

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

Untersuchung der tumorspezifischen
Expression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls EpCAM in
Magenkarzinomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Agnieszka Dulian

2015

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

gez:

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

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stoecklein

Zweitgutachter: Prof. Dr. Schulz

meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

BMC Res Notes, 2013 Jul 5; 6:253. doi: 10.1186/1756-0500-6-253

Kroepil F, Dulian A, Vallböhmer D, Geddert H, Krieg A, Vay C, Topp SA, am Esch JS, Baldus SE, Gires O, Knoefel WT, Stoecklein NH. ***“High EpCAM expression is linked to proliferation and lauren classification in gastric cancer”*** Department of Surgery (A), Heinrich-Heine-University and University Hospital Duesseldorf, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany.

Zusammenfassung

Das Magenkarzinom stellt trotz rückläufiger Inzidenz eine relevante krebssbedingte Todesursache dar. Problematisch ist eine häufig erst in späten Stadien erfolgende Diagnosestellung, wodurch Therapieansätze mit kurativem Ansatz limitiert sind. In diesem Zusammenhang erscheint das epitheliale Antigen EpCAM interessant, da es als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt für systemische Therapien genutzt werden könnte. Um ein tieferes Verständnis über die Expression von EpCAM bei Magenkarzinomen zu bekommen, sollte in dieser Arbeit dessen Expression bei den unterschiedlichen histologischen Typen des Magenkarzinoms untersucht werden und geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen EpCAM-Expression und Proliferation besteht.

Anhand eines Tissue microarrays (TMA) wurde in dieser Arbeit die Expression und der prognostische Einfluss des EpCAM in Magenkarzinomen unter Berücksichtigung der histologischen Typen nach Laurén und der TNM-Klassifikation untersucht. Für die Fragestellung nach dem Zusammenhang von EpCAM-Expression mit Proliferation wurde die EpCAM-Expression mit der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 verglichen.

Es erfolgte die immunhistochemische Anfärbung eines TMA bestehend aus Proben von 163 Magenkarzinomen, (n = 61 vom diffusen, n = 62 vom intestinalen und n = 32 vom mixed Typ; n = 8 nicht klassifizierbar) mit dem monoklonalen Antikörper Ber-EP4. Ausgewertet wurde gemäß des HercepTest-Scores (Dako). Die Ki-67-Expression des TMA wurde anhand des Medians in eine schwach (<7%) und stark exprimierende (>7%) Gruppe eingeteilt. Die Expression von EpCAM und Ki-67 wurde statistisch korreliert. Neben den Primärtumoren lagen in 88 Fällen auch die zugehörigen LK-Metastasen zur Begutachtung vor. Die Expression wurde sowohl im Gesamttumor als auch separat in den Arealen Tumorzentrum und Invasionsfront beurteilt.

Die Expression von EpCAM wurde in 77% der Karzinome beobachtet. Dabei war die EpCAM-Expression bei 58% (n = 74) der Tumore homogen, während 42% (n = 54) ein unterschiedliches Expressionsmuster zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront aufwiesen. Eine stärkere EpCAM-Expression in der Invasionsfront ging signifikant mit einer ausgeprägteren Lymphknotenmetastasierung ($p = 0,03$) und kürzeren mittleren Überlebensdauer ($p = 0,001$) einher. Diese Beobachtung war signifikant stärker ($p = 0,04$) beim diffusen Typ nach Laurén. In multivariaten Überlebensanalysen (Cox-Regression) erwies sich eine starke EpCAM-Expression in der Invasionsfront als ein unabhängiger prognostisch negativer Faktor. Eine signifikante Korrelation ($p = 0,001$) zwischen EpCAM- und Ki-67-Expression zeigte sich unabhängig von Lokalisation und Tumortyp.

Insgesamt lassen diese Beobachtungen die Schlussfolgerung zu, dass die EpCAM-Expression beim Magenkarzinom mit Proliferation und Tumorprogression in Zusammenhang steht. Daher könnte EpCAM einen möglichen Ansatzpunkt für zielgerichtete systemische Therapien bei stark EpCAM-exprimierenden Tumoren bieten.

Abkürzungsverzeichnis

A.dest	destilliertes Wasser
AEG	adenocarcinoma of the esophagogastric junction
Ber-Ep4	Primärantikörper gegen EpCAM (Immunhistochemische Färbung)
Ca	Karzinom
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EMT	epitheliale mesenchymale Transition
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
IF	Invasionsfront
Ki-67	Kiel-67 (Proliferationsmarker)
LK	Lymphknoten
min	Minute
MOPC	Antikörper der Isotypkontrolle (Negativkontrolle der EpCAM-Anfärbung)
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
PBS	(= Phosphate buffered saline) Phosphatgepufferte Natriumchloridlösung
RNA	(= Ribonucleic Acid) Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
siRNA	small interfering RNA
TMA	Tissue microarray
TNM	T = Tumor; N = Nodes; M = Metastasis
TZ	Tumorzentrum
UICC	Union internationale contre le cancer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Das Magenkarzinom.....	1
1.1.1. Epidemiologie.....	1
1.1.2. Morphologie und Pathogenese.....	1
1.1.2.1. Risikofaktoren.....	2
1.1.3. Klassifikation von Magenkarzinomen.....	3
1.1.3.1. Laurén-Klassifikation.....	4
1.1.4. Klinik und Diagnostik.....	5
1.1.5. Metastasierung.....	7
1.1.6. Therapiekonzepte.....	7
1.2. Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM).....	9
1.2.1. Biologie und Vorkommen.....	9
1.2.2. Expression von EpCAM in Karzinomen.....	12
1.2.3. EpCAM als therapeutische Zielstruktur.....	13
1.2.4. EpCAM-Expression in Magenkarzinomen.....	15
1.3. TMA (Tissue Microarray).....	16
1.3.1. Vorteile der TMA-Technik.....	16
1.3.2. Nachteile der TMA-Technik.....	17
1.4. Fragestellung und Zielsetzung.....	19
2. Material & Methoden.....	20
2.1. Material.....	20
2.1.1. Reagenzien.....	20
2.1.2. Geräte und Software.....	20
2.1.3. Tumorproben.....	21
2.1.4. Kontrollen der immunhistochemischen Färbung.....	24
2.2. Methoden.....	24
2.2.1. Herstellung des TMA (Tissue Microarray).....	24
2.2.2. Anfertigung der Schnittpräparate.....	26
2.2.3. Immunhistochemische Färbung.....	27
2.2.3.1. Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode.....	27
2.2.3.2. Durchführung.....	27
2.2.3.3. Auswertung.....	29
2.2.4. Ki-67-Färbung.....	30
2.2.5. Statistik.....	30
2.2.5.1. Chi-Quadrat-Test und Fisher's exact Test.....	30
2.2.5.2. Überlebensanalyse.....	30
3. Ergebnisse.....	31
3.1. Evaluation der Qualität der TMA-Herstellung.....	31
3.2. Ergebnisse der Immunhistochemie.....	32

3.2.1. EpCAM-Expression in Normalschleimhaut und intestinaler Metaplasie.....	32
3.2.2. EpCAM-Expression im Karzinomgewebe.....	34
3.2.2.1. Vergleich der EpCAM-Expression von Tumorzentrum und Invasionsfront..	36
3.2.3. EpCAM-Expression im Karzinomgewebe unter Berücksichtigung der Laurén-	
Klassifikation.....	37
3.2.3.1. EpCAM-Expression im Tumorzentrum.....	38
3.2.3.2. EpCAM-Expression in der Invasionsfront.....	39
3.2.3.3. Vergleich der EpCAM-Expression zwischen Tumorzentrum und	
Invasionsfront.....	40
3.2.4. EpCAM-Expression in Lymphknotenmetastasen.....	41
3.2.4.1. Vergleich der EpCAM-Expression von Tumorzentrum, Invasionsfront und	
Lymphknotenmetastasen.....	43
3.2.5. Korrelation der EpCAM-Expression mit histopathologischen Parametern.....	44
3.3. Ki-67-Expression.....	47
3.3.1. Ki-67-Expression in der Normalschleimhaut.....	47
3.3.2. Ki-67-Expression in Tumorgewebe und Lymphknoten-Metastasen.....	47
3.3.3. Korrelation zwischen Ki-67-positiven Zellen und EpCAM-Expression.....	50
3.3.3.1. Subanalyse der histologischen Typen nach Laurén.....	52
3.4. Überlebensanalyse.....	53
3.4.1. Prognostischer Einfluss der histopathologischen Parameter.....	53
3.4.2. Prognostischer Einfluss der EpCAM-Expression.....	54
4. Diskussion.....	57
5. Anhang.....	65
5.1. Tabellenverzeichnis.....	65

1. EINLEITUNG

1.1. DAS MAGENKARZINOM

1.1.1. Epidemiologie

Das Magenkarzinom ist die achthäufigste Tumorentität bei Frauen, die fünfhäufigste bei Männern und derzeit verantwortlich für 5% aller tumorbedingten Todesfälle in Deutschland. In den letzten 30 Jahren gab es in Deutschland und auch anderen westlichen Ländern eine rückläufige Inzidenz und Mortalität. Allerdings ist die Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 30% relativ schlecht. Der Erkrankungsgipfel liegt um das 70. Lebensjahr, hierbei sind Männer viel häufiger betroffen als Frauen [1].

Weltweit ist das Magenkarzinom die vierthäufigste Krebsart. Hochrisikogebiete sind Japan, China, Osteuropa und Lateinamerika; Gebiete mit niedrigen Inzidenzen sind Südasien, Nord- und Ostafrika, Nordamerika, Australien und Neuseeland [2].

Im Grundsätzlichen sollte unterschieden werden zwischen Adenokarzinomen der Kardia bzw. des gastroösophagealen Übergangs und den distalen Magenkarzinomen. Diese unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Lokalisation, sondern auch in Bezug auf ihre Ätiologie und Epidemiologie [3]. Kardiakarzinome zeigen eine steigende Inzidenz, sie treten vor allem in westlichen Ländern bei der männlichen weißen Population mit gastroösophagealem Reflux auf. Sie zählen seit 1998 zu den Adenokarzinomen des gastroösophagealen Übergangs (AEG = adenocarcinoma of the esophagogastric junction) [4] und sollten daher von den distalen Magenkarzinomen abgegrenzt werden. Im Gegensatz zu den Kardiakarzinomen ist deren Inzidenz in der westlichen Welt rückläufig [3].

1.1.2. Morphologie und Pathogenese

Das Adenokarzinom des Magens ist ein maligner epithelialer Tumor, der von primären Zellen des Drüsenhalsbereichs oder sekundär von metaplastischen Zellen ausgeht. Es macht etwa 90% aller Magentumoren aus und ist in $\frac{2}{3}$ der Fälle im Bereich der kleinen Kurvatur im Antrum lokalisiert [1].

Die Pathogenese distaler Magenkarzinome ist multifaktoriell; wichtigster Faktor ist nach heutigen Erkenntnissen die chronische Gastritis, vor allem auf dem Boden einer *Helicobacter pylori* Infektion [5][6]. Durch den entzündlichen Vorgang sinkt die Säuresekretion, wodurch sich die physiologische Flora verändert und anaerobe Bakterien den Magen besiedeln können. Diese sind bekannt dafür, dass sie in der Lage sind, mit der Nahrung aufgenommene Nitrate in karzinogene N-nitroso-Verbindungen umzuwandeln. Bedingt durch die Steigerung der Proliferationsrate des Epithels durch Reparaturvorgänge und infolge der DNA-Schädigung durch anfallende freie Radikale, Oxidantien und reaktive Nitroso-Verbindungen kann es zur Entdifferenzierung und somit zu einer präkanzerösen Läsion kommen. Durch die chronische *Helicobacter pylori* Infektion wird eine Sequenz eingeleitet, die folgende Schritte beinhaltet: chronische Gastritis → multifokale Atrophie → intestinale Metaplasie → intraepitheliale Neoplasie [6][7].

1.1.2.1. Risikofaktoren

Als Präkanzerose (insbesondere für den intestinalen Typ des Magenkarzinoms, s.u.) gilt in erster Linie die chronische Gastritis und die damit einhergehende intestinale Metaplasie. Die *Helicobacter pylori* Gastritis ist darunter die häufigste Ursache [7]. Die autoimmune Gastritis führt ebenfalls über das Auftreten fokaler Atrophien gehäuft zur einer intestinalen Metaplasie [5].

Im Rahmen der Karzinogenese gelten ebenfalls Ernährungsgewohnheiten als Risikofaktor, beispielsweise der Verzehr von stark gesalzenen, gepökelten und geräucherten Speisen, sowie ein Mangel an frischem Obst und Gemüse [1]. Rauchen und ein erhöhter Alkoholkonsum zeigen sich ebenfalls als Risikofaktoren, da sie entzündliche Schleimhautveränderungen nach sich ziehen. Die wichtigste Rolle spielt jedoch die *Helicobacter pylori* Infektion [1][7]. Eine vergleichsweise geringere Rolle scheinen auch hereditäre Faktoren zu spielen; familiär gehäuftes Auftreten wird bei etwa 8-10% der Magenkarzinome beschrieben [5]. Eine in diesem Zusammenhang beschriebene genetische Ursache ist die Keimzelllinien-Mutation im CDH1-Gen (E-cadherin), welche zu einer autosomal-dominanten Prädisposition zum HDGC (hereditary diffuse gastric carcinoma) führt. Ebenso tritt das Magenkarzinom auch im Rahmen des hereditären non-polypösen Kolonkarzinoms (Lynch-Syndrom, HNPCC), der familiären adenomatösen Polyposis (FAP)

und des Peutz-Jeghers-Syndroms auf [5]. Als weitere, eher seltenere Risikofaktoren gelten: M.Ménétrier, perniziöse Anämie, Blutgruppe A, Z.n. Magen-Op aus benignen Ursachen (→ Magenstumpf-Ca) und Adenome des Magens [1].

1.1.3. Klassifikation von Magenkarzinomen

T-Kategorie (Primärtumor)

Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
To	kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: Intraepithelialer Tumor ohne Invasion der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert Lamina propria oder Submukosa (=Frühkarzinom)
T2	T2a: infiltriert Muskularis
	T2b: infiltriert Subserosa
T3	penetriert Serosa, wächst nicht in Nachbarorgane ein
T4	infiltriert Nachbarorgane

N-Kategorie (regionäre Lymphknotenmetastasen)

Nx	regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
No	kein Lymphknotenbefall
N1	1-6 Lymphknoten befallen
N2	7-15 Lymphknoten befallen
N3	>15 Lymphknoten befallen

M-Kategorie (Fernmetastasierung)

Mx	Fernmetastasierung nicht beurteilbar
Mo	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Abbildung 1: TNM-Klassifikation

histopathologische Klassifikation. T beschreibt die die Invasionstiefe des Primärtumors, N die regionäre Lymphknotenmetastasierung, M die Fernmetastasierung; 6.Edition, 2002

Magenkarzinome können nach verschiedenen Kriterien eingeteilt werden: nach ihrer anatomischen Lokalisation, nach ihrem makroskopischen Wachstumsmuster [8], nach ihren histologischen Merkmalen [9], sowie nach ihrer Eindringtiefe (TNM-Klassifikation), (Abbildung 1). Die Stadieneinteilung erfolgt nach UICC (Union internationale contre le cancer, Abbildung 2).

Stage 0	Tis	No	Mo
Stage IA	T1	No	Mo
Stage IB	T1	N1	Mo
	T2	No	Mo
Stage II	T1	N2	Mo
	T2	N1	Mo
	T3	No	Mo
Stage IIIA	T2	N2	Mo
	T3	N1	Mo
	T4	No	Mo
Stage IIIB	T3	N2	Mo
Stage IV	T4	N1,2,3	Mo
	T1,2,3	N3	Mo
	jedes T	jedes N	M1

Abbildung 2: UICC-Stadien

Stadieneinteilung nach der Union internationale contre le cancer (6.Edition, 2002), diese ist angelehnt an die TNM-Klassifikation

1.1.3.1. Laurén-Klassifikation

Bei der Laurén-Klassifikation [9] wird unterschieden zwischen dem diffusen und dem intestinalen Magenkarzinom. Tumoren, die Charakteristika beider Typen aufweisen, werden

als mixed Typ bezeichnet. Karzinome, die aufgrund einer unzureichenden Differenzierung keinem der beschriebenen Typen zugeordnet werden können, werden als „unbestimmt“ eingestuft.

Intestinales Karzinom

Es handelt sich um gut bis moderat differenzierte Tumoren, die drüsige Strukturen ausbilden, gelegentlich mit Papillen oder soliden Elementen. Sie entstehen meist auf dem Boden einer chronisch-atrophischen Gastritis und intestinalen Metaplasie [10].

Diffuses Karzinom

Das diffuse Magenkarzinom besteht aus locker zusammenhaltenden Zellen, die wenig oder keine Drüsen ausbilden und stark infiltrativ wachsen. Die einzelnen Zellen sind eher klein und rund, liegen zum Teil in Zellnestern. Die Mitoserate ist kleiner als beim intestinalen Karzinom [5]. Es tritt häufiger bei jüngeren Personen, vor allem bei Frauen, auf; vermutet wird eine genetische Prädisposition, moduliert von umweltbedingten Faktoren [5].

1.1.4. Klinik und Diagnostik

Klinisch wird das Magenkarzinom häufig erst spät manifest. Während beim Frühkarzinom (EGC = early gastric cancer) eher unspezifische gastrointestinale Beschwerden wie etwa Dyspepsie vorliegen, kommen beim fortgeschrittenen Karzinom abdominelle Schmerzen, Blutungen oder auch Übelkeit/Erbrechen hinzu. Allgemeine Symptome wie Gewichtsverlust geben Hinweise auf eine systemische Erkrankung. Der Mangel an frühen Symptomen verzögert die Diagnosestellung, so dass 80-90% der Magenkarzinome erst in einem fortgeschrittenen, meist metastasierten Stadium erkannt werden [5].

Massen-Screening-Programme in Japan konnten eine Früherkennungsrate von rund 80% erzielen, wobei die Gruppe der asymptomatischen Patienten sogar in 30-50% ein Frühkarzinom (EGC) zeigte. Leider war dieser positive Früherkennungswert stark auf die hohe Inzidenz in Japan zurückzuführen. In westlichen Ländern entdeckte man unter Verwendung der gleichen Screening-Methoden hingegen nur 16-24% EGC bei asymptomatischen Patienten [5].

In der Diagnostik ist die Gastroskopie heutzutage der Goldstandard, um bereits frühe Veränderungen in der Magenschleimhaut festzustellen [5]. Magenfrühkarzinome können anhand ihres makroskopischen Wachstumsmusters in die Typen I-III eingeteilt werden, fortgeschrittene Magenkarzinome werden nach der Borrmann-Klassifikation [8] in die Typen I-IV eingeteilt:

- I: exophytisch
- II: schüsselförmig ulzerierend
- III: ulzerös und infiltrierend
- IV: diffus infiltrierend

Zur Beurteilung der Eindringtiefe kann die Endosonographie eingesetzt werden. Um metastatischen Lymphknotenbefall und Fernmetastasen zu detektieren, wird ein Staging mittels perkutaner Sonographie des Abdomens und eine Computertomographie von Thorax und Abdomen durchgeführt [5].

Das Problem der frühzeitigen Diagnose der Dysplasie liegt neben der Beschwerdearmut der Patienten ebenfalls in der Schwierigkeit der morphologischen Abgrenzung zu entzündlichen/reaktiven oder regenerativen Veränderungen. Es wird jedoch ebenfalls beschrieben, dass sich in zuvor unverändertem Epithel eine Dys- bzw. Neoplasie entwickeln kann. Man kann zwischen einer low-grade und high-grade Läsion unterscheiden [5]. Während bei der low-grade Neoplasie die Architektur der Mukosa noch teilweise erhalten ist, ist sie bei der high-grade Neoplasie aufgehoben und es zeigen sich deutliche Zellatypien. In beiden Fällen liegt noch keine Invasion der Basalmembran vor (Carcinoma in situ). Die Infiltration der Basallamina findet allerdings in etwa 80% der Fälle im weiteren Verlauf statt. Infolgedessen ist bei Vorliegen einer intraepithelialen Neoplasie ein Handlungsbedarf gegeben [5]. Dies beinhaltet eine lokale Resektion der neoplastischen Areale bis hin zur Magenteilresektion.

