24 (86%)	0,5925	
	1	4 (14%)		
α_3 -Untereinheit	0	15 (54%)	0,2860	
	1	13 (46%)		
α_6 -Untereinheit	0	20 (71%)	0,0504	
	1	8 (29%)		
β_1 -Untereinheit	0	17 (77%)	0,0700	
	1	5 (23%)		
β_4 -Untereinheit	0	20 (77%)	0,0225	
	1	6 (23%)		
Einheitliche Expression				
α_2 -Untereinheit	0	19 (68%)	0,8199	
	1	9 (32%)		
α_3 -Untereinheit	0	16 (57%)	0,2860	
	1	12 (43%)		
α_6 -Untereinheit	0	13 (46%)	0,6863	
	1	15 (54%)		
β_1 -Untereinheit	0	12 (55%)	0,3058	
	1	10 (45%)		
β_4 -Untereinheit	0	9 (35%)	0,2690	
	1	17 (65%)		

* Die Korrelation zwischen den Einflussgrößen und dem rezidivfreien Überleben wurden mit dem Log-Rang-Test bestimmt. Ein signifikanter Unterschied wurde für $p < 0,05$ angenommen. NS = nicht signifikant.

** Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier

*** Regressionsanalyse nach Cox

4 Diskussion

Sowohl das infiltrative Wachstum des Primärtumors als auch die Streuung von Tumorzellen, aus denen im Verlauf einer Tumorerkrankung tödliche Metastasen entstehen können, setzen eine Dysregulation der physiologischen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion voraus. Diese werden in epithelialen Zellverbänden vor allem von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) vermittelt. Beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (OSCC) wurden prognostisch relevante Zusammenhänge u. a. zwischen der Expression von E-cadherin, α - und β -Catenin, CD44v, CEA und ICAM-1 einerseits und dem Tumorstadium, dem infiltrativen Wachstum, der Tumordinfiltration von Blut- und Lymphgefäßen, der Lymphknoten- und Fernmetastasierung und der Entwicklung von Rezidiven andererseits beschrieben [218]. Demgegenüber ist die Expression einer weiteren Klasse von Zelladhäsionsmolekülen und ihre potentielle Bedeutung für die Diagnose und Therapie des Ösophaguskarzinoms bislang nur spärlich untersucht worden – die der Integrine [219, 221-223]. Die Auswirkungen einer aberranten Integrin-Expression auf den Verlauf und die Prognose von soliden Tumoren sind in zahlreichen Arbeiten phänomenologisch wie funktionell untersucht und diskutiert worden [17-20].

In der vorliegenden Untersuchung wurde erstmals beim Ösophagus-Plattenepithelkarzinom simultan die Expression der Integrine $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ im Tumorgewebe untersucht und mit der physiologischen Expression in der korrespondierenden Ösophagasmukosa verglichen. Da sich bei vielen Karzinomen signifikante Wechselbeziehungen zwischen der Expression der untersuchten Integrine und dem infiltrativen Wachstum der Tumoren ergeben hatten, wurde parallel zur Integrin-Expression auch das Invasionsverhalten der Ösophagus-Plattenepithelkarzinome beurteilt.

4.1 Tumormorphologie und Invasionsverhalten

Tumoren mit einem definierten, kontinuierlichen Tumorrand, die sich durch ein eher verdrängendes Wachstum auszeichnen, scheinen seltener zu metastasieren und besäßen demzufolge eine bessere Prognose [237]. Tumoren mit stärker infiltrierendem Wachstum in Form nicht zusammenhängender Tumorzellgruppen weisen hingegen häufiger eine Lymphknoten- oder Fernmetastasierung auf, was für verschiedene Plattenepithelkarzinome im Bereich des Oropharynx sowie für das Magenkarzinom und das kolorektale Karzinom dargelegt werden konnte [238-240]. Roh et al. demonstrierten in einer Studie zum OSCC (n=56) einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Abnabelung von Tumorzellnestern am Invasionsrand (engl. „*budding*“) und der Prognose der Tumorerkrankung (p=0,04). Dabei korrelierte die „Knospung“ von Tumorzellen u. a. mit dem Durchmesser der Tumoren, dem Primärtumorstadium (pT) und dem UICC-Stadium [241]. Sarbia et al. zeigten in einer Studie an 138 operierten OSCC-Patienten, dass zwischen dem Invasionsmuster der Primärtumoren und den 2- bzw. 5-Jahres-Überlebensraten ein signifikanter Zusammenhang bestand (p=0,0011), wobei das Invasionsmuster als ein unabhängiger Prognosefaktor identifiziert wurde [235].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Invasionsverhalten der Primärtumoren (n=36) in Anlehnung an die von Sarbia et al. vorgeschlagenen Kriterien bewertet [235]. Über 75% (27/36) der Tumoren infiltrierten das angrenzende Gewebe in Form von kleinen, losgelösten Tumorzellgruppen (*Kategorie 3*). Demgegenüber drangen 25% der Tumoren (n=6) mit soliden, größeren Tumorzellformationen in das umgebende Stroma vor

(*Kategorie 2*) oder zeigten ein eher verdrängendes Wachstum ($n=3$) mit einem kontinuierlichen Invasionsrand ohne Ablösung von Tumorzellinseln (*Kategorie 1*). Die von Sarbia et al. beschriebene „vollständige Dissoziation“, d.h. die Aufhebung jeglicher struktureller Zusammenschlüsse von Tumorzellen, wurde im untersuchten Tumorkollektiv nicht beobachtet.

Bei der Gegenüberstellung von Invasionsmuster und Primärtumorstadium fiel auf, dass mit fortschreitender Dissoziation der infiltrierenden Tumorzellen der Anteil an Tumoren mit höheren Tumorstadien zunahm. 74% (18/27) der Tumoren der *Kategorie 3* waren den Tumorstadien pT3 oder pT4 zugeordnet worden. Von Tumoren mit strukturell stärker geordnetem Invasionsmuster (*Kategorie 1–2*) entfielen lediglich 44% (4/9) auf die Stadien pT3–4. 83% (20/24) der Tumoren im Stadium pT3–4 wiesen ein Invasionsmuster der *Kategorie 3* auf, während lediglich 58% (7/12) der pT1–2 Tumoren der *Kategorie 3* entsprachen. In der statistischen Analyse war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant ($p=0,112$). Des Weiteren befanden sich alle Tumoren der *Kategorie 1* ($n=3$) in den UICC-Stadien I–II, während die Mehrheit der Tumoren (17/33) mit stärker infiltrativem Invasionsmuster (*Kategorien 2–3*) den Stadien III–IV angehörten. Auch dieser Zusammenhang erwies sich als statistisch nicht signifikant ($p=0,231$).

Beim Ösophaguskarzinom ist der immunhistochemische Nachweis disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark mit einer erhöhten Rezidivrate und einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert [159, 242]. In einer parallel laufenden Studie waren intraoperativ gewonnenes Knochenmark sowie histopathologisch als „tumorfrei“ befundete Lymphknoten immunzyto- bzw. immunhistochemisch auf okkult disseminierte Tumorzellen untersucht worden [158, 225]. Die Primärtumoren von allen Patienten (8/30), bei denen im Knochenmark isolierte Tumorzellen nachgewiesen wurden, wiesen ein infiltratives Wachstum der *Kategorie 3* auf ($p=0,185$). Die Primärtumoren von Patienten mit einer Fernmetastasierung (2/36) zeigten ebenfalls ein infiltratives Wachstum der *Kategorie 3* ($p=0,557$). Beide Zusammenhänge erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Zusammenfassend scheint das Vorliegen eines fortgeschrittenen Tumorstadiums tendenziell häufiger mit einer ausgeprägten strukturellen Dissoziation des infiltrierenden Tumorgewebes assoziiert zu sein. Damit verbunden könnte eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Disseminierung von Tumorzellen bestehen: Fernmetastasen und isolierte Tumorzellen im Knochenmark als Merkmale einer systemischen Ausbreitung der Tumorerkrankung wurden lediglich bei Patienten mit einem Infiltrationsmuster der *Kategorie 3* nachgewiesen.

Sowohl in der Studie von Sarbia et al. als auch in der vorliegenden Untersuchung wies nur ein kleiner Teil der Primärtumoren ein expansives Wachstum mit einem kontinuierlichen Invasionsrand ohne Ablösung von Tumorzellgruppen (*Kategorie 1*) auf. Der hohe Anteil von Tumoren mit infiltrativem Wachstum in Form kleiner Zellgruppen (*Kategorie 3*) fand sich hingegen in der Untersuchung von Sarbia et al. nicht wieder. Dort wiesen die Tumoren am häufigsten (44%) ein Invasionsmuster mit „strangförmigen, soliden Tumorzellformationen“ auf, welches in der vorliegenden Untersuchung dem infiltrativen Wachstum der *Kategorie 2* entspräche. Der signifikante Zusammenhang zwischen Invasionsmuster und postoperativem Überleben, wie von Sarbia et al. gezeigt, konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Dies könnte auf Unterschiede in der Bewertung des Invasionsverhaltens oder auf eine ungleiche Zusammensetzung der Untersuchungskollektive bei unterschiedlich hohen Fallzahlen zurückzuführen sein.

4.2 Integrin-Expression im Plattenepithel des Ösophagus

Die Integrin-Untereinheiten α_2 , α_3 , α_6 , β_1 und β_4 wurden in den basalen Zellschichten des mehrschichtigen Ösophagus-Plattenepithels stets am stärksten exprimiert. Mit der Ausdifferenzierung der Keratinozyten nahm deren Expression vom Stratum basale über das Stratum spinosum und das Stratum squamosum zum Ösophaguslumen hin im Sinne einer Polarisierung graduell ab.

Die Expression der α_6 - und β_4 -Untereinheiten auf den an die Basalmembran grenzenden Zelloberflächen hob sich in allen Präparaten mit einer deutlich stärkeren Färbeintensität von der Anfärbung der übrigen Zellen ab. Unter dem Mikroskop betrachtet imponierte dieser Intensitätsunterschied als eine scharf abgrenzbare, kontinuierliche Linie, die den Verlauf der Basalmembran nachzeichnete. Das gleiche Phänomen ließ sich mit geringeren Intensitätsunterschieden auch bei 83% (15/18) der Präparate für die α_3 -Untereinheit feststellen. In den α_2 -gefärbten Schnittpräparaten fand sich auf den basalen Zelloberflächen keine verstärkte Anfärbung, während bei 44% (7/16) der untersuchten Epithelien eine verstärkte β_1 -Expression im Bereich der Basalmembran beobachtet wurde. In den als Positivkontrollen verwendeten Schnittpräparaten aus Colonmukosa zeigte sich auf den basalständigen Enterozyten mit Ausnahme der α_2 -Untereinheit ebenfalls eine fokal verstärkte Expression für alle Untereinheiten. Wie in der Ösophagasmukosa grenzte sich die Expression der α_6 - und β_4 -Untereinheit am deutlichsten ab.

Da Laminin als Ligand der untersuchten Integrine in mehrschichtigen Epithelien ausschließlich in der Basalmembran vorkommt, vermutete Bosman, dass die Funktion der Heterodimere $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ als Laminin-Rezeptoren deren verstärkte Expression auf den basalständigen Zelloberflächen von Epithelien bedingt [186]. Auch Watt et al. beschrieben in ihren Arbeiten zur Architektur von Plattenepithelien für den Ösophagus wie für die Epidermis und andere Epithelien eine konstante $\alpha_6\beta_4$ -Expression auf den Keratinozyten mit unmittelbarem Kontakt zur Basalmembran [243]. Als wesentliche Komponente der Hemidesmosomen, die in normalen Epithelien ausschließlich auf den basalen Zelloberflächen vorkommen, verbindet das Integrin $\alpha_6\beta_4$ die Intermediärfilamente des Zytoskeletts mit dem Laminin der Basalmembran [200]. Wie $\alpha_2\beta_1$, dem in erster Linie eine Funktion als Zell-Zell-Rezeptor zugeschrieben wird, wird auch $\alpha_3\beta_1$ in organisierten epithelialen Zellverbänden als Bestandteil von fokalen Adhäsionsstellen (Fokalkontakten) in allen Schichten des Epithels exprimiert [244].

Während in der Epidermis außerhalb der basalen Zellschichten keine Expression der untersuchten Integrine beobachtet wurde [245], ähnelt die Integrinexpression in der Ösophagasmukosa am ehesten jener im mehrschichtigen Plattenepithel der Mundhöhle [246, 247]. Die Plattenepithelien des oberen Verdauungstrakts weisen im Vergleich zur Epidermis eine höhere Zellumsatzrate auf [248], welche sich in einer über alle Zellschichten ausgeprägten Integrinexpression widerspiegeln und damit auf die Bedeutung der Integrine für die Proliferation von epithelialen Zellen hinweisen könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Untersuchung der Arbeitsgruppe von Dobson, die an 18 Biopsaten aus der Ösophagasmukosa von 6 Patienten immunhistochemisch die Expression der Integrin-Untereinheiten α_2 , α_3 , α_6 , β_1 und β_4 analysiert hatten [206]. Die Autoren beobachteten ebenfalls eine Abnahme der Färbeintensität, je weiter die Keratinozyten in Richtung des Lumens gewandert waren. Dabei waren die Unterschiede zwischen den basalständigen Zellen mit einer intensiven Anfärbung und den nur geringgradig

angefärbten ausgereiften Zellen bei der α_6 - und β_4 -Untereinheit ebenfalls am stärksten ausgeprägt. Aufgrund unterschiedlicher Bewertungskriterien konnten die Färbeergebnisse der Studie von Dobson nicht unmittelbar mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit verglichen werden. Allerdings stimmen die von Dobson beschriebenen Expressionsmuster mit den vorliegenden Beobachtungen überein, so dass bei den untersuchten Integrin-Untereinheiten von einer physiologischen Polarisierung der Expression im Plattenepithel des Ösophagus ausgegangen werden kann. Weiter scheinen die Integrine $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ – nicht aber $\alpha_2\beta_1$ – auf den Zelloberflächen der basalständigen Keratinozyten mit direktem Kontakt zur Basalmembran regelhaft verstärkt exprimiert zu sein.