1.1.5. Metastasierung

Die Metastasierung erfolgt beim Magenkarzinom mittels direkter Invasion, lymphatischer und hämatogener Metastasierung oder als Peritonealkarzinose. Tumoren vom diffusen Typ metastasieren häufig transperitoneal in anliegende Organe wie das Duodenum, der intestinale Typ metastasiert eher hämatogen in die Leber. Lymphknotenbefall ist bei diesen beiden Typen gleich häufig. Tumoren vom mixed Typ weisen, wie der Name vermuten lässt, beide Metastasierungswege auf [5].

1.1.6. Therapiekonzepte

Die Therapie der Wahl für das Magenkarzinom ist die vollständige Resektion des Primärtumors mittels totaler oder partieller Gastrektomie. Beim intestinalen Typ ist ein Sicherheitsabstand von 5 cm zum gesunden Gewebe, beim diffusen Typ sogar von 8-10 cm nötig [11]. Wegen einer möglichen Metastasierung wird eine Lymphadenektomie der lokalen Lymphknoten durchgeführt. Gegebenenfalls müssen benachbarte Teile von Ösophagus, Duodenum sowie Milz oder Leber entfernt werden.

Beim proximalen (Kardia-) Karzinom wird zumeist eine transhiatale erweiterte Gastrektomie durchgeführt. Tumoren des mittleren Drittels werden mittels totaler Gastrektomie reseziert, distale Magenkarzinome können mit einer subtotalen, andernfalls mit einer totalen Gastrektomie entfernt werden [12] (Abbildung 3). Je nach Tumorstadium und Metastasierungsgrad wird zusätzlich zur Resektion eine neoadjuvante oder adjuvante (Radio-)Chemotherapie durchgeführt.

Bei Vorliegen von Fernmetastasen ist die Therapie nur palliativ möglich. Eine kurative primäre Resektion wird nicht durchgeführt. Gegebenenfalls kann eine Massenreduktion erwogen werden [12].

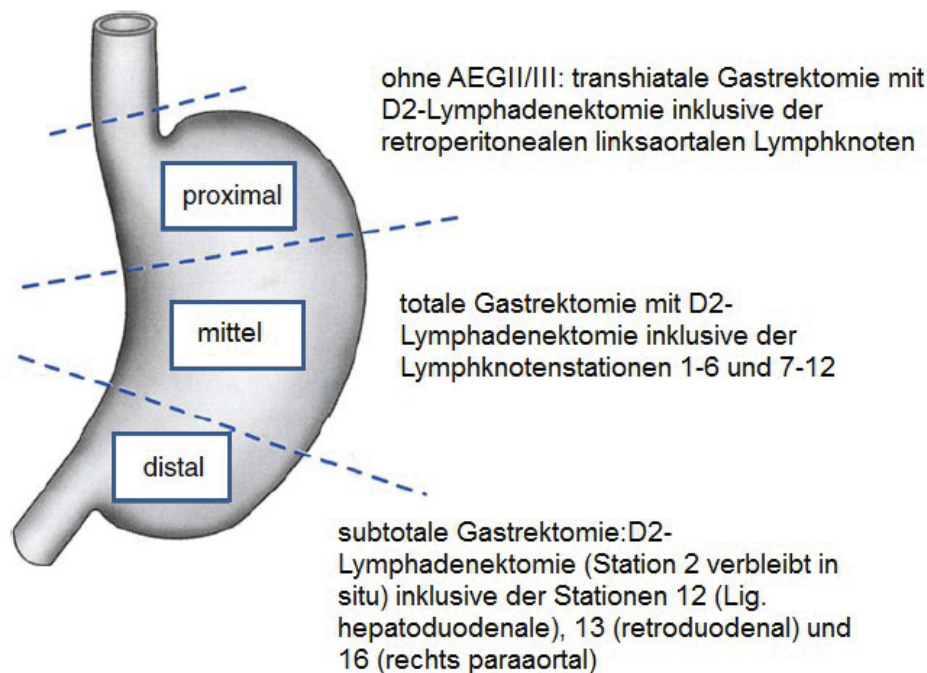


Abbildung 3: Chirurgische Therapie des Magenkarzinoms

modifiziert nach Ott K., Gastric cancer: surgery in 2011, Langenbecks Arch Surg 2010 [12]

Als Meilenstein in der Chemotherapie von gastroösophagealen Karzinomen gilt 5-Floururacil [13]. Insgesamt gibt es viele verschiedene Ansätze für Kombinationstherapien, unter anderem mit Prodrugs von 5-FU, Cisplatin, Topoisomerase-Inhibitoren, Epirubicin oder Doxorubicin. Kombinationstherapien bestehend aus Platinderivaten mit Flourpyrimidinen sind derzeit das Rückgrat moderner Chemotherapien [13]. Leider konnte jedoch für keine der verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten bisher ein signifikanter Effekt auf die Mortalität und Prognose nachgewiesen werden, so dass es aktuell keine international anerkannte Standardtherapie gibt [13].

Im MAGIC Trial [14] konnte der Vorteil einer perioperativen Chemotherapie mit ECF (Epirubicin, Cisplatin, Floururacil) im Gegensatz zur alleinigen Resektion nachgewiesen werden. Das 5-Jahres-Überleben betrug in der Gruppe der Patienten mit perioperativer ECF-Behandlung 36%, im Vergleich zu 23% bei der Gruppe der alleinigen chirurgischen Therapie [14]. Diese Studie wies jedoch einige methodische Mängel auf, unter anderem in Bezug auf

das präoperative Staging und die chirurgische Therapie, so dass zunächst weitere Arbeiten hierzu notwendig sind [15].

In Japan gilt bei Lymphknoten-positiven resezierten Magenkarzinomen das orale Flouropyrimidin S-1 als Standardtherapie [16]. Eine Erprobung dieses Wirkstoffs in nicht-asiatischen Bevölkerungsgruppen steht noch aus. In den USA gilt eine adjuvante Chemoradiotherapie als Mittel der Wahl [13]. Neoadjuvante Chemotherapien konnten als effiziente und sichere Methode zur Reduktion der Tumormasse beschrieben werden [12] und scheinen auch in der Zukunft eine vielversprechende Therapieoption zu sein.

Neben der chirurgischen Resektion und Radiochemotherapie bieten Antikörpertherapien einen neuen Zweig in der Therapie vieler Malignome. Im Falle des Magenkarzinoms werden derzeit potenzielle Zielstrukturen erforscht. So zeigte der Einsatz von Trastuzumab (Antikörper gegen den HER-2/neu-Rezeptor) bei HER2-positiven Tumoren bereits gute Erfolge [17]. Eine weiterer möglicher Angriffspunkt für eine antikörperbasierte Therapie liefert das Oberflächenantigen EpCAM, dessen Expression im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde.

1.2. DAS EPITHELIALE ZELLADHÄSIONSMOLEKÜL (EpCAM)

1.2.1. Biologie und Vorkommen

Das tumor-assoziierte Antigen EpCAM ist ein transmembranäres 40 kDa Glykoprotein, welches auf der basolateralen Oberfläche von Zellen während der embryologischen Entwicklung, sowie auf bestimmten adulten epithelialen Zellen des menschlichen Organismus exprimiert wird. Es wird kodiert von dem EPCAM-Gen auf Chromosom 2p21 kodiert [18], welches früher als TACSTD₁ (tumour-associated calcium signal transducer protein 1-precursor) [19] bezeichnet wurde.

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül wurde von vielen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander identifiziert, weswegen viele Synonyme (GA733-2, EPG40, KSA, 17-1A antigen,

ESA) in Verwendung waren. Mit dem Bestreben nach einer einheitlichen Nomenklatur wurde 2006 der Name EpCAM gewählt. Als weitere Bezeichnung kann auch CD326 verwendet werden [20].

EpCAM hat sich seit seiner Erstbeschreibung in den 1970er Jahren durch Herlyn et al [21] zu einem etablierten histopathologischen Marker für Epithelzellen entwickelt. So erachtet man es als eines der häufigsten und stärksten exprimierten Tumorantigene [20]. Eine gesteigerte Expression wurde bei epithelialen Stamm- und Progenitorzellen, sowie Karzinomzellen und Tumor-initiiierenden Zellen, unter Anderem bei Mamma- [22], Pankreas- [23] und Prostatakarzinomen [24] beschrieben. Darüber hinaus ließ sich eine höhere EpCAM Expression auch bei regenerierenden und entzündlich veränderten Epithelien nachweisen [25].

EpCAM gehört zur Familie der Adhäsionsmoleküle, wobei dem Molekül die Funktion einer Calcium-unabhängigen, homophilen interzellulären Adhäsion und Aggregation bzw. Organisation zugeordnet wird. Die Transfektion von EpCAM in adhäsionsunfähige Zellen konnte eine Zell-Aggregation vermitteln [26].

In Zellen, in denen EpCAM hochreguliert ist und die Funktion der Adhäsion einnimmt, ist die E-cadherin-vermittelte Adhäsion vermindert [27]. Die absolute Menge der Cadherin-vermittelten Adhäsionen wird hierbei nicht beeinflusst, sondern ihre inaktive lösliche Fraktion erhöht [28]. Die adhäsive, stabilisierende Funktion von EpCAM erscheint paradox, wenn man die Hochregulation des Moleküls in invasiven Karzinomen betrachtet [29]. Man ist heutzutage vor allem der Ansicht, dass EpCAM in Zusammenhang mit epithelialer Proliferation steht [30][31]. Desweiteren korreliert es negativ mit dem Grad der Zelldifferenzierung, so wird EpCAM im Rahmen der Embryogenese von Lunge, Niere, Leber, Pankreas, Haut- und Keimzellen exprimiert [19].

In adulten Geweben findet man EpCAM physiologisch nur in Zellen epithelialen Ursprungs; hiervon ausgenommen ist das Plattenepithel. Hier deutet die Expression von EpCAM auf eine Dysplasie hin [19][28]. Entlang des Gastrointestinaltraktes wird EpCAM unterschiedlich stark exprimiert: so nimmt die Expression von oral (Ösophagus und Magenschleimhaut) nach aboral (Dick- und Dünndarm) zu. Interessanterweise findet man in Dysplasien und

Metaplasien im Bereich des Ösophagus eine erhöhte EpCAM-Expression. So weist normale Ösophagusschleimhaut nahezu keine EpCAM-Expression auf, wohingegen im Rahmen der Barrett-Metaplasie EpCAM stark exprimiert wird [19][32]. Die Barrett-Metaplasie des Ösophagus stellt die stärkste Manifestation des gastroösophagealen Refluxes dar. Hier kommt es zur Umwandlung von Plattenepithel zu Zylinderepithel (intestinaler Typ, mit Becherzellen). Diese Metaplasie ist eine Präkanzerose und gilt im Bereich des gastroösophagealen Übergangs als häufigste Vorläuferläsion des Adenokarzinoms [33].

Die meisten Karzinome exprimieren EpCAM sehr stark. Hier weisen vor allem Plattenepithelkarzinome eine hohe EpCAM-Expression auf [34]. Eine Ausnahme stellen Plattenepithelkarzinome der Haut dar [19]. Da EpCAM nur in Tumoren epithelialer Herkunft de-novo bzw. überexprimiert zu sein scheint, kann es daher als differenzialdiagnostischer Marker zur Unterscheidung von Basalzell- und Plattenepithelkarzinomen der Haut [19], sowie auch von hepatozellulären Karzinomen und Cholangiokarzinomen der Leber [31][25] verwendet werden.

Das EPCAM-Gen ist etwa 14 kb groß; die neun Exons kodieren für eine extrazelluläre, eine transmembranäre und eine zytoplasmatische (intrazelluläre) Domäne [35]. Die extrazelluläre Domäne EpEx kann in verschiedenen Glykolisierungsformen gefunden werden. Vermutlich ist hierin auch die Variabilität ihrer Funktion in Normalgewebe oder Karzinomgewebe begründet [29]. Die intrazelluläre Domäne EpICD (intracellular domain) ist in Arealen der Zell-Zell-Kontakte membranär nicht nachzuweisen, weshalb vermutet wird, dass in diesen Kontakt-Zonen die Abspaltung der Domäne induziert wird. In den gleichen Zellen fand man sowohl im Zytoplasma als auch para- und intranukleär eine Anfärbung von EpICD. Die Translokation von EpICD in den Zellkern beschränkte sich nur auf die Zellen des Kolonkarzinoms und war im Normalgewebe nicht nachweisbar [30].

Es gilt als erwiesen, dass EpCAM die Expression der Gene MYC (c-MYC), CCNA (Cyclin A) und CCNE (Cyclin E) hochzuregulieren vermag und dadurch den Zellzyklus aktivieren und Proliferation fördern kann. Die EpCAM exprimierenden Zellen waren weniger abhängig von Wachstumsfaktoren, zeigten ein gesteigertes Wachstum und gesteigerten Metabolismus, was mit einer Hochregulation von MYC in Einklang zu bringen ist. Hierfür scheint EpICD maßgeblich verantwortlich zu sein [36].

Um den Einfluss auf das Zellwachstum zu objektivieren, wurde bereits im Falle des Cervixkarzinoms die EpCAM-Expression mit der Expression eines etablierten Proliferationsmarkers verglichen [37]. Hier handelte es sich um Ki-67 (Kiel-67), ein nukleäres Protein, welches während des Zellzyklus in der G₁-, S-, G₂- und in der M-Phase exprimiert wird [38]. Ruhende Zellen (Go-Phase) exprimieren das Antigen nicht [39]. Die Expression des Ki-67 kann daher Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Gewebes/Tumors geben [38].

1.2.2. Expression von EpCAM in Karzinomen

Fast alle epithelialen Malignome exprimieren EpCAM in verschiedenem Ausmaß auf ihrer Oberfläche. Beispiele hierfür sind das Bronchial- [24], das Mamma- [40], das Prostata- [24], das Nierenzell- [41] und das kolorektale Karzinom [42]. Hingegen wiesen nicht-epitheliale Malignome wie Melanome, primäre ZNS-Tumoren, Sarkome, Lymphome und Keimzelltumoren keine EpCAM-Expression auf [43].

Eine Übersicht der EpCAM-Expression verschiedener Karzinome wird im Folgenden gezeigt:

Tumorentität	Anteil EpCAM-positiver Tumore	prognostische Relevanz	Quelle
Ampulläres Ca	85%	negativer Einflussfaktor	[23]
Blasen-Ca		negativer Einflussfaktor	[44]
Bronchial-Ca	64%	positiver Einflussfaktor	[24]
Cholangiozelluläres Ca	100%	---	[25]
Gallenblasen-Ca	63,6%	negativer Einflussfaktor	[45]
	32% stark, 28% moderat	negativer Einflussfaktor	[46]
Hepatozelluläres Ca	14,3%	---	[25]
Insulinom	78-80% stark	Trend zum schlechteren Überleben	[47]
Karzinome der Kopf-/Halsregion	29%	---	[48]
Kolon-Ca	97,1%	nein	[24]

Tumorentität	Anteil EpCAM-positiver Tumore	prognostische Relevanz	Quelle
Magen-Ca	90,7% high-level	---	[24]
	96%	---	[49]
	98%	---	[50]
	93%	positiver Einflussfaktor	[51]
	50% (71% in Kardia)	---	[52]
Mamma-Ca	41,7% high, 48% low	negativer Einflussfaktor	[53]
	35,6%	negativer Einflussfaktor	[22][54]
	---	negativer Einflussfaktor	[55]
Nierenzell-Ca	abhängig von Art des Ca	negativer Einflussfaktor	[56]
	29% der klarzelligen Ca	Trend zum besseren Überleben	[41]
	keine Angabe	positiver Einflussfaktor	[57]
Ösophagus-Ca	79%	negativer Einflussfaktor	[34]
Ovarial-Ca	mRNA >100-fach höher im Vergleich zu Normalepithel	---	[58]
Pankreas-Ca	56%	in fortgeschrittenen Stadien negativer Einflussfaktor	[23]
Plattenepithel-Ca der Kopf-/Halsregion	22,1%	kein Einfluss	[59]
Prostata-Ca	87,2%	nein	[24]
Schilddrüsen-Ca	81,3% der differenzierten Ca 66,6% der schwach differenzierten Ca 0% der anaplastischen Ca	---	[60]

1.2.3. EpCAM als therapeutische Zielstruktur

Auf der Suche nach neuen Therapiemodalitäten gegen verschiedene Tumorentitäten stellt die Antikörpertherapie eine vielversprechende Möglichkeit dar. Ein seit Jahren erfolgreiches Beispiel hierfür ist der Einsatz von Trastuzumab (anti-HER-2) beim Mammakarzinom [61]. Auch Studien, die gegen EpCAM gerichtete therapeutische Antikörper überprüften, zeigten zum Teil Behandlungserfolge. Die Arbeitsgruppe um G. Riethmueller zeigte 1994 mit mAb 17-1A (später Edrecolomab genannt) als erste einen klinischen Benefit für die Verwendung

von einem monoklonalen anti-EpCAM-Antikörper. Bei chirurgisch resezierten Dukes C kolorektalen Karzinomen konnte eine Senkung der Mortalität um 32% und eines Rezidivs um 23% festgestellt werden [62][63]. In weiteren Studien zeigte sich jedoch kein Vorteil im Vergleich zu den üblichen adjuvanten Chemotherapien. In Kombinationstherapie mit 5-FU und Folsäure wurde ebenfalls kein Vorteil festgestellt [64].

Einen komplett humanisierten monoklonalen Antikörper gegen EpCAM stellt Adecatumumab (MT201) dar. Dieser Antikörper löste *in vitro* eine größere Antikörper-induzierte Zelltoxizität als Edrecolomab aus [65]. Anhand von Zellkulturmodellen konnte im Falle von Cervix- [66], Mamma- [67], sowie an Ovarialkarzinomen [68][69] *in vitro* eine starke Sensitivität EpCAM-positiver Zellen für Adecatumumab beobachtet werden.

Eine vergleichende Studie aus dem Jahr 2010 zeigte die Überlegenheit von Adecatumumab gegenüber anderen EpCAM-Antikörpern. Trotz der besseren Bindungsaffinität von ING-1 und 3622W94 (ebenfalls vollständig humanisierte Antikörper gegen EpCAM) zeigte sich für Adecatumumab eine bessere Verträglichkeit und eine Inhibition von Mammakarzinomzellen *in vitro* [70]. Eine gute Verträglichkeit und lange Serum-Halbwertszeit von Adecatumumab konnte bereits zuvor an Patienten mit Prostatakarzinomen gezeigt werden [71]. Es konnte auch ein positiver Effekt hinsichtlich einer verzögerten und geringeren Höhe des PSA-Anstiegs nachgewiesen werden [72]. Erste klinische Phase II-Studien konnten unter einer Adecatumumab-Monotherapie eine verlangsamte Tumorprogression und verminderte Lymphknotenmetastasierung demonstrieren [73].

Der Einsatz des trifunktionalen Antikörpers Catumaxomab (EpCAM und CD3) bot bereits sehr gute Erfolge in der palliativen Therapie des malignen Aszites im Rahmen von Peritonealkarzinosen unterschiedlicher Genese [74][75][76]. Es konnte eine deutliche Reduktion der Aszitesproduktionen und eine Elimination der Tumorzellen im Punktat erzielt werden [74]. Dabei hatte der komplette trifunktionale Antikörper eine 1000-fach höhere Effektivität als HO-3 (alleiniger EpCAM-bindender Arm von Catumaxomab) [77]. Eine vor kurzem veröffentlichte Phase II/III- Studie wies einen deutlichen Vorteil von Catumaxomab plus Chemotherapie im Vergleich zu alleiniger Chemotherapie auf. Hierbei verlängerte sich das punktionsfreie Intervall und punktionsfreie Überleben signifikant. Das

Gesamtüberleben stieg insbesondere bei Peritonealkarzinose im Rahmen von Magenkarzinomen ebenfalls signifikant. Für das Gesamtkollektiv resultierte eine Risikoreduktion des tumorbedingten Todes von 27,7% [78].

1.2.4. EpCAM-Expression in Magenkarzinomen

Bislang gibt es wenige Studien, die sich mit der Expression von EpCAM beim Magenkarzinom auseinandersetzen. Die Arbeitsgruppe um Songun fand, dass die EpCAM-Expression unabhängig vom TNM-Status ein zusätzlicher prognostischer Faktor für das Überleben ist. Patienten mit starker (100%) EpCAM-Expression der Tumorzellen hatten ein besseres 10-Jahres-Überleben ($p < 0,01$) im Vergleich zu Patienten mit schwacher oder fehlender EpCAM-Expression [51].

Eine chinesische Arbeitsgruppe berichtete wiederum, dass lymphknotenmetastasierte Magenkarzinome eine signifikant höhere EpCAM-Expression aufwiesen. Dabei hatten die Primärtumoren und ihre zugehörigen Lymphknoten keine signifikant unterschiedliche EpCAM-Expression. 74% der Magenkarzinome wiesen eine EpCAM-Überexpression auf, wobei das Maß der Differenzierung negativ mit der EpCAM-Expression korrelierte [79][80]. Eine EpCAM-Expression in DTC (disseminated tumor cells) in Lymphknoten von Patienten mit histopathologisch Lymphknoten-negativen Magenkarzinomen konnte mit einem verkürzten rezidivfreien Intervall und verkürztem Überleben in Zusammenhang gebracht werden [81]. Weitere Studien beschrieben die EpCAM-Expression bei Magenkarzinomen mit Werten zwischen 50-96% [82][24][83][52]. Es konnte bisher keine Korrelation zwischen EpCAM-Expression und Laurén-Typ, Grading, Tumorlokalisation, Staging und Lymphknotenmetastasierung nachgewiesen werden [83]. Allerdings fehlte in diesen Studien eine Analyse des prognostischen Einflusses.

1.3. TMA (TISSUE MICROARRAY)

Der Einsatz einer antikörperbasierten Therapie setzt Kenntnisse über die Expression von Oberflächenantigenen bei Karzinomzellen im heterogenen Tumorgewebe voraus. Sehr gut lässt sich die Expression von potentiellen Zielstrukturen mit der Immunhistochemie nachweisen, da hier auch die Lokalisation der Expression beurteilt werden kann. Um nun effektiv eine Vielzahl von Tumorproben mittels Immunhistochemie untersuchen zu können, stellt die Tissue Microarray (TMA)-Technik eine geeignete Methode dar. Beschrieben wurde die TMA Methode erstmals im Jahre 1986 von Battifora [84] als „multitumor (sausage) tissue block“. Diese Technik wurde weiter modifiziert und 1998 von Kononen et al [85] in seiner heutigen Form als TMA etabliert. Der größte Nutzen dieser Technik liegt darin, möglichst viele Patientenproben zeitgleich und unter den gleichen Versuchsbedingungen zu untersuchen [86].

Bei einem TMA handelt sich um eine Zusammenstellung von Gewebeproben vieler verschiedener Patienten auf einem Paraffinblock, definiert angeordnet in Reihen und Spalten, wodurch eine genaue Zuordnung zu klinischen und pathologischen Daten dieser Patienten ermöglicht wird.

In den meisten Studien werden Biomarker mittels Immunhistochemie auf den TMA-Schnitten angefärbt und ausgewertet, obwohl auch andere Methoden wie z.B. die In-situ-Hybridisierung erfolgreich verwendet werden können [86]. Durch ihre Automatisierbarkeit und Möglichkeit der Bearbeitung großer Fallzahlen könnte die TMA-Technik dazu dienen, den Weg von einem neu entdeckten prognostischen zu einem diagnostischen Marker zu beschleunigen [86].

1.3.1. Vorteile der TMA-Technik

Der größte Vorteil der TMA-Technik liegt in seiner enormen Zeit- und Kosteneffizienz im Vergleich zu anderen Methoden. Mit dem Originalgewebe kann effektiver umgegangen werden, da jeweils nur ein kleiner Bereich entnommen wird. Somit wird die Anzahl der durchführbaren (beispielsweise immunhistochemischen und histologischen) Untersuchungen bei jedem Patienten um ein Vielfaches gesteigert [87]. Da die

Gewebeproben auf einem einzelnen TMA-Schnitt zeitgleich angefärbt werden, sind die gleichen Untersuchungsbedingungen gegeben. Aufgrund der Komprimierung der Probengröße und -menge auf wenige Objektträger können Materialien (insbesondere immunhistochemische Marker), Reagenzien und auch Arbeitszeit eingespart werden [86]. Die zeitgleiche Analyse mehrerer Tumormproben führt zu einer effektiveren Zeit-Nutzen-Relation, wodurch größere Patientenkohorten schneller analysiert werden [86].

Die TMA-Technik kann nicht nur in der Tumorforschung, sondern auch als Mittel in der Qualitätssicherung verwendet werden. So konnte die Varianz von immunhistochemischen Färbungen verschiedener Laboratorien mithilfe von "mini-TMA" detektiert werden [88]. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Überprüfung der Spezifität von Antikörpern für bestimmte Gewebe, da in einem Färbeschritt verschiedene Gewebetypen auf einem TMA untersucht werden können. Neue Antikörper und deren erforderliche Titer können so optimal evaluiert und somit deren Etablierung vereinfacht und beschleunigt werden [86].

Ergänzend bleibt noch festzustellen, dass die Größe der TMAs von erheblichem Vorteil ist, da eine hohe Anzahl von Proben auf einem Objektträger lokalisiert werden kann. Sie erlauben einen einfachen Transport, so dass sie von verschiedenen Personen begutachtet, beurteilt und deren Ergebnisse validiert werden können [86].

1.3.2. Nachteile der TMA-Technik

Es erfordert mehr Erfahrung und Können, die TMAs zu erstellen und zu schneiden, als einfache Gewebeproben in Paraffin einzubetten und histopathologisch zu untersuchen [86]. Die Qualität der TMAs ist stark abhängig von der Qualität der Proben. Da oftmals Proben aus lang zurückliegenden Zeiträumen verwendet werden, ist das Ergebnis durch die Haltbarkeit, Qualität und Verarbeitung der Original-Paraffinblöcke limitiert [86].

Durch den Aufwand der Erstellung wird jeder einzelne TMA-Block und auch jedes einzelne Schnittpräparat zu einer wertvollen Ressource. Da das Schneiden und Fixieren auf Objektträgern schwieriger ist, ist eine sehr gewissenhafte und vorsichtige Arbeitsweise von Nöten. Bei jedem Schneidevorgang ist ein gewisser Materialverlust zu verzeichnen, daher sollten möglichst viele Schnittpräparate auf einmal hergestellt werden. Da bei Schnitten aber durch eine schnelle Oxidation die Antigenität für Antikörper verloren gehen kann, ist für

aussagekräftige Ergebnisse eine rasche Verarbeitung oder adäquate Konservierung notwendig.

Eine wiederholt geäußerte Kritik an der TMA-Technik ist, dass durch die geringe Größe der Gewebestanzen das Tumormaterial nur unzureichend repräsentiert wird [86]. Für die TMA Herstellung sind Stanznadeln mit Durchmessern von 0,6 mm bis 2,0 mm üblich. Auch um der oben genannten Kritik Rechnung zu tragen, kam man zu dem Konsens, dass zwei Stanzen mit einem Durchmesser von 0,6 mm ausreichen sollten, um repräsentativ für einen Tumor zu sein [89][90].

Das wahrscheinlich größte Problem bei der Herstellung eines TMA ist die Treffgenauigkeit der Gewebestanzen für das angezielte Tumorgewebe innerhalb eines Gewebeblocks. Selbst bei sorgfältiger Untersuchung und Markierung durch einen Pathologen kommt es vor allem bei *in-situ*-Läsionen häufiger dazu, dass kein Tumorgewebe in den Gewebestanzen enthalten ist. Dieses Problem kann durch eine Erhöhung der Anzahl der Stanzen reduziert werden. Bei größeren, invasiveren Tumoren ist dieses Problem zu vernachlässigen [86].

1.4. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Obwohl die EpCAM-Expression und der mögliche therapeutische Nutzen einer gegen EpCAM gerichteten Therapie bei verschiedenen Tumorentitäten Gegenstand intensiver Forschung (s.o.) ist, erschien die Datenlage bezüglich der EpCAM-Expression beim Magenkarzinom nicht zufriedenstellend. Die Frage, ob eine EpCAM-Expression prognostisch eher günstig [51] ist, oder sie eine Metastasierung in regionäre Lymphknoten fördert [79][80][81], konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Bislang gab es auch noch keine Untersuchungen der EpCAM Expression in Abhängigkeit zu der für das Magenkarzinom wichtigen Laurén-Klassifikation [80]. Auch der Zusammenhang zwischen vermehrter Proliferationsaktivität und EpCAM-Expression beim Magenkarzinom ist weitgehend unklar.

Um eine Reihe dieser offenen Fragen zur EpCAM-Expression beim Magenkarzinom beantworten zu können, sollten mit dieser Arbeit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Wie häufig wird EpCAM in Magenkarzinomen exprimiert?
- Wenn EpCAM exprimiert wird, zeigt sich eine homogene Expression? Oder gibt es Unterschiede zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront? Wie verhält es sich in den Lymphknotenmetastasen der zugehörigen Primärtumoren?
- Gibt es Unterschiede in den verschiedenen histologischen Typen nach Laurén?
- Zeigt sich ein prognostischer Einfluss für das Überleben? Eignet sich EpCAM als ein prognostischer Marker?
- Findet sich ein Zusammenhang zwischen Proliferation (Ki-67-Expression) und EpCAM-Expression?

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. Reagenzien

- A. dest (destilliertes Wasser)
- AB-Serum (Biotest, Ref 805135)
- DAB (Dako, DAB + Chromogen, K3468; DAB-Substrat: 1 Tropfen DAB Chromogen/ml Substratpuffer)
- DPBS (= Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline), (Gibco, 14190-169)
- Entellan (Merck, 1.07961.0100)
- Ethanol (Roth, Karlsruhe)
- H₂O₂ (Merck, 8597.1000 304K19013597)
- Hämatoxylin-Eosin-Lösung (Sigma, Deisenhofen)
- Ki-67 (1 µg/ml), Mouse Monoclonal, Dako Cytomation, USA
- Mayers Hämalan (Merck, 1.09249.2500)
- Negativantikörper MOPC (2 µg/ml) Dako Cytomation, USA
- Normal Serum: 3 Tropfen ad 10 ml DPBS
- PBS Puffer (Gibco, 18912-014)
- Primärantikörper Ber-EP4 (2 µg/ml) Dako Cytomation, USA
- Sekundärantikörper (biotinylated antibody): 1 Tropfen ad 10 ml DPBS
- Target Retrieval Solution (Dako, S1699), 1:10 mit A.dest verdünnt
- Vectastain, ABC-Kit Peroxidase Mouse IgG: PK-4002; Vector Laboratories Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010)
- Vectastain ABC-Reagenz: 2 Tropfen Reagenz A + 2 Tropfen Reagenz B ad 10 ml DPBS
- Xylol (Merck, 1.08685.2500)

2.1.2. Geräte und Software

- Deckgläschen (Menzel-Glaser)

-
- Kamera (Leica Microsystems Ltd., DFC 280, Serial No. 032802404), Vergrößerung 10-fach
 - Liquid Blocker Super Pap Pen Mini (MBT Brand, 297840010)
 - Mikroskop (Leica, DMIL, 49775), Objektiv-Vergrößerung 10-fach bzw. 40-fach
 - Software: Leica IM 50 Version 4.0, Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd.
 - Mikrotom (Leica, SM2000R, 50749)
 - Pipettenspitzen (Eppendorf VWR)
 - Plastikpipetten (International 631-0801)
 - Superfrost®-Objektträger (Engelbrecht)
 - Stanzgerät (Tissue-Arrayer)
 - Wärmeschrank (Mettler, 38146)
 - Wasserbad (Färbung) (Mettler, 52636)
 - Wasserbad (Schneidevorgang; Leica, HI 1210, 50750)
 - SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA)

2.1.3. Tumorproben

Für die Erstellung des TMA wurden in Paraffin eingebettete Gewebeproben von 175 Patienten aus dem Archiv des pathologischen Instituts der Universitätsklinik Düsseldorf verwendet. Der Erfassungsraum erstreckte sich von 1995-2006. Es wurden ausschließlich Patienten mit Magenkorpus-Karzinomen einbezogen. Ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Durchführung der Untersuchungen lag vor (Studennummer: 3821).

Trotz der histopathologisch gesicherten Tumorerkrankung wurden in sechs Fällen von zwei unabhängigen Betrachtern keine Tumorzellen in den Stansen der Gewebeproben gefunden. Darüber hinaus konnten zwei Patienten mit neuroendokrinem Tumor identifiziert werden und wurden daher von der immunhistochemischen Analyse ausgeschlossen. Ebenso wurden Proben von drei Patienten mit Rezidivbefund und ein Patient, der eine neoadjuvante Bestrahlung erhalten hatte, für die Untersuchung nicht berücksichtigt.

In der Auswertung wurden dem zufolge Tumorproben von 163 Patienten erfasst. Darunter fanden sich 106 (65%) männliche und 57 (35%) weibliche Personen mit einem medianen Alter von 70 Jahren. Die Tumoren der Patienten wurden anhand der Laurén-Klassifikation in vier Gruppen aufgeteilt. Es waren 61 Tumoren vom diffusen, 62 vom intestinalen und 32 vom mixed Typ vorhanden; acht weitere Fälle waren anhand dieser Klassifikation nicht einzuordnen. Tabelle 1 zeigt die klinisch-pathologischen Daten des Patientenkollektivs und Tabelle 2 die Einteilung nach Laurén.

	Anzahl	%
	163	100%
m	106	65%
w	57	35%
pT1	21	13%
pT2	86	53%
pT3	48	29%
pT4	8	5%
pNo	41	25%
pN1	54	33%
pN2	28	17%
pN3	39	24%
pNx	1	1%
Mo	154	94%
M1	9	6%
G1	2	1%
G2	36	22%
G3	122	75%
G4	3	2%
diffus	61	37%
intestinal	62	38%
mixed	32	20%
unbekannt	8	5%

Tabelle 1: Patientenkollektiv

Aufgliederung des Patientenkollektivs nach TNM-Klassifikation, Differenzierungsgrad und Laurén-Typ, jeweils absolut und prozentual

	diffus	%	intestinal	%	mixed	%	unbestimmt	%
Gesamt	61	100	62	100	32	100	8	100
m	37	61%	43	69%	21	66%	5	63%
w	24	39%	19	31%	11	34%	3	38%
pT1	6	10%	11	18%	3	9%	1	13%
pT2	34	56%	33	53%	15	47%	4	50%
pT3	20	33%	16	26%	12	38%	0	0%
pT4	1	2%	2	3%	2	6%	4	50%
pNo	16	26%	17	27%	4	13%	4	50%
pN1	18	30%	22	35%	11	34%	3	38%
pN2	12	20%	11	18%	4	13%	1	13%
pN3	15	25%	11	18%	13	41%	0	0%
pNx	0	0%	1	2%	0	0%	0	0%
G1	0	0%	2	3%	0	0%	0	0%
G2	1	2%	32	52%	1	3%	2	25%
G3	57	93%	28	45%	31	97%	6	75%
G4	3	5%	0	0%	0	0%	0	0%

Tabelle 2: Patientenkollektiv, aufgegliederte Aufstellung nach Laurén-Typ

Aufgliederung des Patientenkollektivs nach TNM-Klassifikation, Differenzierungsgrad, jeweils absolut und prozentual

Bei den Tumoren von 31 Fällen wurden intestinale Metaplasien der Magenschleimhaut beobachtet. Die Proben mit intestinaler Metaplasie wurden bezüglich ihrer EpCAM-Expression gesondert betrachtet.

Es befanden sich im Patientenkollektiv insgesamt 18 Patienten, bei denen eine R1-Resektion erfolgt war. Diese Fälle wurden von der Überlebensanalyse ausgeschlossen. Ebenfalls von der Überlebensanalyse ausgeschlossen wurden Fälle mit Fernmetastasierung (n = 19) sowie solche Fälle, bei denen kein vollständiges Follow-up vorhanden war (n = 5). Somit standen für die Überlebenszeitanalyse 135 Fälle zur Verfügung.

2.1.4. Kontrollen der immunhistochemischen Färbung

Da Kolonmukosa regelhaft eine starke EpCAM-Expression aufweist, wurde dieses Gewebe für die Positivkontrollen ausgewählt. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden daher 4 µm dicke Gewebeschnitte aus in Paraffin eingebetteter gesunder Kolonmukosa angefertigt. Diese wurden analog der TMA-Schnitte für die Färbung vorbereitet und unter Verwendung des Ber-EP4 Antikörpers (Positivkontrolle), sowie der MOPC-21 Isotyp-Kontrolle (Negativkontrolle) immunhistochemisch gefärbt.

2.2. METHODEN

2.2.1. Herstellung des TMA (Tissue Mircoarray)

Die zu entnehmenden Gewebeareale wurden unter mikroskopischer Kontrolle auf den entsprechenden Tumorböcken markiert. Mithilfe des Tissue-Arrayers (Abbildung 4) wurden im Durchmesser 1,0 mm große kreisrunde Stanzen mit einer Hohlzylinder aus dem in Paraffin eingebetteten Original-Gewebe entnommen und in die Empfänger-Paraffinblöcke eingefügt. Es wurden jeweils sechs Stanzen pro Fall auf einem Paraffinblock in einem bestimmten Raster angeordnet. Dabei wurden die Proben in zehn Reihen, mit jeweils zwei Fällen pro Reihe, auf einem TMA-Block vereint. Mit einem Abstand von 1,5 mm zueinander wurden bis zu sechs Proben von einem Fall platziert, als Abstand zwischen den Proben zweier verschiedener Fälle wurde 2,5 mm gewählt. Die gewünschten sechs Stanzen eines Falles umfassten je zwei Proben aus dem Tumorzentrum, zwei aus der Tumordinvasionsfront, eine aus der Normalschleimhaut und, wenn vorhanden, eine Stanze aus einer Lymphknotenmetastase (Abbildung 5). Es konnten so maximal bis zu 120 Gewebeszylinder in einen Empfänger-Paraffinblock eingebracht werden.

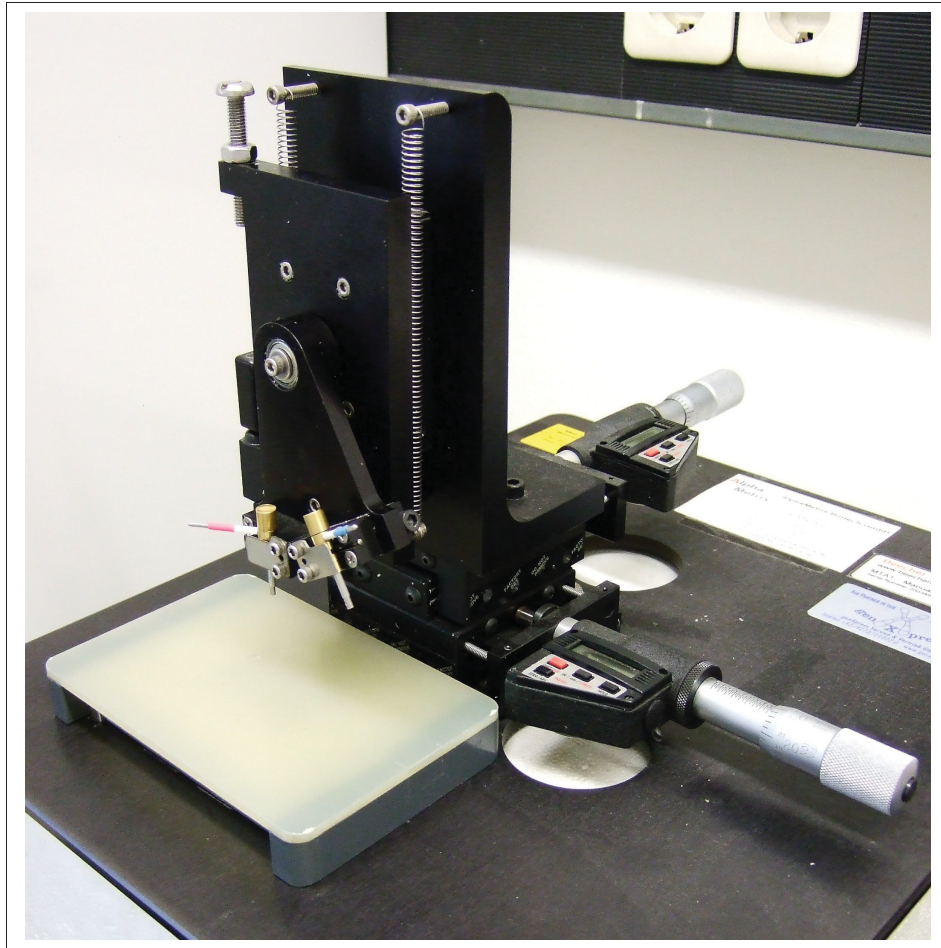


Abbildung 4: Stanzgerät (Tissue Arrayer)

Zunächst wird mit der linken Hohnadel ein kreisrundes Loch in den Empfänger-Paraffinblock gestanzt, dann mit der rechten Hohnadel eine Gewebestanze aus dem Originalgewebe-Paraffinblock entnommen und in das Loch im Empfänger-Paraffinblock eingefügt.