4.3 Integrin-Expression beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

In der vorliegenden Studie sind im Wesentlichen zwei Aspekte der Integrin-Expression beim OSCC untersucht worden: *Quantitativ* die Ausprägung der Integrin-Expression (*Expressionsstärke*) in verschiedenen Bereichen der Primärtumoren und *qualitativ* die Verteilung der Integrine im Tumorgewebe (*Expressionsmuster*). Bei der Beurteilung der Integrin-Expression wurde schnell ersichtlich, dass neben dem häufig beobachteten Fehlen eines geordneten, polarisierten Integrin-Expressionsmusters im Tumorgewebe auch der exakten Lokalisierung der Alterationen im Expressionsverhalten eine besondere Bedeutung zukommen würde. Dabei stach vor allem der unmittelbare Invasionsrand der Tumoren heraus, wo sich die Integrin-Expression bei einem Teil der Tumoren deutlich vom übrigen Tumorgewebe abhob. Bei mehreren Plattenepithelkarzinomen besitzt insbesondere die Expression molekularer Marker am unmittelbaren Invasionsrand einen signifikanten Einfluss auf die Prognose der Tumoren [249], so dass der Untersuchung der Integrin-Expression am Übergang vom Tumorgewebe zum infiltrierten Normalgewebe eine besondere Aufmerksamkeit gewidmet wurde.

4.3.1 Expression des Integrins $\alpha_2\beta_1$

Da die α_2 -Untereinheit nur mit β_1 ein Heterodimer bildet, wurde der Expression des $\alpha_2\beta_1$ -Integrins anhand des Expressionsverhaltens der α_2 -Untereinheit beurteilt [14]. Über die genaue Funktion des Integrins, welches neben Laminin auch Kollagen binden kann und in fast allen epithelialen Geweben exprimiert wird, ist bislang wenig bekannt [250]. Allerdings wird $\alpha_2\beta_1$ eine wichtige Funktion beim Aufbau von Zell-Zell-Kontakten zugeschrieben [20], so dass die verminderte Expression des Integrins in Tumoren mit einer geringeren strukturellen Organisation und einer schlechten Differenzierung einhergehen könnte [251].

Die Mehrzahl der untersuchten Tumoren wies eine unpolarisierte und gleichförmige α_2 -Expression auf: Bei 86% (31/36) der Patienten war die polarisierte Expression, wie sie im Epithel beobachtet wurde, einem homo- oder heterogenen Expressionsmuster gewichen. 78% (28/36) der Patienten wiesen im Tumorgewebe die gleiche Expressionsstärke auf, wie sie im normalen Ösophagusepithel vorherrschte. Bei lediglich einem Tumor wurde keine α_2 -Expression im Sinne einer Niederregulation festgestellt. 94% (34/36) der untersuchten Tumoren wiesen im gesamten Tumorgewebe eine einheitliche Expressionsstärke auf. Eine Überexpression der α_2 -Untereinheit wurde bei 19% (7/36) der Patienten beobachtet und korrelierte signifikant mit einem höheren Primärtumorstadium (pT3-4) ($p=0,041$).

Die meisten Arbeiten zur Integrin-Expression von soliden Tumoren wurden beim Mammakarzinom

durchgeführt. Die beschriebene, tendenziell gleichförmige Expression der α_2 -Untereinheit beim Ösophagus-Plattenepithelkarzinom findet sich bei einem Teil der Mammakarzinome als „uniforme“ α_2 -Expression wieder [252]. Während $\alpha_2\beta_1$ in prä-neoplastischen Läsion und Fibroadenomen der Brustdrüse durchweg exprimiert wurde, zeigte sich bei invasiven Tumoren häufig eine Niederregulation oder der vollständige Verlust des Integrins, was in mehreren Studien signifikant mit einer schlechten Differenzierung der Tumoren assoziiert war [20, 253, 254]. In einer Studie zum Magenkarzinom hingegen korrelierte die erhaltene Expression von $\alpha_2\beta_1$ positiv mit der Lymphknotenmetastasierung und stellt möglicherweise einen unabhängigen Prognosefaktor für die Entwicklung von Lebermetastasen dar. Allerdings zeigte sich analog zum colorektalen Karzinom bei über 70% der Magenkarzinome ein Verlust des $\alpha_2\beta_1$ -Integrins [210, 255].

Das Expressionsverhalten der Integrine bei Plattenepithelkarzinomen ist bisher am besten an der Haut und im Oropharynx untersucht worden. Im Gegensatz zu den Adenokarzinomen wird $\alpha_2\beta_1$ beim Basalzellkarzinomen der Haut stärker exprimiert als in der normalen Epidermis, wobei Tumoren nur vereinzelt durch einen vollständigen Verlust des Integrins auffallen [256]. Bei den untersuchten Ösophagustumoren war die Polarisierung der α_2 -Expression im normalen Epithel im Vergleich zu den übrigen Einheiten geringer ausgeprägt, wodurch der Eindruck einer gleichmäßigeren Expression entstand. Im Hinblick auf die stabile Expression von $\alpha_2\beta_1$ in Plattenepithelkarzinomen insgesamt könnte dies auf eine besondere Bedeutung des Integrins für die Stabilisierung von Zell-Zell-Verbindungen hindeuten. Möglicherweise besitzt der Erhalt der $\alpha_2\beta_1$ -Expression in der Genese von Plattenepithelkarzinom einen anderen Stellenwert als in der Entwicklung von Adenokarzinomen, bei denen häufig eine Niederregulation oder der Verlust der α_2 -Expression beobachtet wird.

Eine verstärkte Expression im Epithel, wie sie bei den übrigen Untereinheiten regelmäßig entlang der Basalmembran beobachtet wird, wurde bei der α_2 -Untereinheit nicht beobachtet. Lediglich bei einzelnen Patienten (3/36) hob sich die Expression an der unmittelbaren Invasionsfront der Tumoren als *Grenzschicht* vom übrigen Tumorgewebe ab. Auch diese Beobachtung könnte auf eine besondere Bedeutung der Expression von $\alpha_2\beta_1$ für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten hinweisen, während bei den Integrinen $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ insgesamt eher die Zell-Matrix-Interaktion im Vordergrund zu stehen scheint.

4.3.2 Expression des Integrins $\alpha_3\beta_1$

Die α_3 -Untereinheit wird nur als $\alpha_3\beta_1$ -Heterodimer exprimiert, so dass die Expression des $\alpha_3\beta_1$ -Integrins anhand des Expressionsverhaltens der α_3 -Untereinheit beurteilt werden konnte [14]. Dem $\alpha_3\beta_1$ -Integrin, welches neben Laminin auch Kollagen IV und Fibronectin bindet, wird eine wichtige Funktion für die Zellmotilität zugeschrieben [244, 257, 258]. *In vitro* wurde das $\alpha_3\beta_1$ -Integrin insbesondere an den endständigen Zellfortsätzen von wandernden Tumorzellen, den so genannten Invadopodien, beobachtet [244]. Durch Regulation der Aktivität von Metallo-Matrixproteinasen (MMPs) und Plasminogen-Aktivator-Rezeptoren (PARs) ist $\alpha_3\beta_1$ an der Umgestaltung der ECM beteiligt – Voraussetzung für das invasive Wachstum und die Migration von Tumorzellen [193-195]. Gleichwohl ist $\alpha_3\beta_1$ neben $\alpha_6\beta_4$ der einzige Integrin-Rezeptor für einen Hauptbestandteil der Basalmembran, Laminin-5, und scheint mit seiner ausgeprägten Expression auf basalständigen Keratinozyten auch an der festen Verankerung von Plattenepithelien am unterliegenden Bindegewebe beteiligt zu sein [259]. Im Gegensatz zu kultivierten Zellen aus gesundem Gewebe besitzen Tumorzellen die Fähigkeit, sich auf Laminin-5 beschichteten Oberflächen gerichtet fortzubewegen [258]. Auf Laminin kultivierte Karzinomzellen

waren darüber hinaus in der Lage, artifizielle Basalmembranen bzw. Matrixstrukturen zu durchdringen, was jeweils mit der Stärke der α_3 -Expression korrelierte und mithilfe von Antikörpern, die gegen die α_3 -Untereinheit gerichtet sind, unterbunden werden konnte [260, 261]. Demgegenüber bewirkte in einer anderen Studie die Niederregulation des $\alpha_3\beta_1$ -Integrins, dass Tumorzellen *in vitro* einen Phänotyp entwickeln, der *in vivo* metastasierenden Tumorzellen des jeweiligen Tumortyps glich. Die Niederregulation wurde interessanterweise durch die Aktivierung des Onkogens *N-myc* induziert [262, 263].

Bei 10 von 36 untersuchten Patienten (28%) wurde eine Überexpression der α_3 -Untereinheit im Tumorgewebe beobachtet. 9 dieser Tumoren waren den Stadien pT3-4 zugeordnet worden ($p=0,069$). Lediglich ein Primärtumor (3%) wies den vollständigen Verlust der α_3 -Untereinheit auf. Auch bei Basalzellkarzinomen der Haut wird $\alpha_3\beta_1$ stärker exprimiert als in der normalen Epidermis und ein Verlust ebenfalls nur selten beobachtet [256]. Bei Plattenepithelkarzinomen scheint der Verlust des $\alpha_3\beta_1$ -Integrins wie im Falle von $\alpha_2\beta_1$ ein seltenes Ereignis zu sein. In einer Studie zum Adenokarzinom des Magens exprimierten demgegenüber nur etwa 20% der Fälle $\alpha_3\beta_1$, wobei die Expression des Integrins mit der Invasionstiefe der Tumoren und der Metastasierung in Leber und Bauchhöhle assoziiert war [255]. So könnte bei einigen Karzinomen die erhaltene bzw. bei Plattenepithelkarzinomen die gesteigerte Expression von $\alpha_3\beta_1$ im Tumorgewebe mit einem aggressiveren infiltrativen Wachstum assoziiert sein, welches sich u. a. in einem hohen Primärtumorstadium äußern würde. Andererseits kann auch die Niederregulation von $\alpha_3\beta_1$ den Verlauf maligner Tumorerkrankungen beeinflussen: Bei der Entwicklung colorektaler Karzinome zeigt sich auf Adenomen zunächst eine Reduktion der α_3 -Expression, während die Mehrzahl der invasiven Karzinome einen vollständigen Verlust der α_3 -Untereinheit aufweist [209]. Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom und insbesondere bei den Adenokarzinomen der Lunge ist die Niederregulation von $\alpha_3\beta_1$ mit einer schlechteren Prognose assoziiert [212].

In den angeführten Studien korrelierten invasives Wachstum und Metastasierung sowohl mit einer Überexpression als auch mit einer Niederregulation bzw. dem Verlust des Integrins. Damit scheint die Expression von $\alpha_3\beta_1$ in vielen Fällen Einfluss auf das infiltrative Wachstum und die Metastasierung von soliden Tumoren zu nehmen, ohne dass dem Integrin ein einheitlicher Effekt zugeschrieben werden kann. Möglicherweise spielt die exakte Lokalisierung der alterierten Expression eine entscheidende Rolle dabei, wie sich eine bestimmte Veränderung auswirken kann.

Während mit 83% (15/18) im Ösophagusepithel der Patienten regelmäßig eine verstärkte Expression auf den basalständigen Zelloberflächen (*Grenzschicht Epithel/BM*) beobachtet wurde, spiegelte sich diese bei nur 25% (9/36) der Patienten am Invasionsrand der Tumoren als *Grenzschicht Tumor/ECM* wider ($p=0,0002$). Das Fehlen einer fokal verstärkten Expression bei 75% (27/36) der Patienten war jedoch mit keinem der pathohistologischen Parameter assoziiert. Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle weisen ebenfalls eine reduzierte Expression oder den vollständigen Verlust der Integrine $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ am Invasionsrand auf, was im Fall von $\alpha_6\beta_4$ mit einer schlechten Differenzierung der Tumoren assoziiert ist [264]. Auch in der vorliegenden Studie ergab sich ein Zusammenhang zwischen der verminderten Expression der α_6 -Untereinheit am unmittelbaren Invasionsrand und einer schlechten Differenzierung der Tumoren, ohne jedoch signifikant zu sein ($p=0,083$). Obwohl bei 76% (13/17) der Patienten die Niederregulation der α_6 -Untereinheit an der Grenze vom Tumor- zum Normalgewebe mit einer verminderten α_3 -Expression zusammenfiel, ergab sich hier keine signifikante Übereinstimmung.

Die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass – im Einklang mit Studien zu anderen Tumorentitäten – Veränderungen der α_3 -Expression auch beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus das Invasionsverhalten der Tumoren beeinflussen können. Möglicherweise hebt der Verlust der randständig betonten α_3 -Expression die strukturstabilisierende Wirkung von $\alpha_3\beta_1$ auf, so dass eine Überexpression im übrigen Tumorgewebe, die gegebenenfalls die pro-migratorischen bzw. pro-invasiven Eigenschaften des Integrins herausstellt, zu einem stärkeren infiltrativen Wachstum beitragen könnte. Auch dies spräche dafür, dass die exakte Lokalisierung der veränderten Expression ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung des Expressionsverhalten ist.

4.3.3 Expression der Integrine $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$

Bei soliden Tumoren werden Veränderungen im Expressionsverhalten der α_6 -Integrine besonders häufig beobachtet. $\alpha_6\beta_1$ ist als Lamininrezeptor an der stabilen Verankerung epithelialer Zellen an der ECM beteiligt und scheint im Zusammenwirken mit $\alpha_6\beta_4$ auch das Migrationsverhalten von Tumorzellen zu beeinflussen [265]. Untersuchungen zum Mammakarzinom deuten auf eine mögliche Rolle von $\alpha_6\beta_1$ bei Aktivierung des Transkriptionsfaktors *HIF-1* (*Hypoxia-inducible factor 1*) hin, der eine zentrale Funktion bei der Anpassung von Tumoren an die hypoxischen Milieubedingungen in ihrem Umfeld zu besitzen scheint [266]. Über *HIF-1* wäre $\alpha_6\beta_1$ darüber hinaus auch an der Expression von *Vascular endothelial growth factor* (*VEGF*) beteiligt, der in Tumoren u. a. Angiogenese induzieren und stimulieren kann [267].