Zur exakten Zuordnung der verschiedenen TMA-Blöcke wurde auf jedem Block in der rechten oberen Ecke jedes TMAs zusätzlich eine 4-er Kombination von Kontroll-Geweben zur Orientierung eingesetzt. Hierfür wurde Material von Herz, Niere, Schilddrüse und Tonsille verwendet (Abbildung 5, A).

Nach Fertigstellung der TMA-Rohblöcke wurden die einzelnen Stanzen mit dem umgebenden Paraffin in einem Wasserbad bei 56°C angeschmolzen und dann wieder abgekühlt, sodass sich solide Paraffinblöcke ergaben.

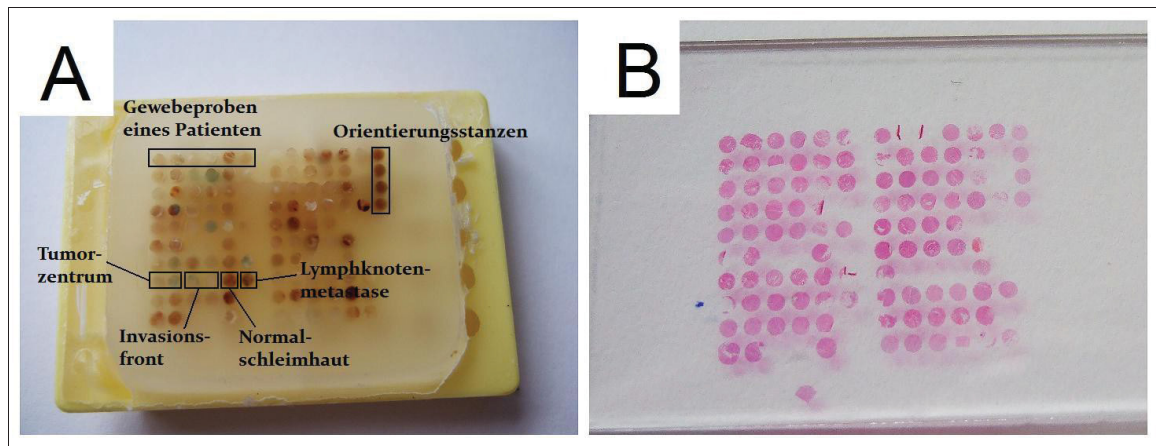


Abbildung 5: A) TMA-Paraffinblock, B) HE-gefärbter TMA-Schnitt

Auf dem Paraffinblock sind zehn Reihen mit jeweils zwei Patienten nebeneinander angeordnet, in der rechten oberen Ecke sind vier Orientierungsstanzen untereinander angeordnet. Diese dienen zur Unterscheidung der verschiedenen TMA-Blöcke voneinander, z.B. Block 3 enthält Herz-Herz-Tonsille-Tonsille. Von jedem Patienten sollen je zwei Stanzen aus dem Tumorzentrum und Invasionsfront, eine Stanze aus einer regionären Lymphknotenmetastase und eine aus der Normalschleimhaut nebeneinander zu liegen kommen. Nicht bei jedem Patienten war aus jedem gewünschten Bereich Gewebe vorhanden.

2.2.2. Anfertigung der Schnittpräparate

Für die Durchführung der immunhistochemischen Färbung wurden mithilfe eines Schlittenmikrotoms 4 µm dicke Schnittpräparate der TMA-Blöcke angefertigt und auf Superfrost® Objektträger aufgezogen. Zur Vorbereitung der Färbungen wurden die Schnitte 20 Minuten bei 70°C erhitzt und nach Abkühlung des Ofens auf 56°C über Nacht auf den Objektträgern fixiert. Die Schnittpräparate wurden bis zur immunhistochemischen Färbung bei -20°C gelagert.

Von allen TMA-Blöcken wurde zusätzlich jeweils ein weiteres, ebenfalls 4 µm dickes Schnittpräparat HE-gefärbt, das als Standardfärbung zur eventuellen histologischen Überprüfung der gestanzten Tumorareale diente (Abbildung 5, B).

2.2.3. Immunhistochemische Färbung

2.2.3.1. Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode

Bei dieser immunhistochemischen Färbung wird das nachzuweisende Gewebeantigen zunächst mit einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) markiert. Im nächsten Schritt wird ein biotinylierter Sekundärantikörper zugegeben, der an den Primärantikörper bindet. Danach erfolgt die Bindung von einem Komplex aus biotinylierter Peroxidase und Avidin [91]. Es sind dabei jeweils drei Peroxidasemoleküle über Biotin an Avidin gebunden. Die vierte Biotinbindungsstelle wird nun von einem Biotin des Sekundärantikörpers besetzt. Die Peroxidasemoleküle werden in Gegenwart von Diamino-Benzidin und Wasserstoffperoxid in Form einer Farbreaktion nachgewiesen. Es bildet sich ein brauner, schwer löslicher Niederschlag. Die Farbintensität ist dabei abhängig von der Menge des vorhandenen Antigens.

2.2.3.2. Durchführung

Für die Immunhistochemische Färbung der Schnitte des TMA wurden je ein Schnittpräparat des TMA für die Anfärbung des Antigens EpCAM mit dem Antikörper Ber-EP4 und eine Negativkontrolle (MOPC-21) verwendet. Des Weiteren wurde jeweils ein Schnittpräparat Kolonmukosa als Positivkontrolle (Ber-Ep4), sowie eine Isotyp-Negativkontrolle (MOPC-21) angefärbt.

Die Durchführung erfolgte nach folgenden Arbeitsschritten:

Entparaffinieren der Paraffinschnitte

- 3 x 10 min Xylol
- 2 x 5 min 99,5% Ethanol
- 2 x 5 min 96% Ethanol
- 2 x 5 min 80% Ethanol
- 5 min 70% Ethanol
- 5 min A.dest

Demaskieren und Inhibieren der endogenen Peroxidase

- 30 min Target Retrieval Solution bei 95°C im Wasserbad
- 20 min Abkühlen bei Raumtemperatur (RT)
- 5 min PBS (= Phosphate buffered saline, Phosphatpuffer)
- 5 min Waschen in A.dest.
- 30 min 0,3% H₂O₂-PBS bei RT
- 5 min PBS

Färbung

- Umranden der Proben mit Liquid Blocker Super Pap Pen Mini
- Blockieren unspezifischer Reaktionen mittels Normal Serum des ABC-Vectastain-Kits, 30 min bei RT
- 30 min Inkubieren mit Primärantikörper sowie Negativkontrolle bei RT (jeweils gelöst in 10% AB-Serum in DPBS), ca. 500 µl/Schnitt, Konzentration 2 µl/ml
 - ▶ Primärantikörper Ber-EP₄ (Stammkonzentration 250 mg/l): 4 µl Ber-EP₄ + 496 µl AB-Serum
 - ▶ Negativantikörper MOPC (Stammkonzentration 1 mg/ml): 1 µl MOPC + 499 µl AB-Serum 2 x 3 min Waschen in PBS
- 30 min Inkubation mit Sekundärantikörper bei RT (500 µl/Schnitt)
- 2 x 3 min Waschen in PBS
- 30 min Inkubieren mit ABC-Reagenz (500 µl/Schnitt)
- 5 min PBS
- 10 min Inkubieren mit DAB-Substrat unter Abdeckung der Lichteinstrahlung bei RT
- 2 x 5 min Waschen mit Leitungswasser
- 5 min A.dest
- 15 sec. Kernfärbung mit Mayers Hämalaun
- 15 min vorsichtiges Spülen unter fließendem Leitungswasser
- 5 min A.dest

Eindeckeln (Fixieren)

- 5 min 70% Ethanol

-
- 2 x 5 min 80% Ethanol
 - 2 x 5 min 96% Ehanol
 - 2 x 5 min 99,5% Ethanol
 - 2 min Xylol
 - Versiegelung mit Deckgläschen mittels Entellan

2.2.3.3. Auswertung

Für jeden Fall wurde, ggf. unter Zuhilfenahme der HE-gefärbten Schnittpräparate, zunächst der prozentuale Anteil der Tumorzellen im gestanzten Areal bestimmt. Da jeweils zwei Proben aus dem Tumorzentrum und aus der Invasionsfront gestanzt und ausgewertet wurden, wurden diese zur Vereinfachung der weiteren Analysen im Anschluss jeweils gemittelt. Für die Beurteilung des Gesamttumors wurden die Rohdaten aus allen Stanzen von Tumorzentrum und Invasionsfront pro Fall gemittelt.

Die Gewebeproben wurden anhand des HercepTest-Scores nach Dako [92][93] klassifiziert, Dieser immunhistochemische Bewertungsscore wurde ursprünglich für die Auswertung des HercepTest™, ein Test zur Untersuchung der p185/HER-2 Expression, entwickelt (Tabelle 3). Da es sich bei EpCAM ebenfalls um ein membranäres Protein handelt, ist dieser Score gut übertragbar. Die Intensität der EpCAM-Anfärbung wurde prozentual in Kategorien von „0“ bis „3+“ bewertet. „0“ bezeichnete eine fehlende membranäre Anfärbung, „1+“ eine schwache membranäre Anfärbung, „2+“ eine moderate membranäre Anfärbung und „3+“ eine starke membranäre Färbung.

0	0-10% gefärbte Zellen
1+	>10% schwach gefärbte Zellen
2+	>10% moderat gefärbte Zellen
3+	>10% stark gefärbte Zellen

Tabelle 3: HercepTest-Score nach DAKO

Anhand dieses Scores wurde die Intensität der EpCAM-Expression ausgewertet.

2.2.4. Ki-67-Färbung

Die Ki-67 Immunhistochemie wurde nach der Standardmethode für Routinediagnostik vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf für diese Arbeit angefertigt. Die so gefärbten Schnitte der TMAs wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Zur Auswertung wurde der prozentuale Anteil der Ki-67-positiven Zellen in den Tumorarealen bestimmt. Zur Vereinfachung der statistischen Auswertung wurden mithilfe des Medians zwei Kategorien der Ki-67-Expression gebildet: Fälle mit einem Wert unterhalb des Medians wurden als Tumore mit niedriger Proliferationsrate klassifiziert und solche mit einem Wert des Medians und darüber wurden als Tumore mit einer hohen Proliferationsrate klassifiziert. Analog zur Auswertung der EpCAM-Expression wurden die erhobenen Werte zweier Stansen eines Falles aus Tumorzentrum bzw. Invasionsfront gemittelt. Für die Beurteilung des Gesamttumors alle vorhandenen Stansen eines Primärtumors gemittelt.

2.2.5. Statistik

2.2.5.1. Chi-Quadrat-Test und Fisher's exact Test

In die statistische Analyse konnten 163 Patienten einbezogen werden (siehe 3.1. und Abbildung 6). Zur Beurteilung der Signifikanz der Korrelation von der EpCAM-Expression mit den histopathologischen Parametern wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet und bei Fallzahlen kleiner als fünf in einem Feld der Fisher's exact Test.

2.2.5.2. Überlebensanalyse

Um zu überprüfen, ob die EpCAM-Expression mit der Progression der Erkrankung assoziiert ist, wurde die EpCAM-Expression mit der Überlebenszeit der Patienten korreliert. Hierfür wurde die Kaplan-Meier-Methode und der Log Rank Test verwendet. Mit dieser Methode wurde auch der prognostische Einfluss der histopathologischen Parameter analysiert. Diese Daten wurden zur Vereinfachung der statistischen Analyse dichotomisiert (z.B. pT1-2 versus pT3-4 oder pNo versus pN1-3). Für die Überlebensanalyse standen Follow-up Daten von 135 Patienten zur Verfügung. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 26 Monate (0 - 171 Monate, Standardabweichung 45,86).

3. ERGEBNISSE

3.1. EVALUATION DER QUALITÄT DER TMA-HERSTELLUNG

Die Qualität der Stanzmethode kann anhand der tatsächlichen Anzahl des gewünschten Gewebes in den Stanzen aus dem zuvor ausgewählten Gewebe beurteilt werden.

Das zu verarbeitende Kollektiv bestand aus 175 Fällen. Für die TMA Herstellung wurden aus den Paraffinblöcken von jedem Fall je zwei Gewebestanzen aus dem Tumorzentrum, je zwei aus der Invasionsfront, sowie je eine aus der Normalschleimhaut und eine aus einer Lymphknotenmetastase entnommen. Dies entspricht potentiell 1050 Stanzen. Da aber nicht von jedem Fall genug Gewebe vorhanden war, bzw. keine Lymphknotenmetastase vorlag, summierten sich alle gestanzten Gewebszylinder auf 896 Stanzen. Von diesen waren 835 (93%) für unsere Untersuchung verwertbar. Die nicht verwertbaren 7% setzten sich aus Stanzen zusammen, in denen kein Tumorgewebe (z.B. nur Fett- oder Bindegewebe) erfasst war und aus Stanzen, bei denen es durch den Schneidevorgang zu starker Schädigung des Präparates gekommen war. Eine Übersicht der ausgewerteten Patienten zeigt Abbildung 6.

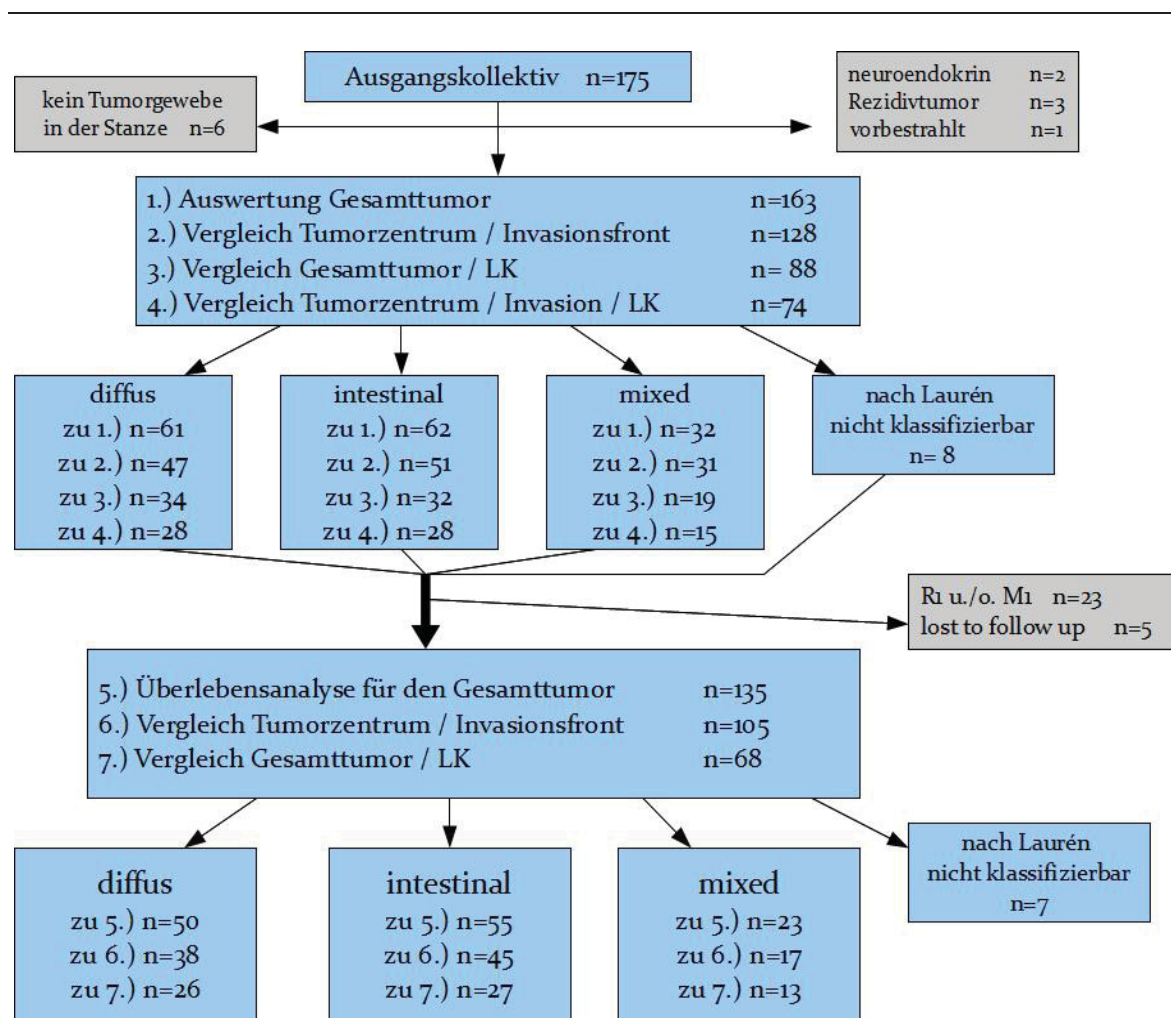


Abbildung 6: Auswertung des Patientenkollektivs

Diagramm über das Vorgehen der auswertbaren Patienten für die jeweiligen Analysen; n=Anzahl der Patienten, LK = Lymphknoten, M₁ = Fernmetastasen vorliegend, R₁ = nicht im Gesunden resezierter Tumor

3.2. ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMIE

3.2.1. EpCAM-Expression in Normalschleimhaut und intestinaler Metaplasie

Insgesamt konnten 129 verschiedene Fälle mit gesunder Magenschleimhaut hinsichtlich der EpCAM-Expression ausgewertet werden. Bei den Proben der übrigen Fälle war keine Normalmukosa verfügbar. In allen untersuchten Proben in dieser Studie wies das gesunde Epithel der Magenschleimhaut regelhaft keine EpCAM-Expression auf (Abbildung 7).