Die Expression des Integrins $\alpha_6\beta_4$ als Bestandteil der Hemidesmosomen ist essentiell für eine stabile Anheftung epithelialer Zellverbände an das Substratum [268]. Mercurio und Rabinovitz haben $\alpha_6\beta_4$ als eine „funktionale Anomalie“ unter den Integrinen bezeichnet und weisen damit auf die besondere Rolle von $\alpha_6\beta_4$ als Signaltransduktor hin. Über die intrazytoplasmatische Domäne der β_4 -Untereinheit ist $\alpha_6\beta_4$ in normalen wie in neoplastischen epithelialen Zellen an der Regulation von zahlreichen Signalwegen beteiligt – unabhängig von einer Adhäsion an Matrixstrukturen. Durch Koexpression mit Rezeptor-Tyrosinkinasen wie den EGF-Rezeptoren oder dem HGF-Rezeptor Met und die simultane Stimulation der GTPasen Rho und Rac übt $\alpha_6\beta_4$ über unterschiedliche Signalwege Einfluss auf das Migrations- bzw. Invasionsverhalten dieser Zellen aus [269-271]. Über die Shc/Grb2/Sos/Ras-Signalkaskade und die Aktivierung des MAPK-Signalwegs ist $\alpha_6\beta_4$ außerdem an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und beeinflusst damit letztendlich auch die Proliferation von Tumorzellen. Innerhalb dieses Signalnetzwerks nimmt die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-K) eine zentrale Position ein [272]. Über die Aktivierung des PI3-K/Akt-Signalwegs kann das Expressionsverhalten von $\alpha_6\beta_4$ das Überleben von Tumorzellen in Stress-Situationen begünstigen, wie z. B. bei Gewebhypoxie [267]. Somit ist die Expression des Integrins $\alpha_6\beta_4$ nicht nur von Bedeutung für eine stabile Verankerung epithelialer Zellverbände am Substratum, sondern scheint vielmehr ein Regulator zentraler Zellfunktionen wie Wachstum oder ektopem Überleben zu sein.

Die α_6 -Integrine wurden im Untersuchungskollektiv von allen Primärtumoren in sämtlichen Tumorbereichen exprimiert und wiesen insgesamt die stärkste Expression aller Untereinheiten auf. Im Gegensatz zur strikt polarisierten α_6 -Expression im normalen Plattenepithel wiesen die Tumoren mehrheitlich eine homogene, unpolarisierte Expression der α_6 -Integrine auf: 83% (30/36) der Primärtumoren besaßen im gesamten Tumorgewebe eine einheitliche Expressionsstärke und mit 72% (26/36) war die Polarisierung der α_6 -Expression im Tumorgewebe mehrheitlich zugunsten einer homogenen oder heterogenen Expression aufgehoben.

Da die α_6 -Untereinheit sowohl mit β_1 als auch mit β_4 ein Heterodimer bilden kann, musste die Expression der α_6 -Integrine voneinander abgegrenzt werden. Die α_6 -Untereinheit wurde wie β_1 beinahe ubiquitär exprimiert, was auf eine basale Expression des $\alpha_6\beta_1$ -Integrins im Tumorgewebe schließen lässt [205]. Die β_4 -Untereinheit als Marker für die Expression des $\alpha_6\beta_4$ -Heterodimers weist in Epithelien hingegen eine ausgeprägte basale Betonung der Expression auf und wurde in 28% (10/36) der untersuchten Präparate ausschließlich an den unmittelbaren Tumorrändern beobachtet. In der hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse zeigte insbesondere das Expressionsverhalten der α_6 - und der β_4 -Untereinheit in den Übergangsbereichen zur ECM (*Grenzschicht Epithel/ECM* und *Grenzschicht Tumor/ECM*) eine hohe Übereinstimmung, so dass am unmittelbaren Tumorrand die Expression von $\alpha_6\beta_4$ gegenüber $\alpha_6\beta_1$ überwiegen könnte. Im übrigen Tumorgewebe grenzten sich die Expressionsmuster von α_6 , β_1 und β_4 nicht deutlich voneinander ab, so dass $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ dort wahrscheinlich simultan exprimiert werden. Die Koexpression der beiden Integrine im Tumorgewebe, wie sie auch bei Plattenepithelkarzinomen im Bereich des Mund- und Rachenraums beobachtet wird, würde die insgesamt stärkere Expression der α_6 -Untereinheit erklären [273].

Das Expressionsverhalten der Untereinheiten α_6 und β_4 entlang der Invasionsränder unterschied sich deutlich von dem der übrigen Integrine: Nirgends im Epithel oder Tumorgewebe zeigte sich eine stärkere Integrin-Expression. Bei 97% (35/36) und 94% (32/34) der Primärtumoren zeichnete sich am Invasionsrand eine verstärkte Expression der α_6 - und β_4 -Untereinheit ab (*Grenzschicht Tumor/ECM*), die sich jeweils in allen analysierten Epithelien (19/19) auf den basalständigen Zellen des Plattenepithels wieder fand (*Grenzschicht Epithel/Basalmembran*). Der Verlust der starken α_6 -Expression (+++) am Tumorrand, wie sie im normalen Epithel mehrheitlich am Übergang zur Basalmembran beobachtet wurde, war mit einer signifikant schlechteren Prognose der Tumorerkrankung verbunden: 47% (17/36) der Patienten besaßen mit der Niederregulation ein signifikant verkürztes rezidivfreies Überlebensintervall ($p=0,0049$). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Expression des $\alpha_6\beta_4$ -Integrins entlang der Invasionsränder auch beim Ösophagus-Plattenepithelkarzinom einen starken Einfluss auf die Ausprägung und den Verlauf der Tumorerkrankung besitzt, wie dies bereits für das Mamma-, Magen- und Colonkarzinom und für mehrere Plattenepithelkarzinome beschrieben worden ist [274]. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von $\alpha_6\beta_4$ entlang der Tumorränder und dem Grading (G) der untersuchten Tumoren: Primärtumoren mit einer geringen Differenzierung (G3–4) zeigten häufiger eine Niederregulation der α_6 -Expression entlang der Tumorränder als Patienten mit besser differenzierten Tumoren (G1–2) ($p=0,083$). Lediglich bei Tumoren mit einer schlechten Differenzierung (G3–4) wurde eine Niederregulation der β_4 -Expression am direkten Invasionsrand (2/9) beobachtet, während sämtliche Tumoren mit einer besseren Differenzierung (G1–2) eine fokal verstärkte Expression an den Tumorrändern aufwiesen ($p=0,037$), welche in 41% der Fälle (11/27) die im normalen Epithel vorherrschende Expressionsstärke übertraf ($p=0,046$). Auch der Nachweis eines polarisierten Expressionsmusters tritt in diesem Zusammenhang als potentiell differenzierungsmerkmal in Erscheinung: 80% (8/10) der Primärtumoren mit polarisierte Expression der α_6 -Untereinheit wiesen gleichzeitig eine starke α_6 -Expression am unmittelbaren Invasionsrand auf, wohingegen lediglich 42% (11/26) der nicht-polarisiert exprimierenden Tumoren an gleicher Stelle eine starke α_6 -Expression besaßen ($p=0,047$).

Chemotaktische Stimuli, z. B. EGF, bewirken in kultivierten Tumorzellen eine rasche Auflösung der Hemidesmosomen und gehen mit der Ausbildung von Lamellipodien und Auffaltungen der Zellmembran

(engl. „membrane ruffles“) einher, die $\alpha_6\beta_4$ inkorporieren und besonders auf motilen Tumorzellen zu finden sind [272]. Möglicherweise vermittelt $\alpha_6\beta_4$ auch *in vivo* eine pro-invasive Wirkung, wenn es unabhängig von den Hemidesmosomen exprimiert wird – beispielsweise in Tumorbereichen ohne Kontakt zur ECM. Die Aufhebung der polarisierten Expression von $\alpha_6\beta_4$ im Tumorgewebe und der Verlust der verstärkten Expression des Integrins am Invasionsrand könnten mit einer Auflösung der Hemidesmosomen einhergehen, so dass – wie in funktionalen Untersuchungen demonstriert – eine persistierende Expression bzw. Überexpression von $\alpha_6\beta_4$ im Tumorgewebe zu einem pro-migratorischen Verhalten der Tumorzellen beitragen könnte.

Das UICC-Stadium hatte sich in der vorliegenden Studie als prognostisch relevante Einflussgröße erwiesen ($p=0,0228$). Eine ausgeprägte Expression der β_1 - und β_4 -Untereinheiten an den Invasionsrändern der Tumoren war häufig mit einem niedrigen Krankheitsstadium (UICC I–II) assoziiert ($p=0,086$ und $p=0,071$). Interessanterweise war die verstärkte Expression der β_1 -Untereinheit an den Tumorrändern außerdem signifikant seltener mit einer Lymphknotenmetastasierung (pN1) assoziiert: Wiesen 55% (6/11) der Patienten ohne Lymphknotenbefall (pN0) eine stärkere β_1 -Expression als im Epithel auf, zeigte sich dies bei lediglich 12% (2/17) der mit pN1 eingestuften Tumoren ($p=0,018$). Auch Takayama et al. beschrieben eine Korrelation zwischen der geringen β_1 -Expression beim Ösophagus-Plattenepithelkarzinom und der Entwicklung von Lymphknotenmetastasen ($p<0,01$) [223]. In der Untersuchung von 71 Primärtumoren war die Expression von β_1 außerdem mit dem Primärtumorstadium und der Infiltration von Blut- und Lymphgefäßen assoziiert ($p<0,05$). Darüber hinaus zeigte sich in den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen eine im Vergleich zu den Primärtumoren signifikant reduzierte β_1 -Expression ($p<0,05$).

In der vorliegenden Arbeit wiesen Tumoren mit einer hohen Anzahl befallener Lymphknoten ($pLK>3$) weder eine polarisierte Expression der β_1 - noch der α_6 -Untereinheit auf, wobei lediglich die Polarisierung der α_6 -Expression signifikant mit einer geringeren Anzahl oder dem Ausbleiben von Lymphknotenmetastasen ($pLK\leq 3$) korrelierte ($p=0,033$). Die Ausprägung eines polarisierten Expressionsmusters impliziert, dass auf den randständigen Zellen der Tumoren eine stärkere Expression der α_6 -Untereinheit vorliegt. Da für α_2 und α_3 als potentielle Partner der β_1 -Untereinheit keine vergleichbaren Beobachtungen vorliegen, besitzt die Expression von $\alpha_6\beta_1$ möglicherweise einen spezifischen Einfluss auf die Ausbreitung der Tumoren in das lymphatische System.

Wie bei $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_3\beta_1$ scheint auch die Überexpression der α_6 -Integrine tendenziell mit einem höheren Primärtumorstadium (pT3–4) assoziiert zu sein. Lediglich 25% (3/12) der Tumoren im Stadium pT1–2 wiesen eine Überexpression der α_6 -Integrine auf, wohingegen 54% (13/24) der Tumoren im Stadium pT3–4 eine gegenüber dem Epithel verstärkte α_6 -Expression zeigten. Der Zusammenhang war jedoch nicht signifikant ($p=0,095$). Tumoren mit einer verstärkten Expression des $\alpha_6\beta_4$ -Integrins in Arealen ohne direkten Kontakt zur ECM besitzen möglicherweise ein gesteigertes proliferatives Potential: Bei der Psoriasis ist die erhöhte Zellumsatzrate in der Epidermis mit einer suprabasalen Expression des $\alpha_6\beta_4$ -Integrins assoziiert [275]. Umgekehrt könnten Tumoren mit Betonung der basalständigen $\alpha_6\beta_4$ -Expression an der Grenze zur ECM ein Teilungsverhalten aufweisen, welches eher der Proliferation im gesunden Epithel entspräche. Obwohl die β_1 -Expression in den zentraleren Tumoranteilen im Vergleich zur zumeist polarisierten β_4 -Expression stärker ausgeprägt war, wäre der mögliche proliferative Aspekt einer verstärkten α_6 -Expression im Tumorgewebe eher auf eine Überexpression von $\alpha_6\beta_4$ zurückzuführen: Die Wirkung des $\alpha_6\beta_4$ -Integrins auf die Zellzyklus-

Progression in epithelialen Zellen konnte in den Untersuchungen von Maniero et al. nicht von β_1 -Integrinen ausgelöst werden [276]. Beispielsweise sind Tumorzellen, die über kein funktionsfähiges p53-Protein verfügen, in der Lage, durch $\alpha_6\beta_4$ -vermittelte Aktivierung des PKB/Akt-Signalwegs der Apoptose zu entgehen und zu proliferieren [277, 278]. Es ist vorstellbar, dass die alterierte Expression von $\alpha_6\beta_4$ gemeinsam mit der bei soliden Tumoren häufig beobachteten Mutation von p53 in einem ungehemmten und starken Tumorzellwachstum münden könnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Expression der α_6 -Integrine von allen untersuchten Integrinen den bedeutendsten Einfluss auf die phänotypische Ausprägung der Ösophagustumoren besitzt. Insbesondere das Expressionsverhalten von $\alpha_6\beta_4$ entlang der Tumorränder und die erhaltene Polarisierung des Integrins im Tumorgewebe scheinen im untersuchten Kollektiv mit einer lokalen Begrenzung der OSCC verknüpft gewesen zu sein. Damit könnte die polarisierte Expression der α_6 -Integrine und insbesondere die geordnete Expression von $\alpha_6\beta_4$ nicht nur einen zusätzlichen Marker für die phänotypischen Charakterisierung der Tumoren darstellen, sondern darüber hinaus auch zur Bemessung der Prognose der Tumorerkrankung beitragen.

4.3.4 Alterationen im Expressionsmuster der Integrine

In seiner Übersichtsarbeit zur Rolle der Integrine beim Mammakarzinom hat Mizejeweski anhand von immunhistochemischen Untersuchungen die Muster der Integrin-Expression bei unterschiedlichen Karzinomen analysiert [20]. Er beobachtete, dass anstelle der geordneten Expression im epithelialen Ursprungsgewebe im Tumorgewebe häufig eine heterogene, ungeordnete Expression tritt. Untersuchungen an kultivierten Tumorzellen sprechen für einen wesentlichen Zusammenhang zwischen dem Muster der Integrin-Expression und der Differenzierung von Karzinomen: Die Gruppe von Bosman fand heraus, dass sich das Expressionsverhalten von $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ zwischen differenzierten und undifferenzierten Tumorzellen der Kolonkarzinomzelllinien Caco-2 und HT29 nicht so sehr in der Stärke der Expression unterscheidet als vielmehr in der Verteilung der exprimierten Integrine. Während in undifferenzierten Zellverbänden eine gleichförmige Integrinexpression beobachtet werden kann, zeigt sich mit zunehmender Differenzierung der Tumorzellen eine polarisierte Verteilung der Integrine [186].

Bei den untersuchten Primärtumoren zeigte sich im Tumorgewebe mehrheitlich eine ungeordnete, heterogene Integrin-Expression. Jedoch wurde die physiologische Polarisierung, wie sie im mehrschichtigen Plattenepithel des Ösophagus auftritt, bei einem Teil der Patienten auch im Tumorgewebe beobachtet. Am häufigsten war die Polarisierung der α_3 -Untereinheit erhalten: 39% (14/36) der Tumoren besaßen ein polarisiertes Expressionsmuster. Lediglich 14% (5/36) der Tumoren zeigten eine polarisierte α_2 -Expression und 20% (6/30) eine polarisierte β_1 -Expression. Mit 28% (10/36) und 26% (9/34) wies etwa der gleiche Prozentsatz der Patienten eine Polarisierung der α_6 - bzw. β_4 -Expression im Tumorgewebe auf.

Ogleich lediglich die β_4 -Expression signifikant mit der Entwicklung eines Rezidivs assoziiert gewesen ist, könnte das Expressionsverhalten der Integrine $\alpha_6\beta_4$ und $\alpha_6\beta_1$ über ihren potentiellen Einfluss auf die lymphatische Ausbreitung der Tumoren hinaus auch bei der Entstehung von Tumorrezidiven eine Rolle zu spielen: Die polarisierte α_6 -, β_1 - und β_4 -Expression im Tumorgewebe war jeweils mit einem verlängerten

rezidivfreien Überlebensintervall assoziiert ($p=0,0504$; $p=0,0700$; $p=0,0225$). Mit im Mittel 59 ± 10 Monaten überlebten Patienten mit polarisierter β_4 -Expression deutlich länger rezidivfrei als Patienten ohne Polarisierung, bei denen nach durchschnittlich 19 ± 6 Monaten ein Tumorrezidiv festgestellt wurde ($p=0,0225$). Auch Rabinovitz und Mercurio haben einen Zusammenhang zwischen dem Verlust der polarisierten Expression des $\alpha_6\beta_4$ -Integrins und der Ausprägung eines aggressiven Tumorphänotyps bei Plattenepithelkarzinomen beschrieben [274].

Anhand der Expressionsmuster der Tumoren konnte mithilfe der hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse eine Subgruppe von 10 Patienten identifiziert werden, deren Tumoren für die meisten Integrin-Untereinheiten ein polarisiertes Expressionsmuster mit einheitlichen Expressionsstärken im gesamten Tumorgewebe aufwiesen. Die durchschnittlich postoperative Überlebenszeit ohne Rezidiv bei Patienten der Subgruppe lag über dem rezidivfreien Überlebensintervall im Restkollektiv ($p=0,0785$). Die 10 Patienten der Subgruppe teilten mehrere Merkmale, die in der vorliegenden Studie mit einer günstigen Prognose assoziiert waren. Im Gegensatz zum übrigen Kollektiv zeigte sich in der Subgruppe fast ausschließlich (9/10) eine gute bis mäßige Differenzierung der Tumoren (G1–2). 8 der 10 Tumoren wiesen eine verstärkte Expression der α_6 -Untereinheit entlang der Tumorränder auf ($p=0,047$). Des Weiteren waren bei den Patienten entweder keine oder nur einzelne Lymphknotenmetastasen ($pLK\leq 3$) histopathologisch nachgewiesen worden ($p=0,033$). Überraschenderweise zeigten sich bei sämtlichen Patienten der Subgruppe, deren histopathologisch als „tumorfrei“ eingestufte Lymphknoten im Rahmen einer parallel laufenden Studie mit einem immunhistochemischen Assay auf Zellen epithelialer Herkunft untersucht worden waren ($n=9$), in diesen isolierte Tumorzellen ($p=0,021$). Obgleich der immunpathologische Nachweis von isolierten Tumorzellen in den Lymphknoten in der vorliegenden Studie nicht als Prognosefaktor in Erscheinung getreten ist ($p=0,6471$) und mit 70% (23/33) im untersuchten Kollektiv ein häufig beobachtetes Phänomen war, ist dieser Befund erstaunlich.

Hosch et al. demonstrierten das maligne Potential lymphatisch disseminierter Tumorzellen und konnten in mehreren Arbeiten zeigen, dass der Nachweis von isolierten Tumorzellen in Lymphknoten beim Ösophaguskarzinom insgesamt einen unabhängigen Prognosefaktor darstellt [158, 159, 225]. Möglicherweise wird die lymphogene Ausbreitung von Plattenepithelkarzinomen im Ösophagus gegenüber der lymphatischen Metastasierung von Adenokarzinomen von zusätzlichen Faktoren beeinflusst [279]. In diesem Fall müsste ein Nachweis von isolierten Tumorzellen in Lymphknoten nicht notwendigerweise eine ungünstige Prognose nach sich ziehen. Wie bei anderen epithelialen Zellen wirkt sich die Integrin-Expression wahrscheinlich auch bei den disseminierten Tumorzellen auf deren Migrations- und Proliferationsverhalten aus und könnte auf diesem Wege insbesondere den lymphatischen Schenkel der systemischen Ausbreitung der Tumoren beeinflussen. Es wurde bereits erwähnt, dass die Expression einzelner Integrine auf histopathologisch detektierten Lymphknotenmetastasen signifikant herabreguliert ist [223]. Erste Hinweise zu den Hintergründen dieses überraschenden Befundes könnte die Charakterisierung der Integrin-Expression auf den disseminierten Tumorzellen selbst liefern.

Festzuhalten ist, dass die Mitglieder einer Patientensubgruppe, die anhand der polarisierten Integrin-Expression in ihren Tumoren identifiziert werden konnten, für mindestens eine (10/10) und in der Mehrzahl (8/10) für zwei unabhängige Prognosefaktoren eine günstige Merkmalsausprägung besaßen. Somit scheint der Erhalt einer

einheitlichen und polarisierten Integrin-Expression im Tumorgewebe – möglicherweise Ausdruck einer erhaltenen Differenzierung der Tumoren – beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus mit einem günstigeren Krankheitsverlauf und darüber hinaus auch mit einer limitierten lymphatischen Ausbreitung der Tumorerkrankung assoziiert zu sein. Patienten, deren Tumoren eine ungeordnete, heterogene Integrin-Expression besitzen, würden dementsprechend häufiger einen aggressiven Krankheitsverlauf mit einer schlechteren Prognose aufweisen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sprechen dafür, dass die qualitative Beurteilung des Expressionsmusters im Tumorgewebe besser zur Klassifizierung der untersuchten Patienten geeignet ist als die alleinige quantitative Analyse der Expressionsstärken.

4.4 Evaluierung der Immunfluoreszenzfärbung

Zur immunhistochemischen Untersuchung der Integrin-Expression in Schnittpräparaten aus kryoasserviertem Tumorgewebe wurde eine Immunfluoreszenzfärbung etabliert, die es gestattet, die Intensität der Immunfärbung nicht nur qualitativ zu bewerten. Im Vergleich zu konventionellen immunhistochemischen Färbeverfahren, in denen die Antikörper-markierten Epitope der Zielstrukturen mit Chromogenen visualisiert werden, können bei der verwendeten Färbemethode mithilfe eines Rechner-gestützten Fluoreszenzmikroskops und dem EDV-Programm Leica-QFISH die Färbeintensitäten im Gewebe mit metrischem Skalenniveau quantifiziert werden. Trotz der Standardisierung von Färbemethode und Auswertungsprozess und trotz Einbindung eines zweiten Auswerters bleiben bei immunhistochemischen Färbeassays stets Unwägbarkeiten, die sich nicht vollständig ausschließen lassen. So können beispielsweise bei regelmäßiger Durchführung eines weitestgehend standardisierten Färbeassays interindividuelle Unterschiede in der Probenaufbereitung und die Verwendung verschiedener Antikörperchargen oder unterschiedlicher Lichtquellen nicht vermieden werden. Um den Einfluss dieser Größen gering zu halten, wurde eine einfache ordinale Skalierung zur Bewertung der Färbeintensitäten verwendet. Neben den Positivkontrollen aus Colonmukosa bot die Verwendung von autologem Ösophagus-Plattenepithel als Referenz die Möglichkeit, im Tumorgewebe ermittelte Intensitätswerte anhand der gefärbten Mukosapräparate zu objektivieren. Die Färbeintensitäten innerhalb eines Präparats oder zwischen verschiedenen Integrin-Untereinheiten unterschieden sich z. T. nur geringfügig. So war es nicht immer möglich, Färbegradienten, die mit dem Auge als solche wahrgenommen wurden, mithilfe der Bewertungsskala durch unterschiedliche Expressionsstärken abzubilden. Hier wurde die Sensitivität des menschlichen Sehapparates dem Bewertungsschema übergeordnet. Bei zukünftigen Anwendungen der Methode sollte daher gegebenenfalls eine höhere Auflösung der Bewertungskategorien in Betracht gezogen werden.

Der zur Darstellung der Zielstrukturen verwendete Antikörper-gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin Red-X (RRX) erwies sich als sehr stabil und lieferte auch nach längerer Belichtungs- und/oder Lagerungsdauer gute Leuchtintensitäten. In der Regel konnten mit RRX markierte Gewebestrukturen sicher von der Autofluoreszenz des Gewebehintergrunds abgegrenzt werden, die darüber hinaus im entsprechenden Emissionsfilter vergleichsweise gering zur Geltung kam.

Insgesamt scheint die vorliegende Immunfluoreszenzfärbung gut geeignet, in kryoasserviertem Gewebe neben Expressionsstärken auch Expressionsgradienten und Expressionsmuster von Zelloberflächenmarkern darzustellen. Damit bietet sich die verwendete Fluoreszenzfärbemethode insbesondere für den Nachweis von

sehr variabel exprimierten Molekülen an und stellt hier eine Alternative zu den konventionellen immunhistochemischen Färbeverfahren dar. Die Möglichkeit, eine Hintergrund- oder Gegenfärbung auszublenken, vereinfachen das Aufspüren geringgradig exprimierter Antigene und erleichtern ihre Abgrenzung vom Gewebehintergrund. Die Möglichkeit zur isolierten Betrachtung mehrerer unterschiedlich markierter Zielstrukturen im selben Schnittpräparat macht die Immunfluoreszenzfärbung darüber hinaus für Doppel- oder Mehrfachmarkierungen attraktiv.

4.5 Resümee

In vergleichbaren immunhistochemischen Studien zur Integrin-Expression bei anderen Karzinomen hatte sich gezeigt, dass sowohl die Überexpression als auch die Niederregulation einzelner Integrine mit einem ausgeprägten invasiven Wachstum und der Metastasierung von Tumoren korrelieren kann. Bei Adenokarzinomen wurde die Progression von der prä-malignen Hyperplasie zum invasiven Karzinom häufig von einem Verlust der untersuchten Integrine begleitet. Bei Plattenepithelkarzinomen hingegen zeigte sich nur selten der vollständige Verlust einzelner Integrine, der dann jedoch in der Regel mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf verbunden war. Damit besitzt die Integrin-Expression insgesamt einen signifikanten Einfluss auf das Invasions- und Metastasierungsverhalten von Karzinomen, ohne jedoch einzelnen Integrinen einen einheitlichen Effekt zuschreiben zu können.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Expression der Integrine $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ die Ausprägung und der Verlauf der Tumorerkrankung beim Plattenepithel des Ösophagus signifikant beeinflussen können. Wie bei der Genese und Progression von soliden Tumoren insgesamt scheint auch bei der Entwicklung und Ausprägung des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus dem Integrin $\alpha_6\beta_4$ eine besondere Rolle zuzukommen. Die Expression von $\alpha_6\beta_4$ am unmittelbaren Invasionsrand der Tumoren könnte beim OSCC einen unabhängigen Prognosemarker darstellen. Da es sich bei der Entstehung und Progression von malignen Tumoren um ein multifaktorielles Geschehen handelt [10, 280], erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass die umschriebene Expression eines einzelnen Integrins die Aggressivität und damit die Prognose eines malignen Tumors prägen könnte. Dennoch sind Subgruppen von Tumoren denkbar, deren Integrin-Expressionsprofile charakteristische Veränderungen aufweisen, in denen das dysregulierte Differenzierungs- und Wachstumsverhalten invasiver Karzinome zum Ausdruck kommt.

Mithilfe der hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse war es möglich, die Tumoren hinsichtlich ihres Expressionsverhalten für alle Integrin-Untereinheiten gleichzeitig auf gemeinsame Merkmale zu prüfen, die sich unter Umständen zu einer kennzeichnenden Expressionssignatur zusammenfassen lassen. Anhand der *Expressionsstärken* konnte keine Subgruppe identifiziert werden, die sich hinsichtlich ihrer Merkmalsausprägung signifikant von den verbliebenen Patienten des Kollektivs unterschied. Indes gelang dies modellhaft in der Clusteranalyse der Tumoren anhand ihrer *Expressionsmuster*: Die Primärtumoren von 10 Patienten unterschieden sich mit ihrer überwiegend erhaltenen Polarisierung der Integrin-Expression im Tumorgewebe in der hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse deutlich erkennbar von den übrigen Tumoren. Die Patienten der Subgruppe teilten eine starke Expression der α_6 -Integrine am Invasionsrand und eine fehlende oder begrenzte Lymphknotenmetastasierung. Beide Merkmalsausprägungen waren signifikant mit einer verlängerten

rezidivfreien Überlebenszeit assoziiert und stellten gleichzeitig zwei unabhängigen Prognosefaktoren für das untersuchte Patientenkollektiv dar. Die Überprüfung der in der vorliegenden Studie gefundenen Korrelationen an einem umfangreicheren Patientenkollektiv könnte nicht nur signifikante Zusammenhänge bestätigen, sondern würde möglicherweise auch eine ausgeprägtere Kohärenz der Integrin-Expression mit dem Invasionsverhalten und der Prognose der Tumoren offenbaren, die in der vorliegenden Untersuchung mit ihrer begrenzten Patientenzahl (n=36) lediglich tendenziell zu erkennen war.

Bei der pathologischen Begutachtung von Tumoren nimmt der immunhistochemische Nachweis von Oberflächenmarkern nach wie vor eine zentrale Stellung ein. Die vorliegende Untersuchung hat – trotz einer limitierten Fallzahl – gezeigt, dass die Bestimmung eines Integrin-Expressionsprofils zusätzliche Informationen zur Beurteilung der Aggressivität und Prognose von Tumoren liefern kann. Dies könnte die Stratifizierung von Tumorpatienten erleichtern und somit einen Beitrag zur besseren Adaption der verfügbaren Therapiemodalitäten an die individuelle Tumorerkrankung führen.