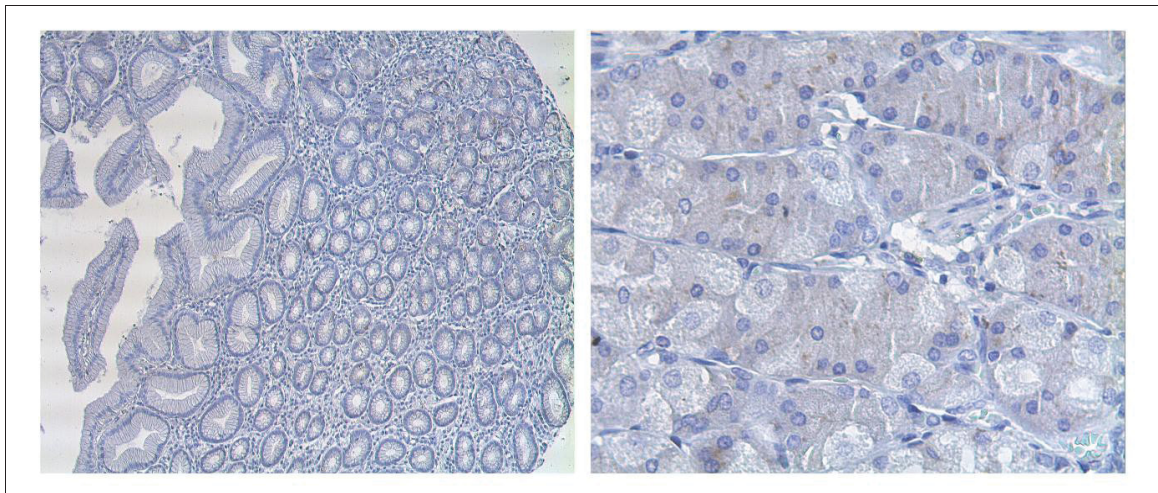


Abbildung 7: EpCAM-Expression in Normalmukosa

Die Normalschleimhaut des Magens weist regelhaft keine EpCAM-Expression auf. Vergrößerung des Objektivs: 10-fach (links) und 40-fach (rechts), Vergrößerung der Kamera: 10-fach. Endvergrößerung: 100-fach bzw. 400-fach. Bei den folgenden Abbildungen wird nur noch die Endvergrößerung aufgeführt.

Bei 31 Patienten konnte eine intestinale Metaplasie im Magenschleimhautgewebe gefunden werden. Diese intestinalen Metaplasien zeigten bis auf zwei Fälle (6%) mit fehlender Anfärbung eine deutliche EpCAM-Expression (94%). Unter Anwendung des HercepTest-Scores war in 32% (n = 10) Fällen eine schwache (1+) Anfärbung, in 19% (n = 6) eine moderate (2+) und in 42% (n = 13) eine starke (3+) Anfärbung sichtbar (Abbildung 8).

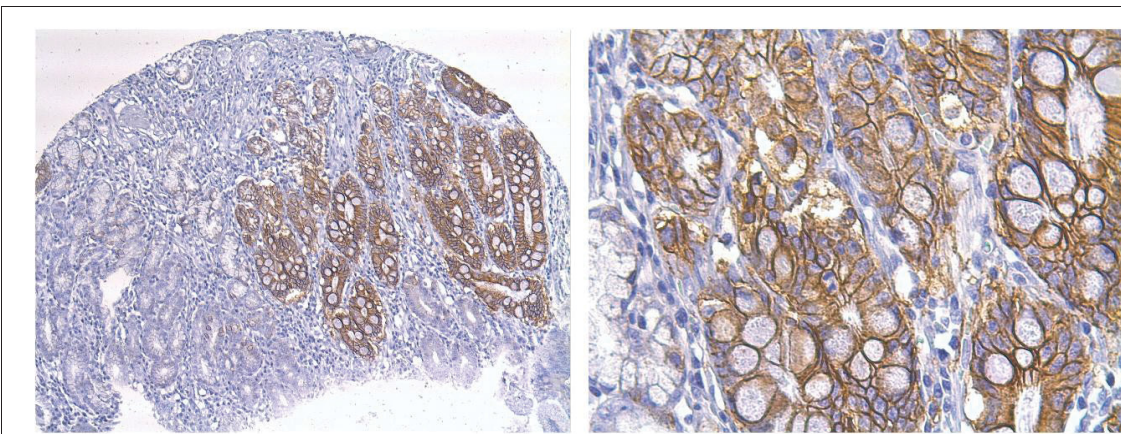


Abbildung 8: EpCAM-Expression in intestinaler Metaplasie

In Bereichen der Normalmukosa des Magens zeigten sich intestinale Metaplasien, welche eine starke EpCAM-Expression aufweisen; Abbildung links: 100-fache Vergrößerung, Abbildung rechts: 400-fache Vergrößerung

Patienten mit intestinaler Metaplasie in der Magenschleimhaut wiesen zum Großteil Tumoren mit pT-Kategorien 1 und 2 (74%) auf. Es wurde beobachtet, dass eine starke EpCAM-Expression sogar in 92% mit Primärtumoren der Kategorien pT1 und pT2 assoziiert war.

3.2.2. EpCAM-Expression im Karzinomgewebe

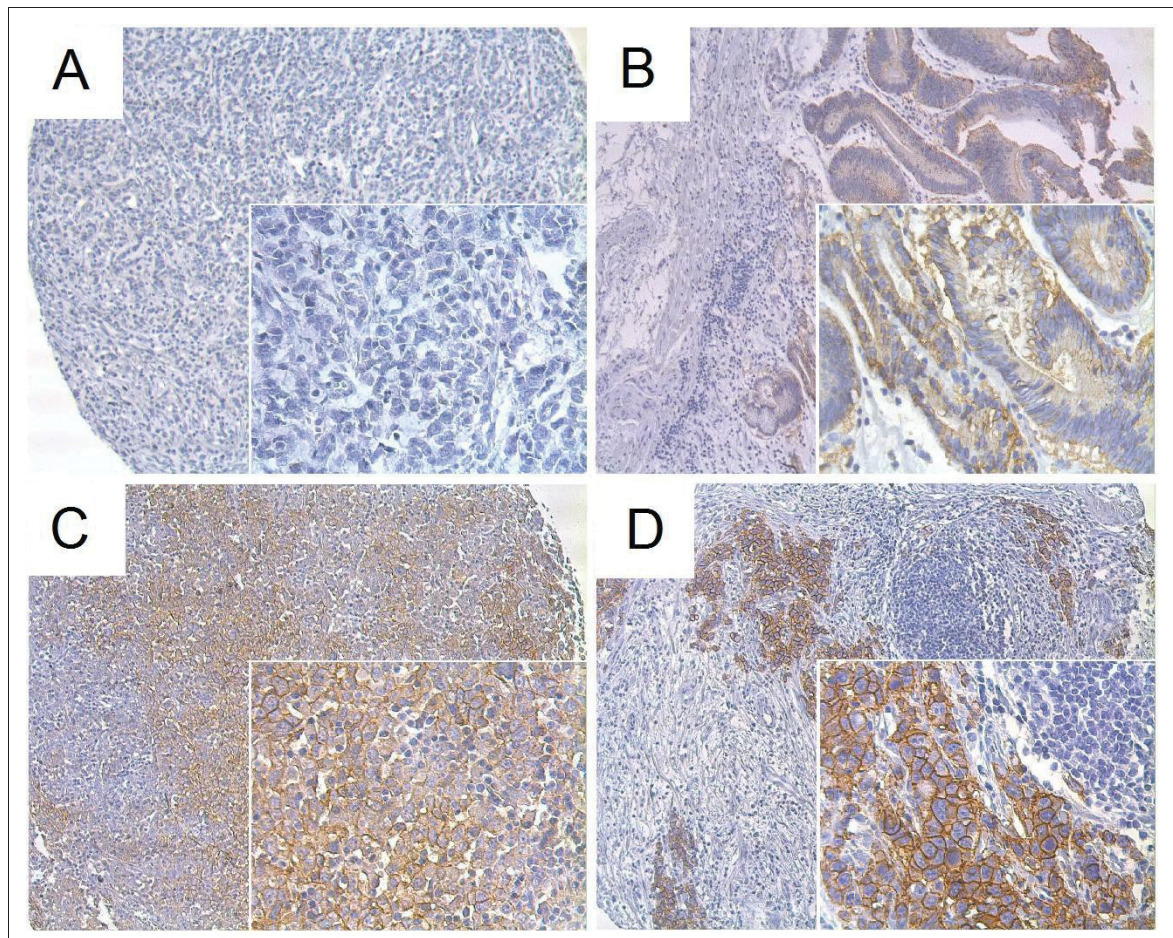


Abbildung 9: EpCAM-Expression im Magenkarzinom

Beispielbilder für unterschiedlich starke EpCAM-Expression im Magenkarzinom, Bild A: fehlende EpCAM-Expression, Bild B: schwache EpCAM-Expression (1+), Bild C: moderate EpCAM-Expression (2+), Bild D: starke EpCAM-Expression (3+); große Bildausschnitte in 100-facher, kleine Bildausschnitte in 400-facher Vergrößerung (Die Abbildung wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit erstellt und in der Publikation zu dieser Promotionsarbeit veröffentlicht [94]).

Zur Analyse der EpCAM-Expression im Tumorgewebe wurden Gewebeproben von 163 Patienten mikroskopisch untersucht. Unter Verwendung des HercepTest-Scores konnte bei 23% (n = 37) der untersuchten Magenkarzinome eine fehlende EpCAM-Expression beobachtet werden.

Eine Neo-Expression von EpCAM zeigte sich hingegen bei 126 Tumoren (77%): in 52 Fällen (32%) lag eine schwache Expression vor, in 27 Fällen (17%) konnte eine moderate Expression und in 47 Fällen (29%) eine starke EpCAM-Expression beobachtet werden. Tabelle 4 zeigt die Verteilung der EpCAM-Expression im gesamten Kollektiv. Abbildung 9 zeigt Beispiele für die verschiedenen Expressionsstärken von EpCAM.

	0		1+		2+		3+		Σ
Gesamtkollektiv	37	23%	52	32%	27	17%	47	29%	163
Primärtumor									
pT1	3	14%	10	48%	4	19%	4	19%	21
pT2	22	26%	25	29%	15	17%	24	28%	86
pT3	10	21%	13	27%	7	15%	18	38%	48
pT4	2	25%	4	50%	1	13%	1	13%	8
Lymphknotenstatus									
pNo	8	20%	13	32%	10	24%	10	24%	41
pN1	10	19%	19	35%	8	15%	17	31%	54
pN2	8	29%	10	36%	4	14%	6	21%	28
pN3	11	28%	10	26%	5	13%	13	33%	39
Grading									
G1	1	50%	0	0%	1	50%	0	0%	2
G2	5	14%	11	31%	8	22%	12	33%	36
G3	30	25%	40	33%	18	15%	34	28%	122
G4	1	33%	1	33%	0	0%	1	33%	3
Lauren-Klassifikation									
diffus	20	33%	15	25%	9	15%	17	28%	61
intestinal	8	13%	21	34%	13	21%	20	32%	62
mixed	7	22%	12	38%	4	13%	9	28%	32
unbestimmt	2	25%	4	50%	1	13%	1	13%	8

Tabelle 4: EpCAM-Expression im Gesamtkollektiv

Aufgliederung der Stärke der EpCAM-Expression (0-3+) anhand des HercepTest-Scores nach TNM-Klassifikation, Differenzierungsgrad und Laurén-Klassifikation

3.2.2.1. Vergleich der EpCAM-Expression von Tumorzentrum und Invasionsfront

In den bisherigen Auswertungen wurden die Invasionsränder und die Tumorzentren gemeinsam betrachtet. Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob ein Unterschied in der EpCAM-Expression zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront bestand. Unter den insgesamt 162 Tumorproben aus den Tumorzentren war bei 34 Patienten (21%) keine EpCAM-Expression nachweisbar, bei 54 Proben (33%) zeigte sich eine schwache Expression, bei 33 Proben (20%) lag eine moderate Expression vor, bei 42 Proben (26%) wurde die Expressionsstärke als stark bewertet.

Bei 129 Patienten konnten die Invasionsfronten der Tumoren analysiert werden. In 26 Fällen (20%) war in der Invasionsfront keine EpCAM-Expression nachweisbar, in 47 Fällen (36%) zeigte sich eine schwache Expression, in 31 Fällen (24%) lag eine moderate Expression vor und in 25 Fällen (19%) war eine starke EpCAM Expression feststellbar. In 128 Fällen war aus beiden Arealen Tumorgewebe vorhanden, so dass nur diese Fälle in die vergleichende Analyse einbezogen wurden. Beim Vergleich der EpCAM-Expressionsstärken von Tumorzentrum und Invasionsfront konnten keine statistischen Unterschiede erhoben werden (Abbildung 10).

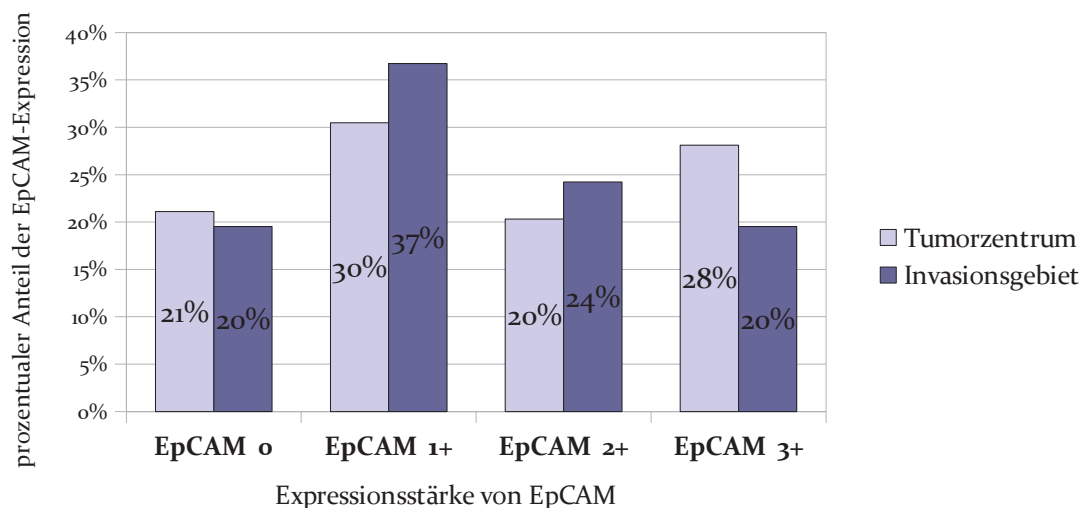


Abbildung 10: EpCAM-Expression von Tumorzentrum und Invasionsgebiet

Prozentualer Vergleich der Stärke der EpCAM-Expression von Tumorzentrum und Invasionsfront; hellblau: Tumorzentrum, dunkelblau: Invasionsfront.

Bei der Auswertung der Tumorproben fiel auf, dass es Tumoren mit unterschiedlichen Expressionsmustern gab. Während 58% (n = 74) eine „homogene“ EpCAM-Expression von Tumorzentrum und Invasionsfront aufwiesen, war bei 42% (n = 54) eine unterschiedlich starke („heterogene“) Expression von EpCAM zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront zu sehen. Dabei wurde ein Tumor als heterogen definiert, wenn die HercepTest-Scores von Tumorzentrum und Invasionsfront unterschiedlich waren.

3.2.3. EpCAM-Expression im Karzinomgewebe unter Berücksichtigung der Laurén-Klassifikation

Im untersuchten Patientenkollektiv befanden sich 61 Karzinome vom diffusen Typ, 62 Tumoren vom intestinalen Typ, sowie 32 Tumoren vom mixed Typ. Außerdem gab es acht Tumoren, die anhand der Laurén-Klassifikation nicht einzuordnen waren und demnach in diese vergleichende Analyse nicht miteinbezogen wurden.

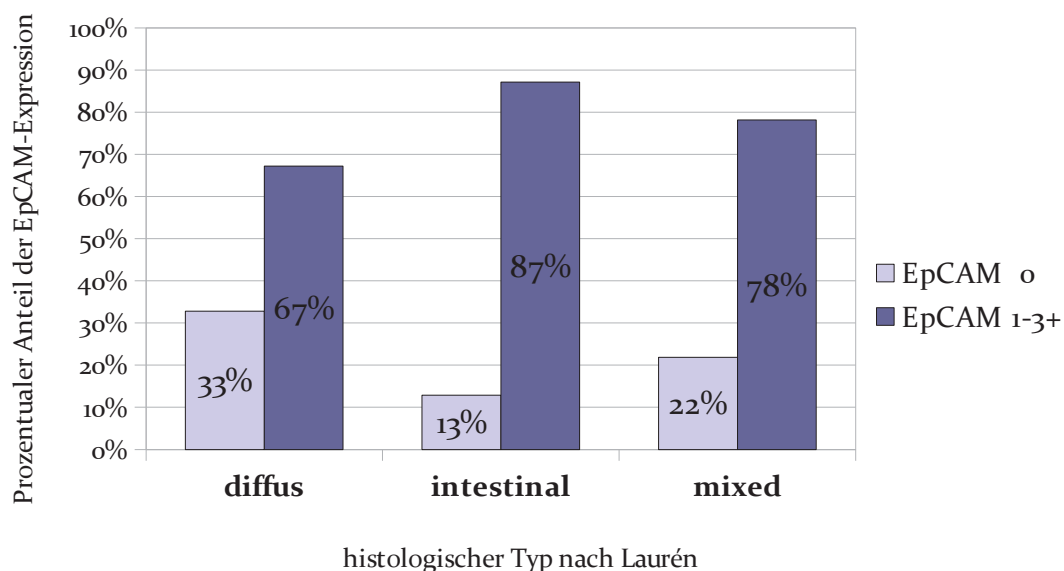


Abbildung 11: EpCAM-Expression der Typen nach Laurén

Prozentualer Vergleich der Stärke der EpCAM-Expression der histologischen Typen nach Laurén; hellblau: fehlende EpCAM-Expression, dunkelblau: vorhandene EpCAM-Expression

Bei der Gegenüberstellung von EpCAM-negativ versus EpCAM-positiv zeigte sich eine signifikant geringere EpCAM-Expression beim diffusen Typ (67% EpCAM-positiv, n = 41) im Vergleich zum intestinalen Typ (87%, n = 54, p = 0,008). Der Vergleich des diffusen und des intestinalen Typs mit dem mixed Typ ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 11).

3.2.3.1. EpCAM-Expression im Tumorzentrum

Für die Beurteilung der EpCAM-Expression im Tumorzentrum lagen Proben von 61 Tumoren des diffusen Typs, von 62 Tumoren des intestinalen Typs, sowie von 31 Tumoren des mixed Typs vor. Beim diffusen Typ war eine fehlende EpCAM-Expression im Tumorzentrum am häufigsten zu beobachten (34%, n = 21). Beim intestinalen Typ waren eine moderate (29%, n = 18) und eine starke (26%, n = 16) EpCAM-Expression am häufigsten vertreten. Die meisten Fälle vom mixed Typ wiesen dagegen eine schwache EpCAM-Expression (52%, n = 16) im Tumorzentrum auf (Tabelle 5).

	gesamt		diffus		intestinal		mixed	
EpCAM 0	34	21%	21	34%	9	15%	2	6%
EpCAM 1+	54	33%	16	26%	18	29%	16	52%
EpCAM 2+	33	20%	10	16%	16	26%	6	19%
EpCAM 3+	41	25%	14	23%	19	31%	7	23%
Σ	162	100%	61	100%	62	100%	31	100%

Tabelle 5: EpCAM-Expression im Tumorzentrum

Aufstellung der EpCAM-Expression im Tumorzentrum anhand des HercepTest-Scores, zunächst in der Gesamtbeurteilung (gesamt) und nach Laurén-Klassifikation (diffus, intestinal und mixed)

Der Unterschied bei der Häufigkeit der fehlenden EpCAM-Expression in der Gruppe des diffusen Typs war im Vergleich zum intestinalen (p = 0,01) und zum mixed Typ (p = 0,003) statistisch signifikant. Somit war die EpCAM-Expression beim intestinalen Typ und beim mixed Typ im Vergleich zum diffusen Typ erhöht (Abbildung 12).