Therapieansätze, welche die Wirkung und Funktion von Integrinen beeinflussen, befinden sich seit einigen Jahren in der Erprobung. Mithilfe von monoklonalen Antikörpern gegen die extrazellulären Rezeptordomänen, der Blockade von Proteinkinasen mit Peptidantagonisten und dem Einsatz von Apoptosepromotoren und Antisense-Oligonukleotiden wird versucht, den pro-malignen Wirkungen der Integrine auf die Invasivität, Metastasierungsfähigkeit und Angiogenese von Tumoren entgegenzusteuern [20, 281]. Voraussetzung für die Identifikation geeigneter Therapieangriffspunkte sind Studien, die zu einem besseren Verständnis der Funktion und Wirkungsweise der einzelnen Integrine beitragen. Da sich die Expression der Integrine von Tumortyp zu Tumortyp z. T. deutlich unterscheidet, ist es erforderlich, das Expressionsverhalten der Integrine und ihre Bedeutung für jeden Tumortyp bzw. jede Tumorentität einzeln zu bestimmen. Beispielsweise würde die Analyse der Expression der untersuchten Integrine beim Adenokarzinom des Ösophagus und seinen Vorläuferstufen (*Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz*) – möglicherweise mit einem Fokus auf die Expression des $\alpha_6\beta_4$ -Integrins – eine interessante Ergänzung zur vorliegenden Studie darstellen. Die häufig beobachtete Koexpression von Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die engen Verflechtungen ihrer intrazellulären Signalübertragungswege und die sich daraus ableitende gemeinsame Beeinflussung von Differenzierung und Proliferation lassen die simultane Untersuchung dieser Oberflächenrezeptoren im Tumorgewebe als eine weitere interessante Perspektive erscheinen. Mit dem etablierten Immunfluoreszenzfärbeverfahren steht dazu eine sensitive Untersuchungsmethode zur Verfügung, die sich zügig auf eine Doppel- oder Mehrfach-Fluoreszenzmarkierung erweitern ließe.

5 Literaturverzeichnis

1. Fidler, I.J., *Critical determinants of metastasis*. Semin Cancer Biol, 2002. 12(2): p. 89-96.
2. Enzinger, P.C. and R.J. Mayer, *Esophageal cancer*. N Engl J Med, 2003. 349(23): p. 2241-52.
3. Bareiss, D., et al., *[Current epidemiology of carcinoma of the esophagus and cardia in Germany]*. Dtsch Med Wochenschr, 2002. 127(25-26): p. 1367-74.
4. Hart, I.R. and A. Saini, *Biology of tumour metastasis*. Lancet, 1992. 339(8807): p. 1453-7.
5. Fidler, I.J. and I.R. Hart, *Recent observations on the pathogenesis of cancer metastasis*. Prog Clin Biol Res, 1982. 85 Pt B: p. 601-19.
6. Zetter, B.R., *The cellular basis of site-specific tumor metastasis*. N Engl J Med, 1990. 322(9): p. 605-12.
7. Behrens, J., et al., *Cell adhesion in invasion and metastasis*. Semin Cell Biol, 1992. 3(3): p. 169-78.
8. Birchmeier, C. and W. Birchmeier, *Molecular aspects of mesenchymal-epithelial interactions*. Annu Rev Cell Biol, 1993. 9: p. 511-40.
9. Stetler-Stevenson, W.G., S. Aznavoorian, and L.A. Liotta, *Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis*. Annu Rev Cell Biol, 1993. 9: p. 541-73.
10. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
11. Birchmeier, C., et al., *Met, metastasis, motility and more*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(12): p. 915-25.
12. Ruoslahti, E., *Integrins*. J Clin Invest, 1991. 87(1): p. 1-5.
13. Giancotti, F.G. and E. Ruoslahti, *Integrin signaling*. Science, 1999. 285(5430): p. 1028-32.
14. Danen, E.H. and A. Sonnenberg, *Integrins in regulation of tissue development and function*. J Pathol, 2003. 201(4): p. 632-41.
15. Frisch, S.M. and R.A. Screaton, *Anoikis mechanisms*. Curr Opin Cell Biol, 2001. 13(5): p. 555-62.
16. Frisch, S.M. and E. Ruoslahti, *Integrins and anoikis*. Curr Opin Cell Biol, 1997. 9(5): p. 701-6.
17. Hood, J.D. and D.A. Cheresh, *Role of integrins in cell invasion and migration*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(2): p. 91-100.
18. Brakebusch, C., et al., *Integrins in invasive growth*. J Clin Invest, 2002. 109(8): p. 999-1006.
19. Guo, W. and F.G. Giancotti, *Integrin signalling during tumour progression*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(10): p. 816-26.
20. Mizejewski, G.J., *Role of integrins in cancer: survey of expression patterns*. Proc Soc Exp Biol Med, 1999. 222(2): p. 124-38.
21. Klein, C.A., *The systemic progression of human cancer: a focus on the individual disseminated cancer cell--the unit of selection*. Adv Cancer Res, 2003. 89: p. 35-67.
22. *Oxford English Dictionary*. Second Edition ed, ed. J.A.H. Murray. 1989, Oxford: Clarendon Press.
23. Halata, Z., *Chirurgische Anatomie des Ösophagus*, in *Chirurgie des Ösophagus. Ein Operationsatlas.*, Y. Gallinger, Editor. 2002, Steinkopff Verlag: Darmstadt. p. 17-23.
24. Liebermann-Meffert, D. and R.B. Brauer, *Surgical Anatomy of the Distal Esophagus and Cardia*, in *Surgery of the Esophagus, Stomach, and Small Intestine*, P.E. Donahue, Editor. 1995, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.
25. Kaufmann, P., *[Structure of the muscularis mucosae]*. Acta Anat (Basel), 1971. 80(2): p. 305-19.
26. Kaufmann, P., et al., *[Muscle arrangement in the esophagus (man, rhesus monkey, rabbit, mouse, rat, seal)]*. Ergeb Anat Entwicklungsgesch, 1968. 40(3): p. 3-33.
27. Bogomoletz, W.V., et al., *Superficial squamous cell carcinoma of the esophagus. A report of 76 cases and review of the literature*. Am J Surg Pathol, 1989. 13(7): p. 535-46.
28. Goseki, N., M. Koike, and M. Yoshida, *Histopathologic characteristics of early stage esophageal carcinoma. A comparative study with gastric carcinoma*. Cancer, 1992. 69(5): p. 1088-93.
29. Kuwano, H., et al., *Histopathology of early esophageal carcinoma and squamous epithelial dysplasia*. Hepatogastroenterology, 1993. 40(3): p. 222-5.
30. Sakata, K., *Über die Lymphgefäße des Ösophagus und über seine regionären Lymphdrüsen mit Berücksichtigung der Verbreitung des Carcinoms*. Mitt. Grenzgeb. Med. Chir., 1903. 11: p. 634.
31. Nishimaki, T., et al., *Intramural metastases from thoracic esophageal cancer: local indicators of advanced disease*. World J Surg, 1996. 20(1): p. 32-7.
32. Akiyama, H., et al., *Background of lymph node dissection from squamous cell carcinoma of the esophagus.*, in *Color atlas of Surgical Anatomy for Esophageal Cancer*, T. Iizuka, Editor. 1993, Springer-Verlag Berlin und Heidelberg: Berlin und Heidelberg. p. 9-24.

33. Schneider, P.M., et al., *Ösophaguskarzinom*, in *Nicht-hereditäre Tumorerkrankungen*, K. Ruckpaul, Editor. 2002, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 125-63.
34. Pisani, P., et al., *Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990*. Int J Cancer, 1999. 83(1): p. 18-29.
35. Pisani, P., et al., *Erratum: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990*. Int. J. Cancer, 83, 18-29 (1999). Int J Cancer, 1999. 83(6): p. 870-873.
36. Ziegler, H., et al., *Krebs im Saarland 1998-2000*. 2003, Epidemiologisches Krebsregister Saarland; Ministerium für Frauen, Arbeit, Gesundheit und Soziales: Saarbrücken.
37. *Todesursachenstatistik der Bundesrepublik Deutschland*. 1997, Statistisches Bundesamt: Wiesbaden.
38. Daly, J.M., et al., *Esophageal cancer: results of an American College of Surgeons Patient Care Evaluation Study*. J Am Coll Surg, 2000. 190(5): p. 562-72; discussion 572-3.
39. Coia, L.R. and E.R. Sauter, *Esophageal cancer*. Curr Probl Cancer, 1994. 18(4): p. 189-247.
40. *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program*. 2003, National Cancer Institute: Bethesda, Maryland.
41. Earlam, R., *Epidemiology of esophageal cancer from the European point of view.*, in *Diseases of the Esophagus*, A.H. Hölscher, Editor. 1988, Springer-Verlag: Heidelberg. p. 11-18.
42. Li, J.Y., et al., *A case-control study of cancer of the esophagus and gastric cardia in Linxian*. Int J Cancer, 1989. 43(5): p. 755-61.
43. Devesa, S.S., W.J. Blot, and J.F. Fraumeni, Jr., *Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States*. Cancer, 1998. 83(10): p. 2049-53.
44. Blot, W.J. and J.F. Fraumeni, Jr., *Trends in esophageal cancer mortality among US blacks and whites*. Am J Public Health, 1987. 77(3): p. 296-8.
45. Blot, W.J. and J.K. McLaughlin, *The changing epidemiology of esophageal cancer*. Semin Oncol, 1999. 26(5 Suppl 15): p. 2-8.
46. Powell, J. and W.H. Allum, *Oesophageal cancer in Britain*. Bmj, 1992. 304(6838): p. 1380.
47. Brewster, D.H., et al., *Socioeconomic status and risk of adenocarcinoma of the oesophagus and cancer of the gastric cardia in Scotland*. Br J Cancer, 2000. 83(3): p. 387-90.
48. Levi, F., et al., *Epidemiology of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the oesophagus*. Eur J Cancer Prev, 2001. 10(1): p. 91-6.
49. Liabeuf, A. and J. Faivre, *Time trends in oesophageal cancer incidence in Cote d'Or (France), 1976-93*. Eur J Cancer Prev, 1997. 6(1): p. 24-30.
50. Hansen, S., et al., *Esophageal and gastric carcinoma in Norway 1958-1992: incidence time trend variability according to morphological subtypes and organ subsites*. Int J Cancer, 1997. 71(3): p. 340-4.
51. Moller, H., *Incidence of cancer of oesophagus, cardia and stomach in Denmark*. Eur J Cancer Prev, 1992. 1(2): p. 159-64.
52. Hansson, L.E., P. Sparen, and O. Nyren, *Increasing incidence of both major histological types of esophageal carcinomas among men in Sweden*. Int J Cancer, 1993. 54(3): p. 402-7.
53. Law, S. and J. Wong, *Changing disease burden and management issues for esophageal cancer in the Asia-Pacific region*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. 17(4): p. 374-81.
54. Bollschweiler, E. and A.H. Holscher, *[Carcinoma of the esophagus--actual epidemiology in Germany]*. Onkologie, 2001. 24(2): p. 180-4.
55. Lagergren, J., et al., *Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma*. N Engl J Med, 1999. 340(11): p. 825-31.
56. Romero, Y., et al., *Barrett's esophagus: prevalence in symptomatic relatives*. Am J Gastroenterol, 2002. 97(5): p. 1127-32.
57. DeMeester, T.R., *Clinical biology of the Barrett's metaplasia, dysplasia to carcinoma sequence*. Surg Oncol, 2001. 10(3): p. 91-102.
58. Shaheen, N. and D.F. Ransohoff, *Gastroesophageal reflux, barrett esophagus, and esophageal cancer: scientific review*. Jama, 2002. 287(15): p. 1972-81.
59. Allescher, H.D., *[Reflux disease therapy]*. Schweiz Rundsch Med Prax, 2004. 93(47): p. 1963-9.
60. Suleiman, U.L., et al., *H2-receptor antagonists may increase the risk of cardio-oesophageal adenocarcinoma: a case-control study*. Eur J Cancer Prev, 2000. 9(3): p. 185-91.
61. Gammon, M.D., et al., *Tobacco, alcohol, and socioeconomic status and adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia*. J Natl Cancer Inst, 1997. 89(17): p. 1277-84.

62. Wu, A.H., P. Wan, and L. Bernstein, *A multiethnic population-based study of smoking, alcohol and body size and risk of adenocarcinomas of the stomach and esophagus (United States)*. Cancer Causes Control, 2001. 12(8): p. 721-32.
63. Bujanda, L., *The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract*. Am J Gastroenterol, 2000. 95(12): p. 3374-82.
64. Lagergren, J., et al., *Association between medications that relax the lower esophageal sphincter and risk for esophageal adenocarcinoma*. Ann Intern Med, 2000. 133(3): p. 165-75.
65. Corley, D.A., et al., *Protective association of aspirin/NSAIDs and esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis*. Gastroenterology, 2003. 124(1): p. 47-56.
66. Zimmermann, K.C., et al., *Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma*. Cancer Res, 1999. 59(1): p. 198-204.
67. Siemiatycki, J., et al., *Associations between cigarette smoking and each of 21 types of cancer: a multi-site case-control study*. Int J Epidemiol, 1995. 24(3): p. 504-14.
68. Castellsague, X., et al., *Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women*. Int J Cancer, 1999. 82(5): p. 657-64.
69. Ramasamy, K. and V.V. Gumaste, *Corrosive ingestion in adults*. J Clin Gastroenterol, 2003. 37(2): p. 119-24.
70. Isolauri, J. and H. Markkula, *Lye ingestion and carcinoma of the esophagus*. Acta Chir Scand, 1989. 155(4-5): p. 269-71.
71. Larsson, L.G., A. Sandstrom, and P. Westling, *Relationship of Plummer-Vinson disease to cancer of the upper alimentary tract in Sweden*. Cancer Res, 1975. 35(11 Pt. 2): p. 3308-16.
72. Altorki, N.K., L. Girardi, and D.B. Skinner, *Squamous cell carcinoma of the esophagus: therapeutic dilemma*. World J Surg, 1994. 18(3): p. 308-11.
73. Sandler, R.S., et al., *The risk of esophageal cancer in patients with achalasia. A population-based study*. Jama, 1995. 274(17): p. 1359-62.
74. Magovern, C.J. and N.K. Altorki, *Achalasia of the esophagus*. Chest Surg Clin N Am, 1994. 4(4): p. 721-39.
75. Siewert, J.R. and H.J. Dittler, *Esophageal carcinoma: impact of staging on treatment*. Endoscopy, 1993. 25(1): p. 28-32.
76. 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. 20(5C): p. 3935-40.
77. Lavergne, D. and E.M. de Villiers, *Papillomavirus in esophageal papillomas and carcinomas*. Int J Cancer, 1999. 80(5): p. 681-4.
78. Awerkwiew, S., et al., *Esophageal cancer in Germany is associated with Epstein-Barr-virus but not with papillomaviruses*. Med Microbiol Immunol (Berl), 2003. 192(3): p. 137-40.
79. Brown, L.M., et al., *Excess incidence of squamous cell esophageal cancer among US Black men: role of social class and other risk factors*. Am J Epidemiol, 2001. 153(2): p. 114-22.
80. Wolfgarten, E., et al., *Coincidence of nutritional habits and esophageal cancer in Germany*. Onkologie, 2001. 24(6): p. 546-51.
81. Bollschweiler, E., et al., *Vitamin intake and risk of subtypes of esophageal cancer in Germany*. J Cancer Res Clin Oncol, 2002. 128(10): p. 575-80.
82. Terry, P., et al., *Antioxidants and cancers of the esophagus and gastric cardia*. Int J Cancer, 2000. 87(5): p. 750-4.
83. *Oesophagus*, in *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. 1997, American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund.: Washington, DC. p. 118-129.
84. Munoz, N., et al., *Effect of riboflavin, retinol, and zinc on micronuclei of buccal mucosa and of esophagus: a randomized double-blind intervention study in China*. J Natl Cancer Inst, 1987. 79(4): p. 687-91.
85. Yang, G.C., et al., *Proliferation of esophageal epithelial cells among residents of Linxian, People's Republic of China*. J Natl Cancer Inst, 1987. 79(6): p. 1241-6.
86. Blot, W.J., et al., *Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population*. J Natl Cancer Inst, 1993. 85(18): p. 1483-92.
87. Li, J.Y., et al., *Nutrition intervention trials in Linxian, China: multiple vitamin/mineral supplementation, cancer incidence, and disease-specific mortality among adults with esophageal dysplasia*. J Natl Cancer Inst, 1993. 85(18): p. 1492-8.
88. Rogers, M.A., et al., *Consumption of nitrate, nitrite, and nitrosodimethylamine and the risk of upper aerodigestive tract cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995. 4(1): p. 29-36.
89. Hsia, C.C., et al., *Enhancement of formation of the esophageal carcinogen benzylnitrosamine from its precursors by Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(3): p. 1878-81.

90. Ke, L., *Mortality and incidence trends from esophagus cancer in selected geographic areas of China circa 1970-90*. Int J Cancer, 2002. 102(3): p. 271-4.
91. Onuk, M.D., A. Oztupuz, and F. Memik, *Risk factors for esophageal cancer in eastern Anatolia*. Hepatogastroenterology, 2002. 49(47): p. 1290-2.
92. De Stefani, E., et al., *Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay*. Cancer Res, 1990. 50(2): p. 426-31.
93. Castellsague, X., et al., *Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America*. Int J Cancer, 2000. 88(4): p. 658-64.
94. Garidou, A., et al., *Life-style factors and medical conditions in relation to esophageal cancer by histologic type in a low-risk population*. Int J Cancer, 1996. 68(3): p. 295-9.
95. Ghavamzadeh, A., et al., *Esophageal cancer in Iran*. Semin Oncol, 2001. 28(2): p. 153-7.
96. Risk, J.M., et al., *The tylosis esophageal cancer (TOC) locus: more than just a familial cancer gene*. Dis Esophagus, 1999. 12(3): p. 173-6.
97. Langan, J.E., et al., *Novel microsatellite markers and single nucleotide polymorphisms refine the tylosis with oesophageal cancer (TOC) minimal region on 17q25 to 42.5 kb: sequencing does not identify the causative gene*. Hum Genet, 2004. 114(6): p. 534-40.
98. von Brevin, M., et al., *Loss of heterozygosity in sporadic oesophageal tumors in the tylosis oesophageal cancer (TOC) gene region of chromosome 17q*. Oncogene, 1998. 17(16): p. 2101-5.
99. Iwaya, T., et al., *Tylosis esophageal cancer locus on chromosome 17q25.1 is commonly deleted in sporadic human esophageal cancer*. Gastroenterology, 1998. 114(6): p. 1206-10.
100. Ellis, A., et al., *Tylosis associated with carcinoma of the oesophagus and oral leukoplakia in a large Liverpool family--a review of six generations*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1994. 30B(2): p. 102-12.
101. Holmes, G.K., et al., *Malignancy in coeliac disease--effect of a gluten free diet*. Gut, 1989. 30(3): p. 333-8.
102. Erkal, H.S., et al., *Synchronous and metachronous squamous cell carcinomas of the head and neck mucosal sites*. J Clin Oncol, 2001. 19(5): p. 1358-62.
103. Cooper, J.S., et al., *Second malignancies in patients who have head and neck cancer: incidence, effect on survival and implications based on the RTOG experience*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1989. 17(3): p. 449-56.
104. Mandard, A.M., P. Hainaut, and M. Hollstein, *Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus*. Mutat Res, 2000. 462(2-3): p. 335-42.
105. Hollstein, M.C., et al., *Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(24): p. 9958-61.
106. Metzger, R., et al., *Molecular biology of esophageal cancer*. Onkologie, 2004. 27(2): p. 200-6.
107. Chaves, P., et al., *p53 protein immunoexpression in esophageal squamous cell carcinoma and adjacent epithelium*. J Surg Oncol, 1997. 65(1): p. 3-9.
108. Shi, S.T., et al., *Role of p53 gene mutations in human esophageal carcinogenesis: results from immunohistochemical and mutation analyses of carcinomas and nearby non-cancerous lesions*. Carcinogenesis, 1999. 20(4): p. 591-7.
109. Gao, H., et al., *p53 tumor suppressor gene mutation in early esophageal precancerous lesions and carcinoma among high-risk populations in Henan, China*. Cancer Res, 1994. 54(16): p. 4342-6.
110. Xing, E.P., et al., *Aberrant methylation of p16INK4a and deletion of p15INK4b are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China*. Carcinogenesis, 1999. 20(1): p. 77-84.
111. Mori, T., et al., *Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (multiple tumor suppressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 1994. 54(13): p. 3396-7.
112. Busatto, G., et al., *p16/CDKN2 alterations and pRb expression in oesophageal squamous carcinoma*. Mol Pathol, 1998. 51(2): p. 80-4.
113. Jiang, W., et al., *Altered expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(19): p. 9026-30.
114. Sarbia, M., et al., *Prognostic significance of cyclin D1 in esophageal squamous cell carcinoma patients treated with surgery alone or combined therapy modalities*. Int J Cancer, 1999. 84(1): p. 86-91.
115. Torzewski, M., et al., *Expression of Bcl-X(L), an antiapoptotic member of the Bcl-2 family, in esophageal squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 1998. 4(3): p. 577-83.
116. Sarbia, M., et al., *Expression of Bax, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, in esophageal squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 1997. 73(4): p. 508-13.
117. Ozawa, S., et al., *High incidence of EGF receptor hyperproduction in esophageal squamous-cell carcinomas*. Int J Cancer, 1987. 39(3): p. 333-7.
118. Torzewski, M., et al., *The prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in squamous cell carcinomas of the oesophagus*. Anticancer Res, 1997. 17(5B): p. 3915-9.

119. Iihara, K., et al., *Prognostic significance of transforming growth factor-alpha in human esophageal carcinoma. Implication for the autocrine proliferation.* Cancer, 1993. 71(10): p. 2902-9.
120. Jass, J.R., L.H. Sobin, and H. Watanabe, *The World Health Organization's histologic classification of gastrointestinal tumors. A commentary on the second edition.* Cancer, 1990. 66(10): p. 2162-7.
121. Greene, F.L., D.L. Page, and I.D. Fleming, *AJCC Cancer Staging Manual. TNM Classification of Malignant Tumours.* 6th edn. ed, ed. D.L. Page. 2002, New York: Springer.
122. *International Union Against Cancer (UICC): TNM-Klassifikation maligner Tumoren.* 6. Auflage ed, ed. F. Bootz. 2002, Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
123. *International Union Against Cancer (UICC): Prognostic Factors in Cancer.* 2nd edn. ed, ed. L.H. Sobin. 2001, New York: Wiley.
124. *International Union Against Cancer (UICC): TNM Supplement. A commentary on uniform use.* 2nd edn. ed, ed. L.H. Sobin. 2001, New York: Wiley.
125. Fumagalli, U. *Resective Surgery for cancer of the thoracic esophagus.* in *Consensus Conference held at 6th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus.* 1995. Milan, Italy.
126. Mayer, R.J., *Gastrointestinal tract cancer.*, in *Harrison's Principles of internal medicine*, D.L. Longo, Editor. 1997, McGraw-Hill: New York. p. 568-578.
127. Blot, W.J., et al., *Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia.* Jama, 1991. 265(10): p. 1287-9.
128. Siewert, J.R. *Consensus Conference on classification and therapy of adenocarcinoma of the esophago-gastric junction.* in *Second IGCA World Congress.* 1997. Munich, Germany.
129. McKeown, F., *Oat-cell carcinoma of the oesophagus.* J Pathol Bacteriol, 1952. 64(4): p. 889-91.
130. Jereczek-Fossa, B., et al., *Small cell carcinoma of the esophagus: a case report and review of the literature.* Tumori, 2000. 86(2): p. 174-7.
131. Daly, J.M., L.H. Karnell, and H.R. Menck, *National Cancer Data Base report on esophageal carcinoma.* Cancer, 1996. 78(8): p. 1820-8.
132. *A proposal for a new TNM classification of esophageal carcinoma. Japanese Committee for Registration of Esophageal Carcinoma.* Jpn J Clin Oncol, 1985. 15(4): p. 625-36.
133. Siewert, J.R., et al., *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. 234(3): p. 360-7; discussion 368-9.
134. Hulscher, J.B., et al., *Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the esophagus.* N Engl J Med, 2002. 347(21): p. 1662-9.
135. Lehnert, T., *Multimodal therapy for squamous carcinoma of the oesophagus.* Br J Surg, 1999. 86(6): p. 727-39.
136. Luketich, J.D., et al., *Role of positron emission tomography in staging esophageal cancer.* Ann Thorac Surg, 1997. 64(3): p. 765-9.
137. Flamen, P., et al., *The utility of positron emission tomography for the diagnosis and staging of recurrent esophageal cancer.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2000. 120(6): p. 1085-92.
138. Downey, R.J., et al., *Whole body 18FDG-PET and the response of esophageal cancer to induction therapy: results of a prospective trial.* J Clin Oncol, 2003. 21(3): p. 428-32.
139. Mealy, K., et al., *Tumour marker detection in oesophageal carcinoma.* Eur J Surg Oncol, 1996. 22(5): p. 505-7.
140. Akiyama, H., et al., *Use of the stomach as an esophageal substitute.* Ann Surg, 1978. 188(5): p. 606-10.
141. Siewert, J.R., et al., *Surgery of squamous cell carcinoma of the esophagus.* Ann Oncol, 1994. 5 Suppl 3: p. 1-7.
142. Igaki, H., Y. Tachimori, and H. Kato, *Improved survival for patients with upper and/or middle mediastinal lymph node metastasis of squamous cell carcinoma of the lower thoracic esophagus treated with 3-field dissection.* Ann Surg, 2004. 239(4): p. 483-90.
143. Nishihira, T., K. Hirayama, and S. Mori, *A prospective randomized trial of extended cervical and superior mediastinal lymphadenectomy for carcinoma of the thoracic esophagus.* Am J Surg, 1998. 175(1): p. 47-51.
144. Fujita, H., et al., *Mortality and morbidity rates, postoperative course, quality of life, and prognosis after extended radical lymphadenectomy for esophageal cancer. Comparison of three-field lymphadenectomy with two-field lymphadenectomy.* Ann Surg, 1995. 222(5): p. 654-62.
145. Kato, H., et al., *Lymph node metastasis in thoracic esophageal carcinoma.* J Surg Oncol, 1991. 48(2): p. 106-11.
146. Orringer, M.B., B. Marshall, and M.D. Iannettoni, *Transhiatal esophagectomy for treatment of benign and malignant esophageal disease.* World J Surg, 2001. 25(2): p. 196-203.
147. Minsky, B.D., *Carcinoma of the esophagus. Part I: Primary therapy.* Oncology (Huntingt), 1999. 13(9): p. 1225-32, 1235-6.