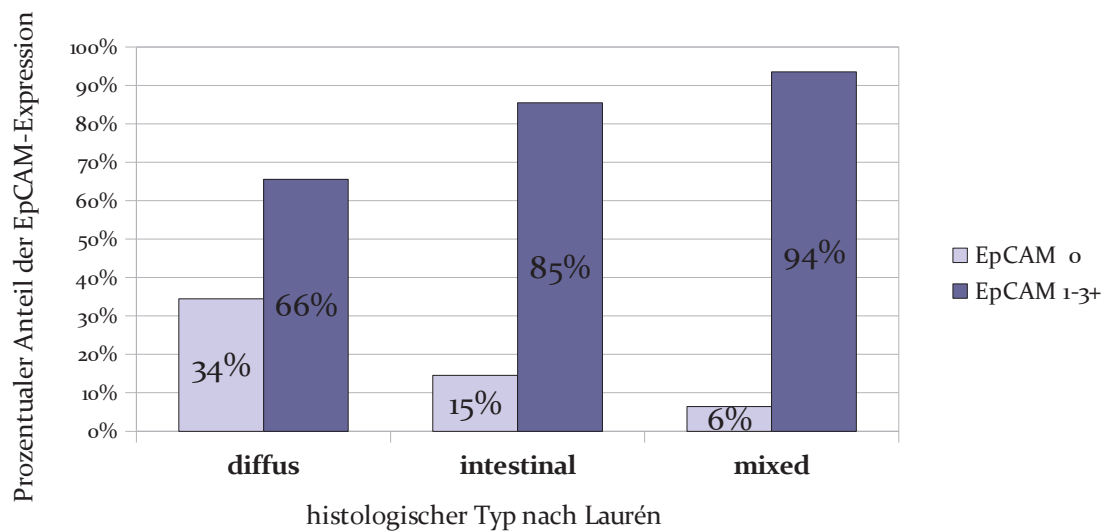


Abbildung 12: EpCAM-Expression im Tumorzentrum

Prozentualer Vergleich der EpCAM-Expression für den Bereich des Tumorzentrums bei den histologischen Typen nach Laurén.

3.2.3.2. EpCAM-Expression in der Invasionsfront

Für die Beurteilung der EpCAM Expression an der Invasionsfront wurden Proben von 47 Tumoren des diffusen Typs, 51 Tumoren des intestinalen Typs, sowie 25 Tumoren des mixed Typs analysiert. Dabei hatte der diffuse Typ den größten Anteil von Fällen mit fehlender EpCAM-Expression (28%, n = 13). Die Fälle des intestinalen Typs wiesen am häufigsten eine moderate und starke EpCAM-Expression auf (insgesamt 49%, n = 25) und der mixed Typ exprimierte EpCAM am häufigsten schwach (40%, n = 10) (Abbildung 13).

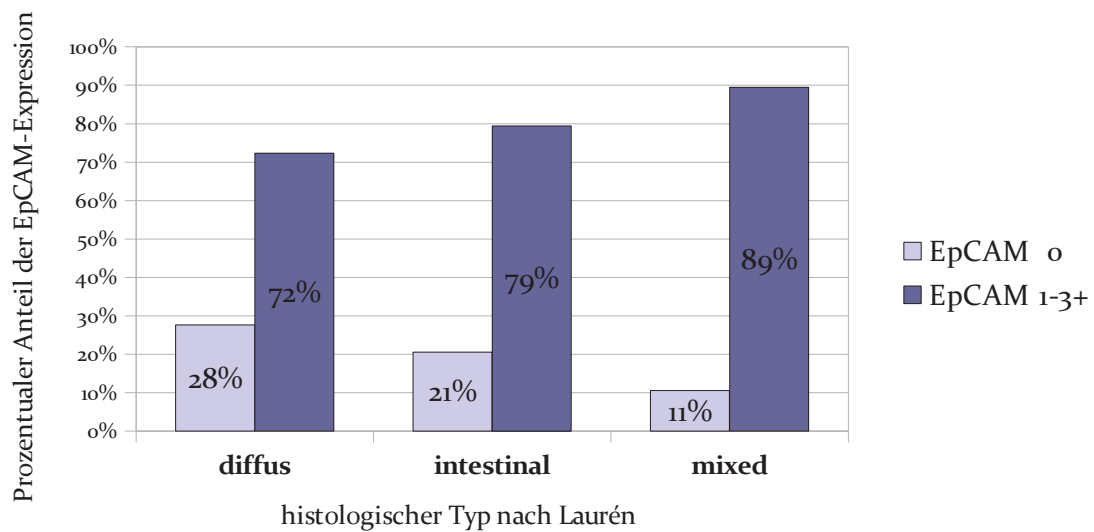


Abbildung 13: EpCAM-Expression in der Invasionsfront

Prozentualer Vergleich der EpCAM-Expression in der Invasionsfront bei den histologischen Typen nach Laurén.

3.2.3.3. Vergleich der EpCAM-Expression zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront

Zunächst wurde die EpCAM-Expression von Tumorzentrum und Invasionsfront innerhalb der verschiedenen Typen nach Laurén verglichen. Wie beim Gesamtkollektiv war beim Vergleich des Tumorzentrums mit der Invasionsfront kein statistischer Unterschied messbar. Beim Vergleich der histologischen Typen nach Laurén wies der mixed Typ häufiger homogene Expressionsstärken von Tumorzentrum und Invasionsfront auf (62,5% homogen, 37,5% heterogen). Im Vergleich dazu waren die Expressionsmuster bei den anderen beiden Typen annähernd gleich verteilt (55% homogen und 45% heterogen).

Die heterogenen Fälle besaßen entweder im Tumorzentrum einen höheren HercepTest-Score als in der Invasionsfront oder exprimierten EpCAM stärker in der Invasionsfront. Beim Vergleich der Typen nach Laurén ließ sich feststellen, dass das diffuse Karzinom einen auffällig höheren Anteil von solchen Tumoren aufwies, die in der Invasionsfront einen höheren HercepTest-Score zeigten als im Tumorzentrum: 28% (n = 13) im Vergleich zu intestinal 14% (n = 7) bzw. mixed 13% (n = 3) (Abbildung 14). Der Unterschied zwischen der

Verteilung der heterogenen Fälle beim diffusen Typ im Vergleich zum intestinalen Typ war statistisch signifikant ($p = 0,036$). Der Vergleich mit dem mixed Typ ergab keine signifikanten Unterschiede.

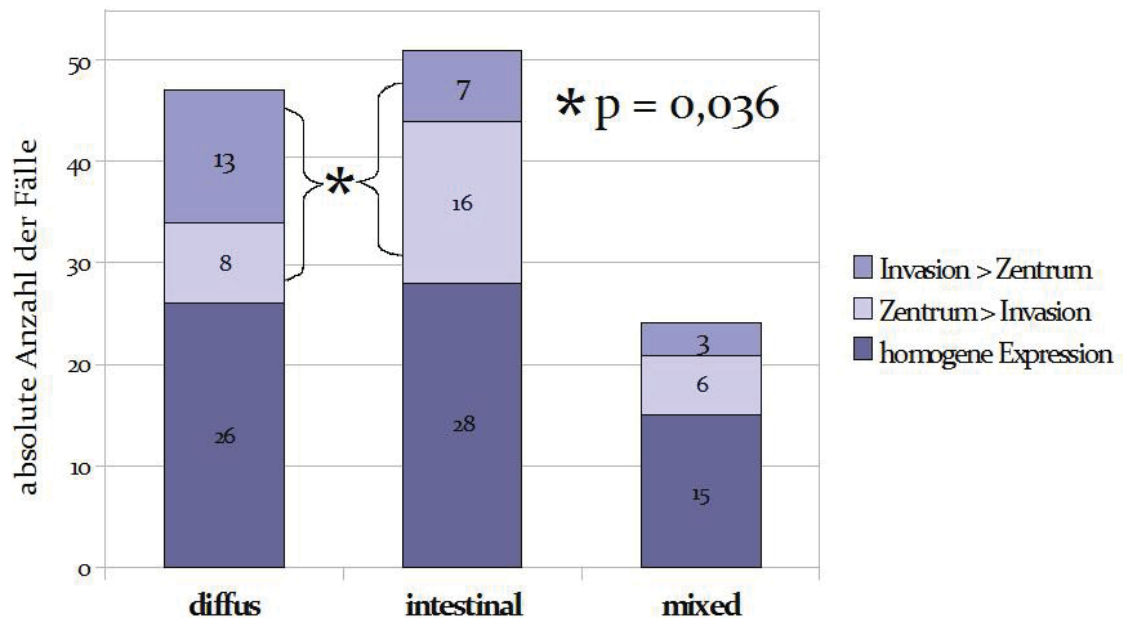


Abbildung 14: Heterogenität der EpCAM-Expression

Vergleich des Expressionsmusters von EpCAM bei den unterschiedlichen histologischen Typen nach Laurén.

3.2.4. EpCAM-Expression in Lymphknotenmetastasen

Für die Analyse der EpCAM-Expression bei den Lymphknotenmetastasen der Magenkarzinome konnten Gewebeproben von 88 Patienten ausgewertet werden. Unter Anwendung des HercepTest-Scores fand sich eine fehlende EpCAM-Expression bei 13 Proben (15%), eine schwache Expression bei 39% ($n = 34$) und eine moderate Expression bei 28% ($n = 25$). Mit 18% ($n = 16$) zeigte nur etwa ein Fünftel der Fälle eine starke EpCAM-Expression (Abbildung 15).

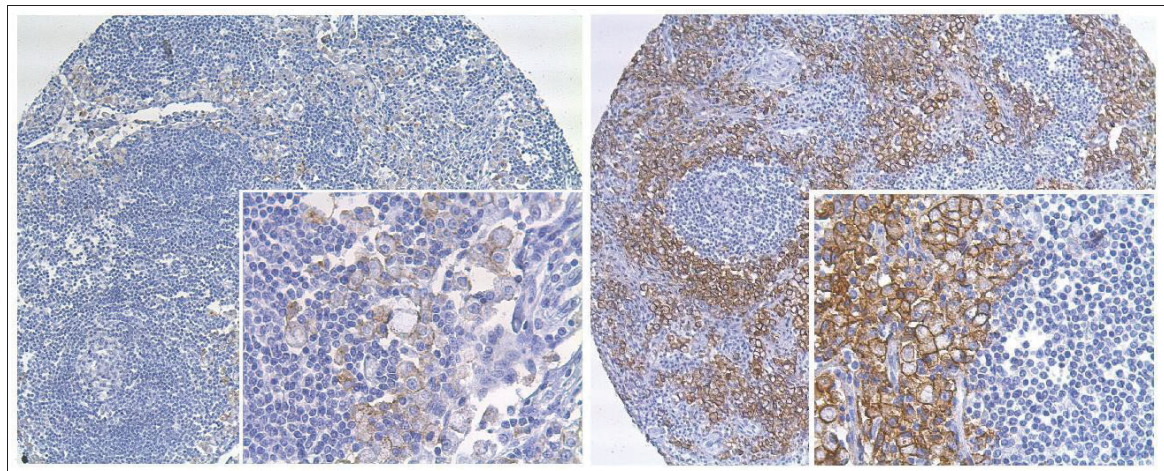


Abbildung 15: EpCAM-Expression in Lymphknotenmetastasen

Repräsentative Beispiele von Lymphknotenmetastasen mit schwacher EpCAM-Expression (links) und starker EpCAM-Expression (rechts); Vergrößerung: 100-fach (großer Bildausschnitt) bzw. 400-fach (kleiner Bildausschnitt).

Im Vergleich war die EpCAM-Expression der Lymphknotenmetastasen insgesamt höher als die der Primärtumoren. Lymphknotenmetastasen exprimierten EpCAM in 85% (n = 75) der Fälle und Primärtumoren nur in 74% (n = 65) der Fälle. Dieser Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant ($p = 0,061$) (Abbildung 16).

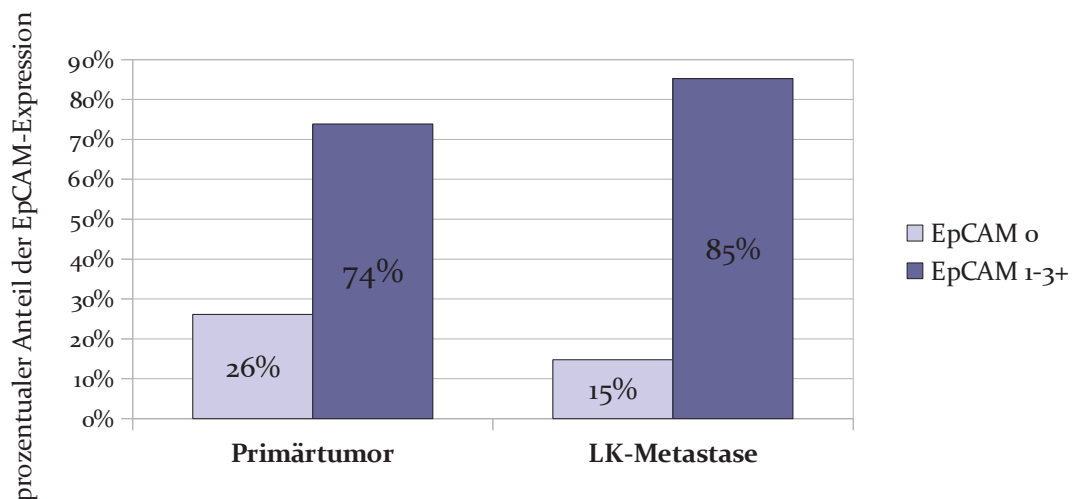


Abbildung 16: EpCAM-Expression von Primärtumor und Lymphknotenmetastase

Prozentualer Vergleich der EpCAM-Expression von Primärtumor und Lymphknotenmetastasen (LK-Metastase).

Um nun zu prüfen, ob Unterschiede bei der EpCAM Expression zwischen Primärtumoren und ihren dazugehörigen Lymphknotenmetastasen bestehen, wurde die Expression in den Lymphknoten in Abhängigkeit vom Primärtumorstatus analysiert. Hierbei ließ sich beobachten, dass Fälle mit EpCAM-negativen Primärtumoren häufiger auch EpCAM-positive Lymphknotenmetastasen (38%, n = 6) aufwiesen und EpCAM-positive Primärtumoren nur selten EpCAM-negative Lymphknotenmetastasen hatten (9%, n = 5) (Abbildung 17). Dieser Verteilungsunterschied war statistisch signifikant ($p < 0,001$).

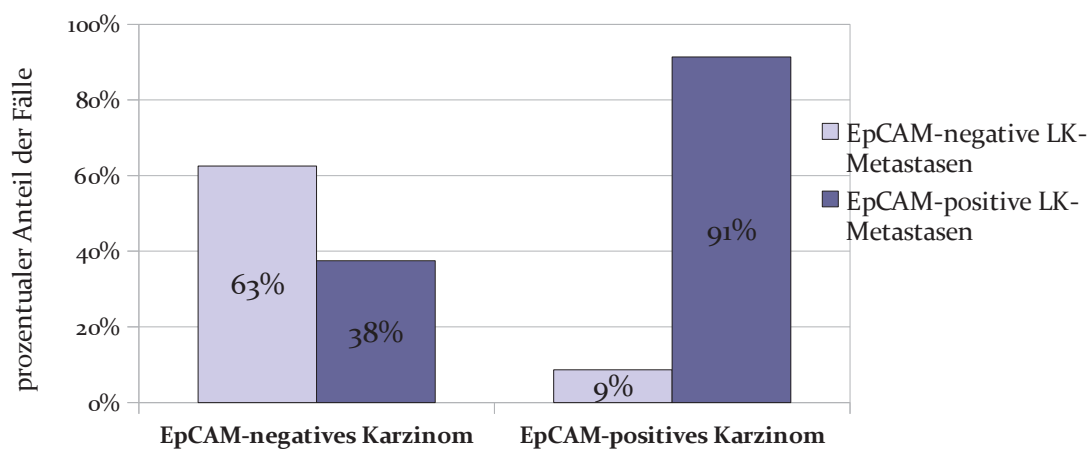


Abbildung 17: EpCAM-Expression in Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression im Primärtumor

Prozentualer Vergleich des Anteils der EpCAM-exprimierenden Lymphknoten abhängig von der EpCAM-Expression des Primärtumors (EpCAM-negatives vs. EpCAM-positives Karzinom).

3.2.4.1. Vergleich der EpCAM-Expression von Tumorzentrum, Invasionsfront und Lymphknotenmetastasen

In einem nächsten Schritt sollten nun alle verfügbaren Tumoranteile (Tumorzentrum, Invasionsfront und Lymphknotenmetastasen) bezüglich der EpCAM-Expression verglichen werden. Bei diesem Vergleich zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Verteilung (Abbildung 18).

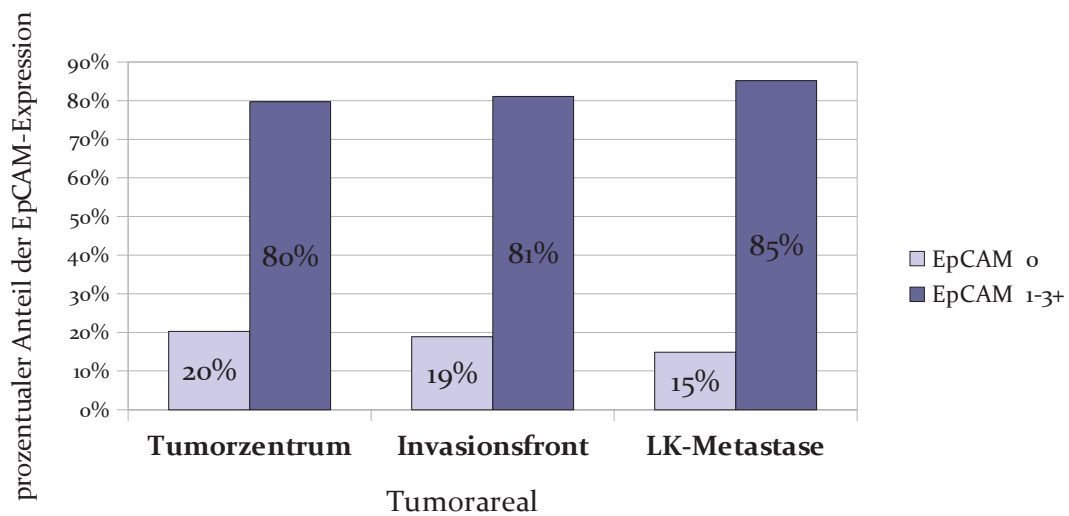


Abbildung 18: EpCAM-Expression von verschiedenen Tumorealen

Prozentualer Vergleich der EpCAM-Expression aufgetrennt nach den unterschiedlichen Tumorealen.

3.2.5. Korrelation der EpCAM-Expression mit histopathologischen Parametern

Die Assoziation der EpCAM-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern könnte indirekte Hinweise auf die Bedeutung von EpCAM für die Tumorentwicklung liefern. Hierfür wurde die EpCAM-Expression mit den Verteilungen in der T- und N-Kategorie sowie dem Differenzierungsgrad in dichotomisierter Form gegenübergestellt (Tabelle 6).

Bei der Auswertung der EpCAM-Expression war aufgefallen, dass es in dem Kollektiv Karzinome gab, die eine homogene bzw. heterogene Expression von Tumorzentrum und Invasionsfront aufwiesen. Daher wurde im Folgenden überprüft, ob zwischen diesen Gruppen ein Unterschied in Korrelation zu den histopathologischen Parametern bestand. Zunächst wurden die Gruppen homogen versus heterogen gegenübergestellt. Interessanterweise ließ sich feststellen, dass eine stärkere EpCAM-Expression in der Invasionsfront signifikant mit einer Metastasierung in die Lymphknoten einherging ($p = 0,03$) (Tabelle 8, der statistisch signifikante Wert ist grau hinterlegt).

		EpCAM negativ	%	EpCAM positiv	%	Signifikanz
Gesamttumor	T1+2	25	15%	82	50%	p = 0,779
	T3+4	12	7%	44	27%	
	No	8	5%	33	20%	p = 0,557
	N1-3	29	18%	92	57%	
	G1+2	6	4%	32	20%	p = 0,246
	G3+4	31	19%	94	58%	
Tumorzentrum	T1+2	23	14%	84	52%	p = 0,782
	T3+4	11	7%	45	28%	
	No	8	5%	33	20%	p = 0,770
	N1-3	26	16%	94	58%	
	G1+2	7	4%	31	19%	p = 0,657
	G3+4	27	17%	97	60%	
Invasionsfront	T1+2	16	12%	60	47%	p = 0,761
	T3+4	10	8%	43	33%	
	No	8	6%	16	13%	p = 0,079
	N1-3	18	14%	86	67%	
	G1+2	5	4%	23	18%	p = 0,203
	G3+4	21	16%	80	62%	
LK-Metastase	T1+2	11	13%	42	48%	p = 0,046
	T3+4	2	2%	33	38%	
	G1+2	2	2%	12	14%	p = 0,317
	G3+4	11	13%	63	72%	

Tabelle 6: Korrelation der EpCAM-Expression mit histopathologischen Parametern
Korrelation der EpCAM-Expression im Gesamttumor und der verschiedenen Tumorareale aufgedgliedert nach TNM-Klassifikation (T1+2 vs. T3+4 sowie No vs. N1-3) und Differenzierungsgrad (G1+2 vs. G3+4).