148. Sander, R.R. and H. Poesl, *Cancer of the oesophagus--palliation--laser treatment and combined procedures*. Endoscopy, 1993. 25(9): p. 679-82.
149. DeCamp, M.M., Jr., S.J. Swanson, and M.T. Jaklitsch, *Esophagectomy after induction chemoradiation*. Chest, 1999. 116(6 Suppl): p. 466S-469S.
150. Enzinger, P.C., D.H. Ilson, and D.P. Kelsen, *Chemotherapy in esophageal cancer*. Semin Oncol, 1999. 26(5 Suppl 15): p. 12-20.
151. Headrick, J.R., et al., *High-grade esophageal dysplasia: long-term survival and quality of life after esophagectomy*. Ann Thorac Surg, 2002. 73(6): p. 1697-702; discussion 1702-3.
152. Reed, C.E., *Surgical management of esophageal carcinoma*. Oncologist, 1999. 4(2): p. 95-105.
153. Bollschweiler, E., et al., *Preoperative risk analysis in patients with adenocarcinoma or squamous cell carcinoma of the oesophagus*. Br J Surg, 2000. 87(8): p. 1106-10.
154. Holscher, A.H., et al., *Prognostic differences between early squamous-cell and adenocarcinoma of the esophagus*. Dis Esophagus, 1997. 10(3): p. 179-84.
155. Holscher, A.H., et al., *Early adenocarcinoma in Barrett's oesophagus*. Br J Surg, 1997. 84(10): p. 1470-3.
156. Krasna, M.J., *Surgical staging and surgical treatment in esophageal cancer*. Semin Oncol, 1999. 26(5 Suppl 15): p. 9-11.
157. Siewert, J.R., H.J. Stein, and K. Bottcher, *[Lymphadenectomy in tumors of the upper gastrointestinal tract]*. Chirurg, 1996. 67(9): p. 877-88.
158. Hosch, S.B., et al., *Esophageal cancer: the mode of lymphatic tumor cell spread and its prognostic significance*. J Clin Oncol, 2001. 19(7): p. 1970-5.
159. Izbicki, J.R., et al., *Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer*. N Engl J Med, 1997. 337(17): p. 1188-94.
160. Hermanek, P., et al., *International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis*. Cancer, 1999. 86(12): p. 2668-73.
161. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. 69(1): p. 11-25.
162. Gumbiner, B.M., *Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis*. Cell, 1996. 84(3): p. 345-57.
163. Juliano, R.L., *Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. 42: p. 283-323.
164. Burke, R.D., *Invertebrate integrins: structure, function, and evolution*. Int Rev Cytol, 1999. 191: p. 257-84.
165. van der Flier, A. and A. Sonnenberg, *Function and interactions of integrins*. Cell Tissue Res, 2001. 305(3): p. 285-98.
166. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. 110(6): p. 673-87.
167. Liddington, R.C. and M.H. Ginsberg, *Integrin activation takes shape*. J Cell Biol, 2002. 158(5): p. 833-9.
168. Loftus, J.C., J.W. Smith, and M.H. Ginsberg, *Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face*. J Biol Chem, 1994. 269(41): p. 25235-8.
169. Shimizu, Y., *LFA-1: more than just T cell Velcro*. Nat Immunol, 2003. 4(11): p. 1052-4.
170. Schwartz, M.A., M.D. Schaller, and M.H. Ginsberg, *Integrins: emerging paradigms of signal transduction*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. 11: p. 549-99.
171. Keely, P., L. Parise, and R. Juliano, *Integrins and GTPases in tumour cell growth, motility and invasion*. Trends Cell Biol, 1998. 8(3): p. 101-6.
172. Arthur, W.T., N.K. Noren, and K. Burridge, *Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion*. Biol Res, 2002. 35(2): p. 239-46.
173. Sheetz, M.P., et al., *Cell migration as a five-step cycle*. Biochem Soc Symp, 1999. 65: p. 233-43.
174. Miranti, C.K. and J.S. Brugge, *Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction*. Nat Cell Biol, 2002. 4(4): p. E83-90.
175. Renshaw, M.W., X.D. Ren, and M.A. Schwartz, *Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion*. Embo J, 1997. 16(18): p. 5592-9.
176. Faham, S., R.J. Linhardt, and D.C. Rees, *Diversity does make a difference: fibroblast growth factor-heparin interactions*. Curr Opin Struct Biol, 1998. 8(5): p. 578-86.
177. Cabodi, S., et al., *Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses*. Biochem Soc Trans, 2004. 32(Pt3): p. 438-42.
178. Giancotti, F.G., *Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression*. Curr Opin Cell Biol, 1997. 9(5): p. 691-700.

179. Schwartz, M.A. and R.K. Assoian, *Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways*. J Cell Sci, 2001. 114(Pt 14): p. 2553-60.
180. Meredith, J.E., Jr., B. Fazeli, and M.A. Schwartz, *The extracellular matrix as a cell survival factor*. Mol Biol Cell, 1993. 4(9): p. 953-61.
181. Frisch, S.M. and H. Francis, *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis*. J Cell Biol, 1994. 124(4): p. 619-26.
182. Khwaja, A., et al., *Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway*. Embo J, 1997. 16(10): p. 2783-93.
183. Prockop, D.J. and K.I. Kivirikko, *Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy*. Annu Rev Biochem, 1995. 64: p. 403-34.
184. Mercurio, A.M., *Laminin receptors: achieving specificity through cooperation*. Trends Cell Biol, 1995. 5(11): p. 419-23.
185. Belkin, A.M. and M.A. Stepp, *Integrins as receptors for laminins*. Microsc Res Tech, 2000. 51(3): p. 280-301.
186. Bosman, F.T., *Integrins: cell adhesives and modulators of cell function*. Histochem J, 1993. 25(7): p. 469-77r.
187. Jaspers, M., et al., *Localization of the gene encoding the alpha 2 subunit of the human VLA-2 receptor to chromosome 5q23-31*. Somat Cell Mol Genet, 1991. 17(5): p. 505-11.
188. Takada, Y. and M.E. Hemler, *The primary structure of the VLA-2/collagen receptor alpha 2 subunit (platelet GPIa): homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain*. J Cell Biol, 1989. 109(1): p. 397-407.
189. de Melker, A.A., et al., *The A and B variants of the alpha 3 integrin subunit: tissue distribution and functional characterization*. Lab Invest, 1997. 76(4): p. 547-63.
190. Tamura, R.N., et al., *Cell type-specific integrin variants with alternative alpha chain cytoplasmic domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(22): p. 10183-7.
191. Kreidberg, J.A., et al., *Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis*. Development, 1996. 122(11): p. 3537-47.
192. Hertle, M.D., et al., *Aberrant integrin expression during epidermal wound healing and in psoriatic epidermis*. J Clin Invest, 1992. 89(6): p. 1892-901.
193. DiPersio, C.M., et al., *Mouse keratinocytes immortalized with large T antigen acquire alpha3beta1 integrin-dependent secretion of MMP-9/gelatinase B*. J Cell Sci, 2000. 113 (Pt 16): p. 2909-21.
194. Sugiura, T. and F. Berditchevski, *Function of alpha3beta1-tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2)*. J Cell Biol, 1999. 146(6): p. 1375-89.
195. Ghosh, S., et al., *Urinary-type plasminogen activator (uPA) expression and uPA receptor localization are regulated by alpha 3beta 1 integrin in oral keratinocytes*. J Biol Chem, 2000. 275(31): p. 23869-76.
196. Hogervorst, F., et al., *Molecular cloning of the human alpha 6 integrin subunit. Alternative splicing of alpha 6 mRNA and chromosomal localization of the alpha 6 and beta 4 genes*. Eur J Biochem, 1991. 199(2): p. 425-33.
197. Tamura, R.N., et al., *Epithelial integrin alpha 6 beta 4: complete primary structure of alpha 6 and variant forms of beta 4*. J Cell Biol, 1990. 111(4): p. 1593-604.
198. Georges-Labouesse, E., et al., *Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice*. Nat Genet, 1996. 13(3): p. 370-3.
199. Nievers, M.G., et al., *Ligand-independent role of the beta 4 integrin subunit in the formation of hemidesmosomes*. J Cell Sci, 1998. 111 (Pt 12): p. 1659-72.
200. Sonnenberg, A., et al., *Integrin alpha 6/beta 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion*. J Cell Biol, 1991. 113(4): p. 907-17.
201. Goodfellow, P.J., et al., *Assignment of the gene encoding the beta-subunit of the human fibronectin receptor (beta-FNR) to chromosome 10p11.2*. Ann Hum Genet, 1989. 53 (Pt 1): p. 15-22.
202. Fassler, R. and M. Meyer, *Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice*. Genes Dev, 1995. 9(15): p. 1896-908.
203. Mainiero, F., et al., *Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: distinct beta 4 subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes*. Embo J, 1995. 14(18): p. 4470-81.
204. Murgia, C., et al., *Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin beta4 cytoplasmic domain*. Embo J, 1998. 17(14): p. 3940-51.
205. Sonnenberg, A., et al., *The alpha 6 beta 1 (VLA-6) and alpha 6 beta 4 protein complexes: tissue distribution and biochemical properties*. J Cell Sci, 1990. 96 (Pt 2): p. 207-17.
206. Dobson, H., et al., *Cell adhesion molecules in oesophageal epithelium*. Gut, 1994. 35(10): p. 1343-1347.

207. Streit, M., et al., *Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors*. Recent Results Cancer Res, 1996. 142: p. 19-50.
208. Koretz, K., et al., *Expression of VLA-alpha 2, VLA-alpha 6, and VLA-beta 1 chains in normal mucosa and adenomas of the colon, and in colon carcinomas and their liver metastases*. Am J Pathol, 1991. 138(3): p. 741-50.
209. Stallmach, A., et al., *Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during the benign to malign tumour transformation*. Gut, 1992. 33(3): p. 342-6.
210. Nigam, A.K., et al., *Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer*. Br J Cancer, 1993. 68(3): p. 507-14.
211. Hall, P.A., et al., *Characterization of integrin chains in normal and neoplastic human pancreas*. J Pathol, 1991. 165(1): p. 33-41.
212. Adachi, M., et al., *Reduced integrin alpha3 expression as a factor of poor prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung*. J Clin Oncol, 1998. 16(3): p. 1060-7.
213. Pignatelli, M., M.E. Smith, and W.F. Bodmer, *Low expression of collagen receptors in moderate and poorly differentiated colorectal adenocarcinomas*. Br J Cancer, 1990. 61(4): p. 636-8.
214. Ishii, Y., et al., *Integrin alpha6beta4 as a suppressor and a predictive marker for peritoneal dissemination in human gastric cancer*. Gastroenterology, 2000. 118(3): p. 497-506.
215. Bonaccorsi, L., et al., *Androgen receptor expression in prostate carcinoma cells suppresses alpha6beta4 integrin-mediated invasive phenotype*. Endocrinology, 2000. 141(9): p. 3172-82.
216. Serini, G., et al., *Changes in integrin and E-cadherin expression in neoplastic versus normal thyroid tissue*. J Natl Cancer Inst, 1996. 88(7): p. 442-9.
217. Abdel-Ghany, M., et al., *The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis*. J Biol Chem, 2001. 276(27): p. 25438-46.
218. Nair, K.S., R. Naidoo, and R. Chetty, *Expression of cell adhesion molecules in oesophageal carcinoma and its prognostic value*. J Clin Pathol, 2005. 58(4): p. 343-51.
219. Tanaka, Y., et al., *alpha6 integrin expression in esophageal carcinoma*. Int J Oncol, 2000. 16(4): p. 725-9.
220. Hourihan, R.N., G.C. O'Sullivan, and J.G. Morgan, *Transcriptional gene expression profiles of oesophageal adenocarcinoma and normal oesophageal tissues*. Anticancer Res, 2003. 23(1A): p. 161-5.
221. Hu, Y.C., et al., *Profiling of differentially expressed cancer-related genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) using human cancer cDNA arrays: overexpression of oncogene MET correlates with tumor differentiation in ESCC*. Clin Cancer Res, 2001. 7(11): p. 3519-25.
222. Miller, S.E. and R.B. Veale, *Environmental modulation of alpha(v), alpha(2) and beta(1) integrin subunit expression in human oesophageal squamous cell carcinomas*. Cell Biol Int, 2001. 25(1): p. 61-9.
223. Takayama, N., et al., *Relationship between the expression of adhesion molecules in primary esophageal squamous cell carcinoma and metastatic lymph nodes*. Anticancer Res, 2003. 23(6a): p. 4435-42.
224. Wittekind, C. and G. Wagner, *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. 5. Auflage ed. 1997, Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
225. Hosch, S., et al., *Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer*. Cancer Res, 2000. 60(24): p. 6836-40.
226. Schoolmeester, A., et al., *Monoclonal antibody IAC-1 is specific for activated alpha2beta1 and binds to amino acids 199 to 201 of the integrin alpha2 I-domain*. Blood, 2004. 104(2): p. 390-6.
227. Favalaro, E.J., et al., *Co-expression of haemopoietic antigens on vascular endothelial cells: a detailed phenotypic analysis*. Br J Haematol, 1990. 74(4): p. 385-94.
228. *Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*, ed. W. Gilks. 1995, New York: Oxford University Press.
229. Sonnenberg, A., et al., *A complex of platelet glycoproteins Ic and IIa identified by a rat monoclonal antibody*. J Biol Chem, 1987. 262(21): p. 10376-83.
230. Pellegrini, R., et al., *Production and characterization of two monoclonal antibodies directed against the integrin beta 1 chain*. Tumori, 1992. 78(1): p. 1-4.
231. Kennel, S.J., et al., *Second generation monoclonal antibodies to the human integrin alpha 6 beta 4*. Hybridoma, 1990. 9(3): p. 243-55.
232. Lefevre, C., et al., *Texas Res-X and rhodamine Red-X, new derivatives of sulforhodamine 101 and lissamine rhodamine B with improved labeling and fluorescence properties*. Bioconjug Chem, 1996. 7(4): p. 482-9.
233. Kapuscinski, J. and W. Szer, *Interactions of 4', 6-diamidino-2-phenylindole with synthetic polynucleotides*. Nucleic Acids Res, 1979. 6(11): p. 3519-34.
234. Wilson, W.D., et al., *Binding of 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to GC and mixed sequences in DNA: intercalation of a classical groove-binding molecule*. J. Am. Chem. Soc., 1989. 111 (13): p. 5008-5010.
235. Sarbia, M., et al., *Prognostic value of histopathologic parameters of esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer, 1995. 76(6): p. 922-7.
236. Eisen, M.B., et al., *Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns*. Proc Natl Acad Sci U S A,

1998. 95(25): p. 14863-8.
237. Crissman, J.D., *Tumor-host interactions as prognostic factors in the histologic assessment of carcinomas*. *Pathol Annu*, 1986. 21 Pt 1: p. 29-52.
 238. Crissman, J.D., et al., *Prognostic value of histopathologic parameters in squamous cell carcinoma of the oropharynx*. *Cancer*, 1984. 54(12): p. 2995-3001.
 239. Odell, E.W., et al., *The prognostic value of individual histologic grading parameters in small lingual squamous cell carcinomas. The importance of the pattern of invasion*. *Cancer*, 1994. 74(3): p. 789-94.
 240. Gabbert, H.E., et al., *Tumor-cell dissociation at the invasion front: a new prognostic parameter in gastric cancer patients*. *Int J Cancer*, 1992. 50(2): p. 202-7.
 241. Roh, M.S., J.I. Lee, and P.J. Choi, *Tumor budding as a useful prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma*. *Dis Esophagus*, 2004. 17(4): p. 333-7.
 242. Thorban, S., et al., *Immunocytochemical detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with esophageal carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 1996. 88(17): p. 1222-7.
 243. Seery, J.P. and F.M. Watt, *Asymmetric stem-cell divisions define the architecture of human oesophageal epithelium*. *Curr Biol*, 2000. 10(22): p. 1447-50.
 244. Giannelli, G., et al., *Role of the alpha3beta1 and alpha6beta4 integrins in tumor invasion*. *Clin Exp Metastasis*, 2002. 19(3): p. 217-23.
 245. Klein, C.E., et al., *Integrins of normal human epidermis: differential expression, synthesis and molecular structure*. *Br J Dermatol*, 1990. 123(2): p. 171-8.
 246. Jones, J., et al., *Integrin expression in normal, hyperplastic, dysplastic, and malignant oral epithelium*. *J Pathol*, 1993. 169(2): p. 235-43.
 247. Hormia, M., J. Ylanne, and I. Virtanen, *Expression of integrins in human gingiva*. *J Dent Res*, 1990. 69(12): p. 1817-23.
 248. Jankowski, J., et al., *Proliferating cell nuclear antigen in oesophageal mucosa with autoradiography*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1992. 4: p. 579-84.
 249. Bryne, M., et al., *The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis?* *Anticancer Res*, 1998. 18(6B): p. 4757-64.
 250. Zutter, M.M. and S.A. Santoro, *Widespread histologic distribution of the alpha 2 beta 1 integrin cell-surface collagen receptor*. *Am J Pathol*, 1990. 137(1): p. 113-20.
 251. Zutter, M.M., et al., *Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(16): p. 7411-5.
 252. D'Ardenne, A.J., et al., *Co-ordinate expression of the alpha-6 integrin laminin receptor sub-unit and laminin in breast cancer*. *J Pathol*, 1991. 165(3): p. 213-20.
 253. Pignatelli, M., et al., *Integrins and their accessory adhesion molecules in mammary carcinomas: loss of polarization in poorly differentiated tumors*. *Hum Pathol*, 1992. 23(10): p. 1159-66.
 254. Pignatelli, M., A.M. Hanby, and G.W. Stamp, *Low expression of beta 1, alpha 2 and alpha 3 subunits of VLA integrins in malignant mammary tumours*. *J Pathol*, 1991. 165(1): p. 25-32.
 255. Ura, H., et al., *Separate functions of alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins in the metastatic process of human gastric carcinoma*. *Surg Today*, 1998. 28(10): p. 1001-6.
 256. Stamp, G.W. and M. Pignatelli, *Distribution of beta 1, alpha 1, alpha 2 and alpha 3 integrin chains in basal cell carcinomas*. *J Pathol*, 1991. 163(4): p. 307-13.
 257. Carter, W.G., M.C. Ryan, and P.J. Gahr, *Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha 3 beta 1 in epithelial basement membranes*. *Cell*, 1991. 65(4): p. 599-610.
 258. Plopper, G.E., et al., *Migration of breast epithelial cells on Laminin-5: differential role of integrins in normal and transformed cell types*. *Breast Cancer Res Treat*, 1998. 51(1): p. 57-69.
 259. DiPersio, C.M., et al., *alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane*. *J Cell Biol*, 1997. 137(3): p. 729-42.
 260. Melchiori, A., et al., *The alpha 3 beta 1 integrin is involved in melanoma cell migration and invasion*. *Exp Cell Res*, 1995. 219(1): p. 233-42.
 261. Fukushima, Y., et al., *Integrin alpha3beta1-mediated interaction with laminin-5 stimulates adhesion, migration and invasion of malignant glioma cells*. *Int J Cancer*, 1998. 76(1): p. 63-72.
 262. Judware, R. and L.A. Culp, *Concomitant down-regulation of expression of integrin subunits by N-myc in human neuroblastoma cells: differential regulation of alpha2, alpha3 and beta1*. *Oncogene*, 1997. 14(11): p. 1341-50.
 263. Judware, R. and L.A. Culp, *N-myc over-expression downregulates alpha3beta1 integrin expression in human Saos-2 osteosarcoma cells*. *Clin Exp Metastasis*, 1997. 15(3): p. 228-38.
 264. Thomas, G.J., J. Jones, and P.M. Speight, *Integrins and oral cancer*. *Oral Oncol*, 1997. 33(6): p. 381-8.
 265. Shaw, L.M., et al., *Function of the integrin alpha 6 beta 1 in metastatic breast carcinoma cells assessed by expression of a dominant-negative receptor*. *Cancer Res*, 1996. 56(5): p. 959-63.

-
266. Vaupel, P., *The role of hypoxia-induced factors in tumor progression*. Oncologist, 2004. 9 Suppl 5: p. 10-7.
267. Chung, J. and A.M. Mercurio, *Contributions of the alpha6 integrins to breast carcinoma survival and progression*. Mol Cells, 2004. 17(2): p. 203-9.
268. Borradori, L. and A. Sonnenberg, *Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases*. Curr Opin Cell Biol, 1996. 8(5): p. 647-56.
269. Trusolino, L., A. Bertotti, and P.M. Comoglio, *A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth*. Cell, 2001. 107(5): p. 643-54.
270. Mariotti, A., et al., *EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin alpha6beta4 at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion*. J Cell Biol, 2001. 155(3): p. 447-58.
271. Chung, J., et al., *The Met receptor and alpha 6 beta 4 integrin can function independently to promote carcinoma invasion*. J Biol Chem, 2004. 279(31): p. 32287-93.
272. Mercurio, A.M., I. Rabinovitz, and L.M. Shaw, *The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration*. Curr Opin Cell Biol, 2001. 13(5): p. 541-5.
273. Bagutti, C., P.M. Speight, and F.M. Watt, *Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity*. J Pathol, 1998. 186(1): p. 8-16.
274. Rabinovitz, I. and A.M. Mercurio, *The integrin alpha 6 beta 4 and the biology of carcinoma*. Biochem Cell Biol, 1996. 74(6): p. 811-21.
275. Pellegrini, G., et al., *Expression, topography, and function of integrin receptors are severely altered in keratinocytes from involved and uninvolved psoriatic skin*. J Clin Invest, 1992. 89(6): p. 1783-95.
276. Mainiero, F., et al., *The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation*. Embo J, 1997. 16(9): p. 2365-75.
277. Bachelder, R.E., et al., *Activation of p53 function in carcinoma cells by the alpha6beta4 integrin*. J Biol Chem, 1999. 274(29): p. 20733-7.
278. Bachelder, R.E., et al., *p53 inhibits alpha 6 beta 4 integrin survival signaling by promoting the caspase 3-dependent cleavage of AKT/PKB*. J Cell Biol, 1999. 147(5): p. 1063-72.
279. Mariette, C., et al., *Esophageal carcinoma: prognostic differences between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma*. World J Surg, 2005. 29(1): p. 39-45.
280. Kassis, J., et al., *Tumor invasion as dysregulated cell motility*. Semin Cancer Biol, 2001. 11(2): p. 105-17.
281. Jin, H. and J. Varner, *Integrins: roles in cancer development and as treatment targets*. Br J Cancer, 2004. 90(3): p. 561-5.

6 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern, Klaus und Ursula Vay, für ihre uneingeschränkte Unterstützung während der langen Schul- und Studienzeit und die einem Dortmunder so nötige Bodenhaftung danken. Sie begleiteten meine Jahre in Hamburg aus der sicheren Distanz, ohne jemals fern gewesen zu sein. Die Familie hat mir stets einen Weg aufgezeigt ohne diesen vorzugeben und verwahrte sich gegen jeden Zweifel, dass auch ich – mit einer gewohnten zeitlichen Verzögerung – Begonnenes zum Abschluss bringe.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Stefan B. Hosch, und meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Peter Scheunemann, die mir das Thema der vorliegenden Abhandlung zur Bearbeitung überlassen haben, bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Sie haben diese Arbeit ermöglicht und mit viel Geduld begleitet und unterstützt. Zusammen mit den anderen Mitgliedern der früheren onkologischen Arbeitsgruppe des Chirurgischen Forschungslabors am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, von denen ich hier insbesondere Dr. med. Nikolas H. Stoecklein und Andreas Lübke erwähnen möchte, haben sie es verstanden, mein Interesse für die onkologische Aspekte der Chirurgie und den damit verbundenen wissenschaftlichen Hintergrund zu wecken. Den Mitarbeitern und Doktoranden der Hamburger Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der Etablierung der Färbemethode. So war es vor allem auch die gemeinsame Tätigkeit mit diesen langjährigen Begleitern, die mich auf eine schöne Zeit im 1. Stockwerk des Pav. 20.1 am UKE zurückblicken lassen.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel verdanke ich die nachhaltige Begeisterung für das weite Feld der Allgemeinchirurgie. Für den gewährten Vertrauensvorschuss bin ich sehr dankbar und freue mich, in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie am Universitätsklinikum Düsseldorf im Kreise vieler geschätzter Wegbegleiter und -bereiter gleichsam einen Ort zur wissenschaftlichen Betätigung und für die klinische Ausbildung gefunden haben zu dürfen.

Herrn Detlef Pauly, Facharzt für Chirurgie, danke ich für die kritische Prüfung meines Interesses am ärztlichen Beruf im Allgemeinen und für die Chirurgie im Besonderen während meines Zivildienstes.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christoph A. Klein und allen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe am Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München, die mir während meiner Zeit als Gast in ihren Reihen beim Verfassen der Dissertationsschrift mit gutem Rat und Zuspruch zur Seite gestanden haben; in ihrer Mitte erweitert sich nicht nur der wissenschaftliche Horizont.

Meiner Freundin Kerstin Janssen danke ich für ihre unermüdliche und manchmal hartnäckige Unterstützung. Aus Deinem Frohsinn, Deiner Zuversicht und Deinem Vertrauen lässt Du mich einen großen Teil meiner Kraft schöpfen. Danke vor allem aber für unsere gemeinsame Zeit jenseits von klinischer Tätigkeit, Laborarbeit und Integrin-Expression, die in den Jahren immer wieder zu kurz gekommen ist.

7 Lebenslauf

Name: Christian Vay

Geburtsdatum: 11.10.1973

Geburtsort: Dortmund

Familienstand: ledig

1980 – 1984 Besuch der Grundschule in Dortmund

1984 – 1993 Besuch des Gymnasiums an der Schweizer Allee in Dortmund

08/1990 – 11/1990 Besuch der Watsonville High School, Watsonville, Kalifornien, USA

06/1993 Allgemeine Hochschulreife

08/1993 – 10/1994 Zivildienst am Evangelischen Krankenhaus Schwerte, Schwerte a. d. Ruhr

04/1995 – 06/2002 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

03/1997 Ärztliche Vorprüfung

03/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

03/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

06/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

02/2003 – 08/2003 Arzt im Praktikum, Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. J. R. Izbicki), Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

09/2003 – 07/2004 Arzt im Praktikum, Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. W. T. Knoefel), Universitätsklinikum Düsseldorf

08/2004 Approbation als Arzt

08/2004 – 09/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Seit 09/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Immunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München

8 Zusammenfassung

Untersuchung zur Expression der Integrin-Untereinheiten α_2 , α_3 , α_6 , β_1 und β_4 beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

Christian Vay

Einleitung: Integrine sind heterodimere Adhäsionsmoleküle, die sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammensetzen. Sie tragen als Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle zur Stabilität von Zellverbänden bei, ermöglichen durch dynamische Zell-Matrix-Interaktion die Zellmigration und beeinflussen als Signaltransduktoren die Zelldifferenzierung und -proliferation. Veränderungen der Integrinexpression können bei vielen soliden Tumoren nachgewiesen werden, wobei aberrante Integrin-Expressionsmuster häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Zur Integrin-Expression beim Ösophaguskarzinom ist bislang nur wenig bekannt.

Material und Methoden: Die Primärtumoren von 36 Patienten mit einem Ösophagus-Plattenepithelkarzinom (OSCC) wurden mittels Immunfluoreszenz-Färbung auf die Expression der Integrin-Untereinheiten α_2 , α_3 , α_6 , β_1 und β_4 untersucht. Dabei wurde sowohl die Expressionsstärke als auch das Expressionsmuster berücksichtigt und mit der Integrin-Expression der normalen Ösophagasmukosa verglichen. Die Expressionsprofile der einzelnen Tumoren wurden einer hierarchischen Ähnlichkeitsanalyse unterzogen und daraus hervorgegangene Patientensubgruppen mit ähnlichem Integrin-Expressionsverhalten auf gemeinsame pathohistologische und prognostische Merkmale untersucht.

Ergebnisse: Die Überexpression der Integrin-Untereinheiten α_2 , α_3 und α_6 im Tumorgewebe insgesamt war tendenziell mit einem hohen Primärtumorstadium (pT3–4) assoziiert ($p < 0,05$; $p < 0,07$; $p < 0,1$). Die α_6 - und β_4 -Expression am unmittelbaren Invasionsrand hob sich bei über 90% der Tumoren mit einer verstärkten Expression vom übrigen Tumorgewebe ab. Dabei korrelierte die Stärke der α_6 -Expression auf den Tumorzellen mit direktem Kontakt zum umgebenden Stroma mit dem rezidivfreien Überleben der Patienten ($p < 0,005$). Patienten mit einer verstärkten Expression der β_1 -Untereinheit am Invasionsrand wiesen nur selten eine Lymphknotenmetastasierung (pN1) auf ($p < 0,02$). Des Weiteren überlebten Patienten, die im Primärtumorgewebe ein polarisiertes Expressionsmuster aufwiesen, wie es in der Normalmukosa beobachtet wurde, tendenziell länger rezidivfrei als Patienten, deren Tumoren eine ungeordnete Integrin-Expression aufwiesen. Insbesondere die polarisierte Expression der Untereinheiten α_6 und β_4 zeigte hier einen prognostisch günstigen Einfluss ($p < 0,06$; $p < 0,03$). Kein Tumor mit einer polarisierten α_6 -Expression wies mehr als 3 Lymphknotenmetastasen (pLK $\leq$ 3) auf: Der Nachweis von mehr als 3 Lymphknotenmetastasen (pLK $>$ 3) war signifikant mit einem verkürzten rezidivfreien Überlebensintervall assoziiert und stellte gemeinsam mit der α_6 -Expression am unmittelbaren Invasionsrand einen unabhängigen Prognosefaktor dar ($p < 0,001$; $p < 0,02$).

Schlussfolgerung: Der Nachweis eines aberranten Integrin-Expressionsmusters scheint beim OSCC mit dem raschen Progress der Tumorerkrankung zu korrelieren, wohingegen die erhaltene Polarisierung der Integrin-Expression insgesamt mit einer günstigeren Prognose einhergeht – möglicherweise Ausdruck einer stärkeren Differenzierung der Tumoren. Wie bei anderen Karzinomen könnte insbesondere die Expression des $\alpha_6\beta_4$ -Integrins am unmittelbaren Invasionsrand – Schnittstelle zwischen primärem Tumorzellverband und der ECM des infiltrierten Normalgewebes – einen potentiellen Indikator zur Beurteilung der Aggressivität von Ösophagus-Plattenepithelkarzinomen darstellen.

Universitätsklinikum Düsseldorf
Zentrum für Operative Medizin I
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
Stellv. Direktor: PD Dr. S. B. Hohen
Hausanschrift: Moorenstraße 5 · D-40225 Düsseldorf
Postfach 10 10 07 · D-40001 Düsseldorf