		EpCAM 0-1+	%	EpCAM 2-3+	%	Signifikanz
Tumorzentrum	T1+2	14	47%	4	13%	p = 0,018
	T3+4	4	13%	8	27%	
	No	3	10%	1	3%	p = 0,323
	N1-3	14	47%	12	40%	
	G1+2	0	0%	1	3%	p = 0,438
	G3+4	18	56%	13	41%	
Invasionsfront	T1+2	8	32%	3	12%	p = 0,111
	T3+4	6	24%	8	32%	
	No	0	0%	1	4%	p = 0,440
	N1-3	14	56%	10	40%	
	G1+2	1	4%	0	0%	p = 0,577
	G3+4	14	54%	11	42%	
LK-Metastase	T1+2	7	37%	3	16%	p = 0,047
	T3+4	2	11%	7	37%	
	G1+2	0	0%	1	5%	p = 0,550
	G3+4	9	45%	10	50%	

Tabelle 7: EpCAM-Expression in Tumoren des mixed Typs nach Laurén

Korrelation der EpCAM-Expression im Gesamttumor und der verschiedenen Tumorareale aufgegliedert nach TNM-Klassifikation (T1+2 vs. T3+4 sowie No vs. N1-3) und Differenzierungsgrad (G1+2 vs. G3+4).

	N 0		N 1-3		Signifikanz
homogenes Expressionsmuster	18	24%	56	76%	p = 0,065
heterogenes Expressionsmuster	6	11%	47	89%	
Tumorzentrum > Invasionsfront	5	61%	25	39%	p = 0,169
Invasionsfront > Tumorzentrum	1	4%	22	96%	
Invasionsfront > Tumorzentrum	1	4%	22	96%	p = 0,037
andere Expressionsmuster	23	22%	81	78%	

Tabelle 8: Korrelation des EpCAM-Expressionsmodells mit Lymphknotenmetastasierung

Vergleich verschiedener EpCAM-Expressionsmodells mit Lymphknotenmetastasierung (No vs. N1-3).

3.3. KI-67-EXPRESSION

3.3.1. Ki-67-Expression in der Normalschleimhaut

In der normalen Magenmukosa ließ sich in 71 Fällen (64%) keine Ki-67-Expression nachweisen. Bei den 40 positiven Fällen (36%) betrug die mittlere Rate der Ki-67 positiven Zellen 12% (Spannbreite 5-40%). Die intestinalen Metaplasien (n = 29), die sich bei einigen Schleimhäuten nachweisen ließen, waren in 16 Fällen (55%) positiv für Ki-67-Expression mit einer mittleren Anzahl von 13% (Spannbreite 5-30%).

3.3.2. Ki-67-Expression in Tumorgewebe und Lymphknoten-Metastasen

Die Magenkarzinome waren fast allen Fällen (92%, n = 147) positiv für Ki-67. Bei diesen betrug der Anteil der Ki-67-positiven Zellen im Mittel 11% (Spannbreite 0,5-60%). Der Anteil Ki-67-positiver Zellen in den Karzinomen war gegenüber der Normalmukosa signifikant. Anhand des Medians, der bei 7% Ki-67-positiven Zellen lag, wurden die Magenkarzinome in die Gruppen „niedrig proliferierend“ (57%, n = 91) und „hoch proliferierend“ (43%, n = 69) eingeteilt. In der Betrachtung der Ki-67-Expression in den verschiedenen Tumorearealen und den Lymphknotenmetastasen ließen sich keine relevanten Unterschiede in der Verteilung nachweisen (Tabelle 9).

In der Subanalyse der histologischen Typen nach Laurén zeigte sich beim diffusen Typ eine signifikant höhere Ki-67-Expression in den Lymphknotenmetastasen als im Karzinomgewebe (p = 0,004, Abbildung 19). Der intestinale und der mixed Typ wiesen relativ homogene Ki-67-Expressionsmuster im Primärtumor sowie in den Lymphknotenmetastasen auf.

Im Vergleich der Ki-67-Expression der verschiedenen Typen nach Laurén fiel auf, dass der diffuse Typ im Primärtumor (sowie auch in den einzelnen Arealen Tumorzentrum und Invasionsfront) eine signifikant geringere Ki-67-Expression aufwies als der intestinale und der mixed Typ (Abbildung 20 und Tabelle 10).

	Ki-67 negativ		Ki-67 positiv		Σ
Gesamttumor	13	8%	147	92%	160
Tumorzentrum	20	13%	138	87%	158
Invasionsfront	16	13%	107	87%	123
LK-Metastase	6	7%	80	93%	86

	niedrige Proliferation		hohe Proliferation		Σ
Gesamttumor	91	57%	69	43%	160
Tumorzentrum	84	53%	74	47%	158
Invasionsfront	61	50%	62	50%	123
LK-Metastase	43	50%	43	50%	86

Tabelle 9: Ki-67-Expression im Karzinomgewebe und Lymphknotenmetastasen

Oben: Ki-67-Expression im Gesamttumor und in den unterschiedlichen Tumorarealen. Unten: Ki-67-Expression aufgeteilt nach dem Median (niedrige vs. hohe Proliferation) im Gesamttumor und in den unterschiedlichen Tumorarealen

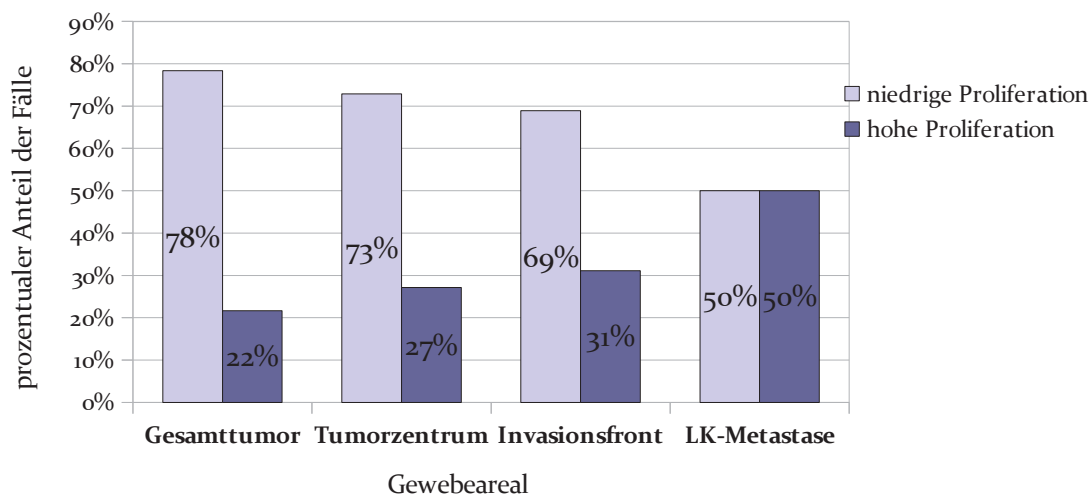


Abbildung 19: Ki-67-Expression beim diffusen Typ nach Laurén

Prozentualer Vergleich der Ki-67-Expression beim diffusen Typ nach Laurén im Gesamttumor und den verschiedenen Tumorarealen.

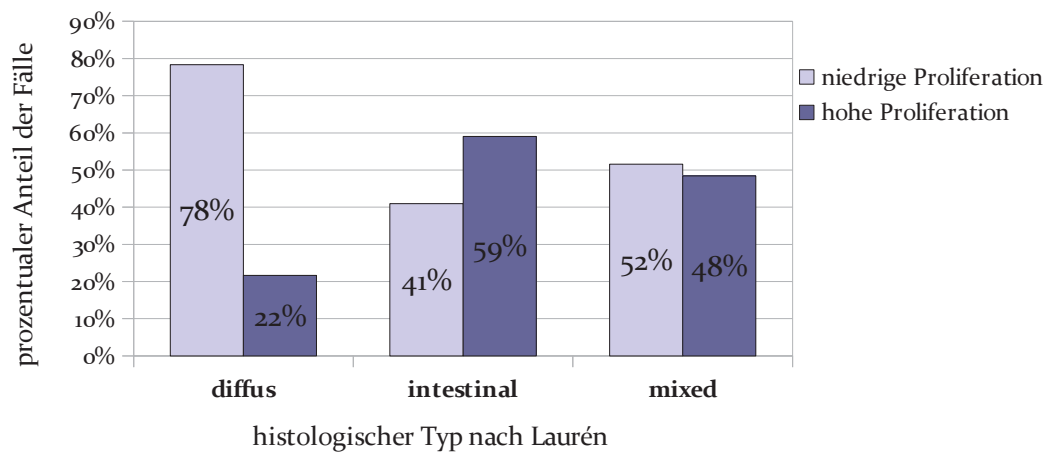


Abbildung 20: Verteilung der Ki-67-Expression im Gesamttumor

Prozentualer Vergleich der Ki-67-Expression der verschiedenen histologischen Typen nach Laurén, aufgegliedert in niedrig und hoch proliferierend.

		niedrige Proliferation	hohe Proliferation			Signifikanz
Gesamttumor	diffus	47	13	diff vs. int	p < 0,001	
	intestinal	25	36	diff vs. mix	p = 0,008	
	mixed	16	15	int vs. mix	p = 0,332	
Tumorzentrum	diffus	43	16	diff vs. int	p < 0,001	
	intestinal	22	39	diff vs. mix	p = 0,044	
	mixed	16	15	int vs. mix	p = 0,015	
Invasionsfront	diffus	31	14	diff vs. int	p = 0,006	
	intestinal	20	29	diff vs. mix	p = 0,018	
	mixed	8	13	int vs. mix	p = 0,0831	
Lymphknoten-metastase	diffus	17	17	diff vs. int	p = 1	
	intestinal	16	16	diff vs. mix	p = 0,0843	
	mixed	8	9	int vs. mix	p = 0,845	

Tabelle 10: Ki-67 Expression der histologischen Typen nach Laurén

Vergleich der Ki-67-Expression (absolute Zahlen) der Typen nach Laurén im Gesamttumor und in den einzelnen Tumorealen; diff = diffuser Typ, int = intestinaler Typ, mix = mixed Typ.

3.3.3. Korrelation zwischen Ki-67-positiven Zellen und EpCAM-Expression

Es war zu beobachten, dass der Anteil der Ki-67-positiven Zellen im Tumorgewebe sowie in den Lymphknotenmetastasen mit der EpCAM-Expressionsstärke anstieg. Im Mittel lag der Anteil der Ki-67-positiven Zellen bei 10%. Tumorproben mit fehlender EpCAM-Anfärbung hatten im Mittel nur Werte von 4% Ki-67-positiver Zellen, während stark gefärbte Tumorproben im Mittel 16% Ki-67-positive Zellen aufwiesen (Abbildung 21)

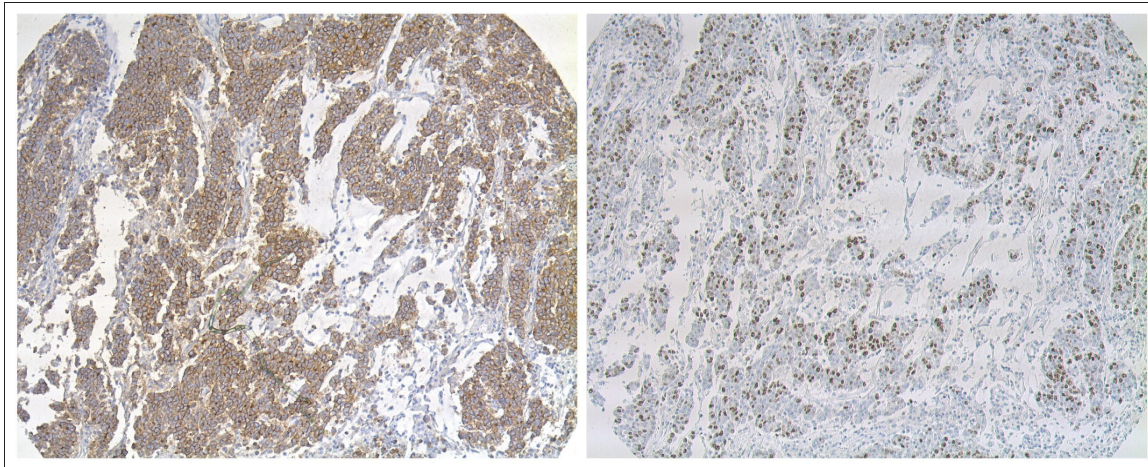


Abbildung 21: Korrespondierende EpCAM- und Ki-67-Expression

Beispielhaft wird hier innerhalb einer Tumorprobe die korrespondierende EpCAM- und Ki-67-Expression gezeigt. Beide Bildausschnitte sind in 100-facher Vergrößerung dargestellt. (Die Abbildung wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit erstellt und in der Publikation zu dieser Promotionsarbeit veröffentlicht [94].

Interessanterweise ließ sich ein annähernd proportionaler Anstieg des Anteils der Ki-67-positiven Zellen mit der EpCAM-Anfärbung verzeichnen (Abbildung 22). Bei dem Vergleich der Gruppen „niedrig proliferierend“ und „hoch proliferierend“ war der Zusammenhang zwischen einem erhöhten Anteil Ki-67-positiver Zellen und einer erhöhten EpCAM-Expression statistisch signifikant (Tabelle 11).

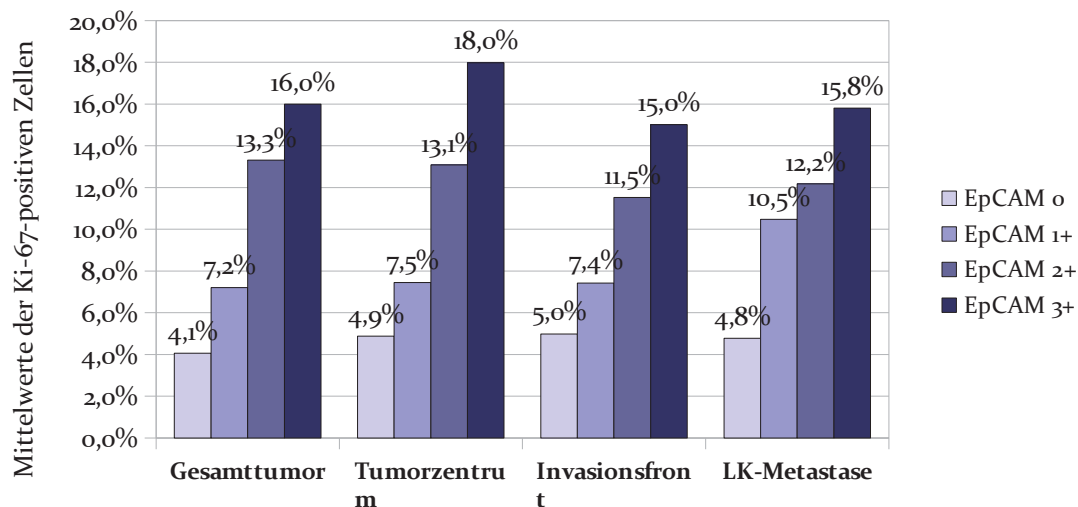


Abbildung 22: Korrelation von Ki-67- und EpCAM-Expression

Im Gesamttumor und den verschiedenen Tumorarealen stieg die Stärke der EpCAM-Expression (unterschiedliche Farbe der Balken) simultan mit der Ki-67-Expression an (Mittelwerte der Ki-67-Prozentwerte sind oberhalb des Balkens angegeben).

		niedrig proliferierend	hoch proliferierend	Signifikanz
Gesamttumor	EpCAM 0	34	3	p < 0,001
	EpCAM 1-3+	57	66	
Tumorzentrum	EpCAM 0	28	6	p < 0,001
	EpCAM 1-3+	56	68	
Invasionsfront	EpCAM 0	18	8	p = 0,024
	EpCAM 1-3+	43	54	
LK-Metastase	EpCAM 0	11	2	p = 0,007
	EpCAM 1-3+	32	41	

Tabelle 11: Korrelation zwischen Ki-67-Expression und EpCAM-Expression

EpCAM-Expression und Ki-67-Expression in dichotomisierter Form (absolute Werte).

3.3.3.1. Subanalyse der histologischen Typen nach Laurén

In der Einzelbetrachtung der Typen nach Laurén ließ sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen EpCAM-Expression und Anteil der Ki-67-positiven Zellen im Gesamttumor beobachten (Abbildung 23 und Tabelle 12).

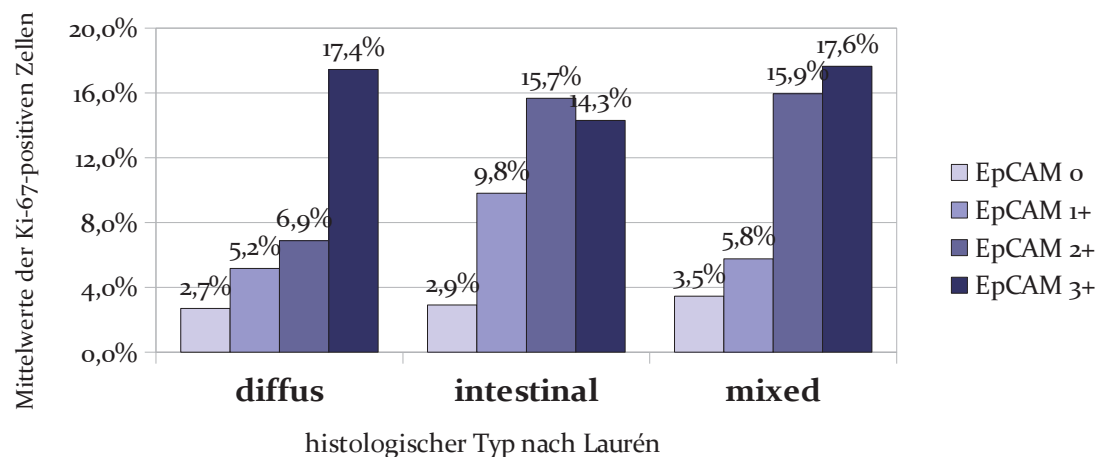


Abbildung 23: Ki-67- und EpCAM-Expression in den Typen nach Laurén

Analog zu Abbildung 22 stieg die Ki-67-Expression sukzessiv mit der Stärke der EpCAM-Expression auch in den verschiedenen Typen nach Laurén (Mittelwerte der Ki-67-positiven Zellen sind oberhalb der Balken angegeben).

		niedrig proliferierend	hoch proliferierend	Signifikanz
diffus	EpCAM 0	20	0	p = 0,002
	EpCAM 1-3+	27	13	
intestinal	EpCAM 0	7	1	p = 0,006
	EpCAM 1-3+	18	35	
mixed	EpCAM 0	6	1	p = 0,050
	EpCAM 1-3+	10	14	

Tabelle 12: Korrelation zwischen Ki-67- und EpCAM-Expression

Korrelation der EpCAM-Expression und Ki-67-Expression in dichotomisierter Form bei den verschiedenen Typen nach Laurén.

3.4. ÜBERLEBENSANALYSE

3.4.1. Prognostischer Einfluss der histopathologischen Parameter

Im untersuchten Patientenkollektiv waren die Stadien nach UICC, sowie auch jeweils die pT- und pN-Kategorie für das Überleben prognostisch signifikante Parameter (Tabelle 13). Fortgeschrittene bzw. metastasierte Tumoren hatten ein schlechteres Überleben als frühe Tumorstadien bzw. nicht metastasierte Tumoren (Abbildung 24).

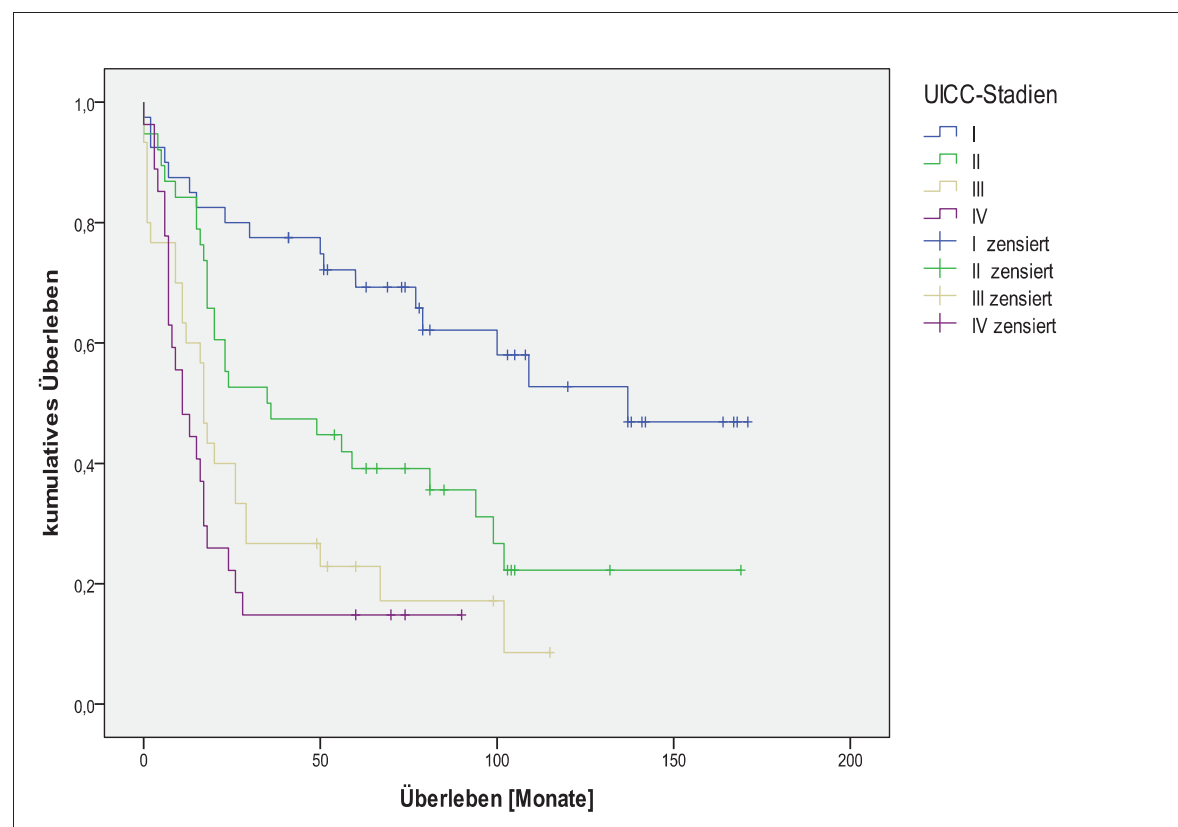


Abbildung 24: Einfluss des UICC-Stadiums auf das Gesamtüberleben

Kaplan-Meier-Kurven der unterschiedlichen UICC-Stadien.

Dahingegen hatten der Differenzierungsgrad, das Alter, das Geschlecht sowie die histologischen Typen nach Laurén keinen prognostisch signifikanten Einfluss auf das Überleben (Tabelle 13).

	mittleres Überleben [Monate]	Standardfehler	Signifikanz
UICC Stadium I	111	11,13	p < 0,001
UICC Stadium II	67	10,55	
UICC Stadium III	33	7,11	
UICC Stadium IV	23	5,53	
pT1+2	78	7,11	p < 0,001
pT3+4	28	6,48	
pNo	98	11,57	p = 0,001
pN1-3	53	6,60	
G1+2	82	12,42	p = 0,135
G3+4	61	6,75	
diffus	56	9,31	p = 0,729
intestinal	68	9,15	
mixed	64	14,40	
männlich	23	4,25	p = 0,141
weiblich	51	24,41	
Alter 70J.	35	14,87	p = 0,247
Alter >70J.	23	4,89	

Tabelle 13: Überlebensanalyse für histopathologische Parameter

Mittlere Überlebenszeit in Monaten mit deren Standardfehler. Die p-Werte wurden mithilfe Log Rank Test ermittelt.

3.4.2. Prognostischer Einfluss der EpCAM-Expression

Bei der Überlebensanalyse war ein heterogenes Expressionsmuster von EpCAM innerhalb eines Tumors signifikant mit einer ungünstigen Prognose korreliert (Log Rank, p = 0,04). Patienten, deren Tumoren eine stärkere Expression von EpCAM in der Invasionsfront aufwiesen, hatten mit 24 Monaten das kürzeste mittlere Überleben im Vergleich zu solchen Fällen mit stärkerer Expression im Tumorzentrum (49 Monate) und auch im Vergleich zu den Fällen mit einer homogenen Expression (65 Monate) (Abbildung 25).

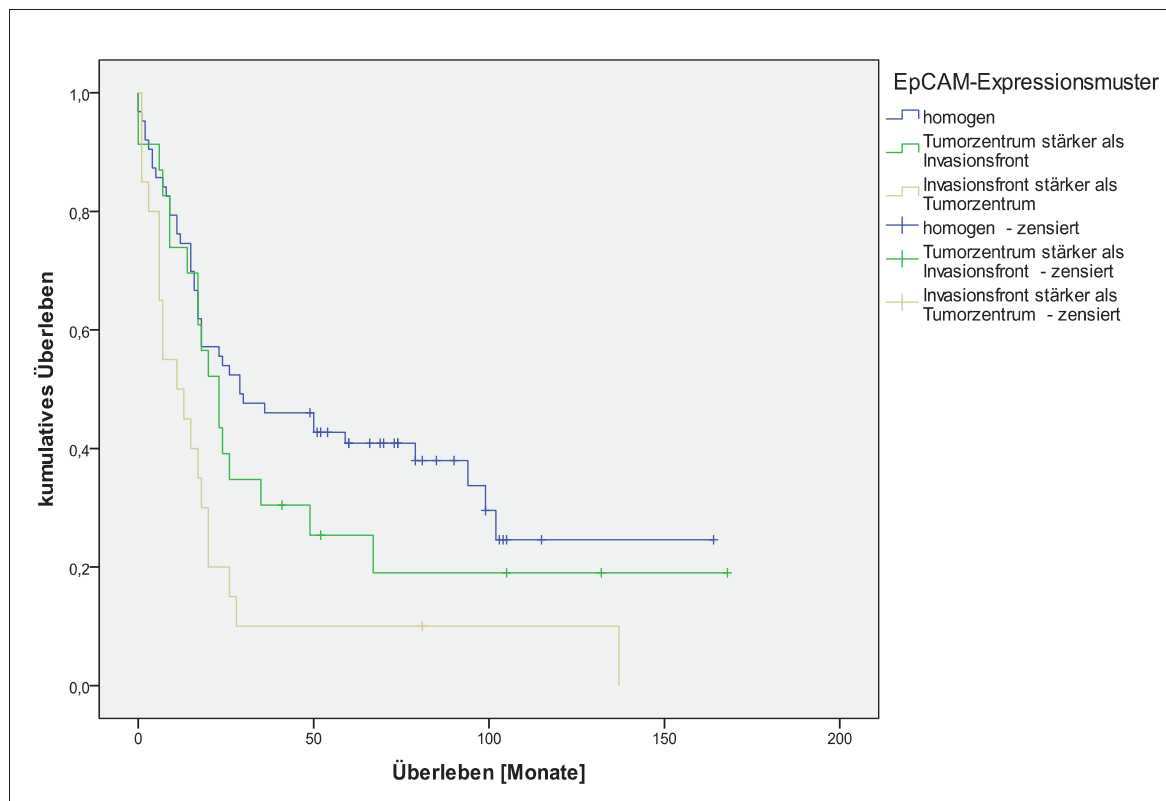


Abbildung 25: Einfluss des EpCAM-Expressionsmusters auf das Gesamtüberleben
Kaplan-Meier-Kurven der unterschiedlichen EpCAM-Expressionsmuster.

Bei dem anschließenden Vergleich der Karzinome mit einer stärkeren EpCAM-Expression in der Invasionsfront mit allen anderen Expressionsmustern zeigte sich für diese Gruppe ebenfalls ein signifikant schlechteres Überleben (24 vs. 63 Monate, $p = 0,001$, Abbildung 26). In der Subanalyse der Typen nach Laurén wiesen diffuse Karzinome signifikant häufiger eine höhere EpCAM-Expression in der Invasionsfront als im Tumorzentrum auf. Das Gesamtüberleben zeigte sich bei diesem Laurén-Typ signifikant verkürzt, wenn eine stärkere EpCAM-Expression in der Invasionsfront vorhanden war (57 vs. 10 Monate, $p = 0,001$). Ein ähnlicher Einfluss der stärkeren EpCAM-Expression an der Invasionsfront ließ sich auch beim intestinalen Typ nachweisen (55 vs. 21 Monate, $p = 0,050$)

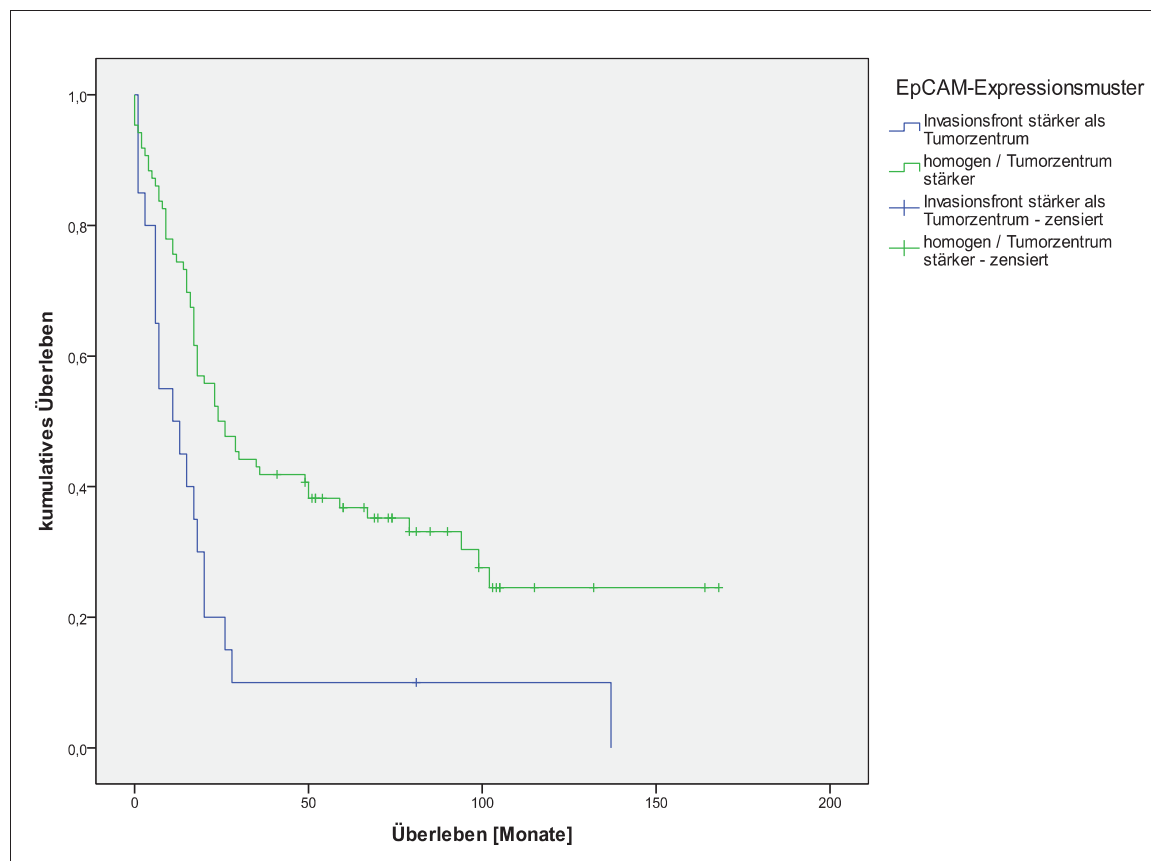


Abbildung 26: Prognostischer Einfluss einer stärkeren Expression in der Invasionsfront

Kaplan-Meier-Kurven für den Vergleich der Gruppe „Invasionsfront stärker als Tumorzentrum“ gegenüber der zusammengefassten Gruppe „homogene Expression“ und „Tumorzentrum stärker als Invasionsfront“.

Darüber hinaus zeigte sich ein signifikant schlechteres Überleben für die Gruppe, bei der die EpCAM-Expression in den Lymphknotenmetastasen stärker war als im Tumorzentrum (11 Monate versus 57 und 34 Monate in den Gruppen homogen (34 Monate) und TZ stärker als LK (57 Monate); $p = 0,013$).

4. DISKUSSION

Bei der weiterhin recht ungünstigen Prognose des Magenkarzinoms ist die Suche nach neuen therapeutischen Angriffspunkten von klinischer Bedeutung. In diesem Zusammenhang könnte EpCAM als mögliche Zielstruktur für systemische Therapien interessant sein. Es wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen eine Neo-Expression in Magenkarzinomen im Vergleich zur normalerweise EpCAM-negativen Magenmukosa beschrieben [24][95][49]. In dem hier untersuchten Patientenkollektiv konnte unter Anwendung des HercepTest-Scores eine EpCAM-Expression in 77% der Fälle im Magenkarzinomgewebe beobachtet werden. Andere Autoren beschrieben auch höhere Anteile an EpCAM-exprimierenden Tumorzellen von 90%-98% [82][24][50]. Dies kann zum Teil durch die Verwendung verschiedener Scores zur Quantifizierung der EpCAM-Expression erklärt werden. Im Einklang mit der aktuellen Studienlage zeigte sich in normaler Magenmukosa keine EpCAM-Expression [19][28][95][32][50]. Intestinale Metaplasien, die innerhalb der normalen Magenmukosa gefunden wurden, zeigten in der vorliegenden Arbeit in 94% eine positive EpCAM-Expression. Eine starke Expression in solchen Metaplasien wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [28][50]. Der Anstieg der EpCAM-Expression in der Entwicklung einer intestinalen Metaplasie könnte daher möglicherweise als Früherkennungs-Marker für Risikopatienten im Rahmen von Gastroskopien mit Gewebebiopsien verwendet werden. Ähnliche Überlegungen für die Verwendung von EpCAM als frühen Risikomarker äußerten bereits andere Autoren für neoplastisch veränderte Zellareale im Bereich der Cervix uteri [37].

In Bezug auf die EpCAM-Expression muss jedoch festgestellt werden, dass diese häufig nur für den Gesamttumor und ohne nennenswerte systematische Angaben zur Heterogenität der Expression beschrieben wurde. Ein wichtiger Aspekt der hier vorliegenden Arbeit war daher, dass die verschiedenen Tumoreale Invasionsfront und Tumorzentrum auch getrennt voneinander analysiert wurden. Hierbei zeigten sich in Bezug auf die EpCAM-Expression Unterschiede zwischen diesen Kompartimenten. Eine Betonung der Expression bei der Invasionsfront oder dem Tumorzentrum war nicht feststellbar.

Die biologische Bedeutung der Neo-Expression von EpCAM bei Magenkarzinomen bleibt jedoch weiterhin nicht vollständig geklärt. Hinweise für eine mögliche biologische Bedeutung könnten Zusammenhänge der EpCAM Expression mit aggressiven

Tumoreigenschaften, wie fortgeschrittene Tumorgröße, Lymphknotenmetastasierung, schlechte Differenzierung oder ungünstiger prognostischer Einfluss liefern. Betrachtet man die bislang bekannte Biologie von EpCAM, könnte schon eine Neo-Expression von EpCAM, wie sie auch hier bei den Magenkarzinomen beobachtet werden konnte, durchaus einen aggressiven Phänotyp andeuten. Zu dieser Hypothese passen auch einige der in dieser Arbeit gemachten Befunde. So fand sich zwar keine Korrelation der EpCAM-Expression mit den histopathologischen Parametern, aber in den Lymphknotenmetastasen der Magenkarzinome der vorliegenden Arbeit war eine stärkere EpCAM-Expression als in den Primärtumoren beobachtbar. Dabei waren 85% der Lymphknotenmetastasen positiv für EpCAM und nur 74% der zugehörigen Primärtumoren. Während bei EpCAM-positiven Primärtumoren die EpCAM Expression in den Lymphknotenmetastasen fast immer erhalten war, zeigten EpCAM-negative Primärtumoren auch häufiger EpCAM-positive Tumorzellen in den Lymphknotenmetastasen. Zusätzlich zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer positiven EpCAM-Expression in Lymphknotenmetastasen und einer ausgeprägteren Tumorinvasionstiefe ($T_3/4$, $p = 0,046$). Bemerkenswert war auch der Befund, dass Tumoren mit einer stärkeren EpCAM-Expression an der Invasionsfront eine erhöhte Lymphknotenmetastasierung aufwiesen. Diese Befunde werden von Daten der Arbeitsgruppe um Wenqi gestützt [80][79], da beobachtet wurde, dass Lymphknoten-positive Magenkarzinome eine signifikant höhere EpCAM-Expression hatten. Jedoch wiesen im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit Primärtumoren und ihre zugehörigen Lymphknotenmetastasen keine signifikant unterschiedliche EpCAM-Expression auf.

Neben der Korrelation der EpCAM-Expression mit histopathologischen Parametern kann der prognostische Einfluss einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung von EpCAM beim Magenkarzinom liefern. Für das in der vorliegenden Arbeit analysierte Kollektiv lagen entsprechende klinische Daten für das Gesamtüberleben vor. Da keine tumorspezifischen Überlebensdaten verfügbar waren, bestand die Gefahr durch die Unschärfe der Daten im Bezug auf die Todesursache Informationen zu verlieren. Denn möglicherweise wird die EpCAM-Expression mit anderen Todesursachen korreliert. Aus diesem Grunde war es wichtig nachzuweisen, dass die klassischen prognostischen Parameter signifikant mit einem kürzerem Überleben verbunden sind. Tatsächlich zeigte sich für das Gesamtüberleben ein deutlicher negativer prognostischer Einfluss hoher pT-, pN- und UICC-Stadien. Bei diesem deutlichen prognostischen Effekt lässt sich auf eine meist tumorassoziierte Todesursache bei

den Patienten des Kollektives schließen und somit schien das Kollektiv des TMAs geeignet, um die prognostische Bedeutung von EpCAM für Magenkarzinome zu analysieren. Bemerkenswerterweise fand sich keine prognostische Bedeutung der histologischen Typen nach Laurén. Eine solche fehlende Korrelation wurde zuvor jedoch auch schon von anderen Autoren beschrieben [96].

Bei der Analyse der prognostischen Bedeutung der EpCAM-Expression des Gesamttumors ließ sich keine Korrelation mit dem Überleben feststellen. Das mittlere Überleben betrug 24 Monate für EpCAM-positive Magenkarzinome und 20 Monate für Patienten ohne jegliche EpCAM-Expression ($p = 0,765$). Da eine wichtige Beobachtung der vorliegenden Arbeit war, dass in 42% der untersuchten Fälle ein heterogenes Expressionsmuster von EpCAM zwischen Invasionsfront und Tumorzentrum bestand, sollte auch ein möglicher prognostischer Einfluss dieser Heterogenität überprüft werden. Tatsächlich war bei Tumoren mit einer im Vergleich zum Tumorzentrum stärkeren EpCAM-Expression an der Invasionsfront ein signifikant kürzeres Überleben festzustellen. Da bislang keine weiteren Untersuchungen zu diesen unterschiedlichen Tumorarealen in der aktuellen Literatur verfügbar waren, wurden ähnliche Beobachtungen bislang noch nicht beschrieben.

Der prognostische Einfluss der EpCAM-Expression wurde bereits bei vielen verschiedenen Tumorentitäten untersucht, jedoch immer für den Gesamttumor und ohne Unterscheidung verschiedener Tumorareale. Ein schlechteres Überleben in Verbindung mit einer EpCAM-Expression zeigte sich beim Urothel- [44], beim Gallenblasen- [45][46], beim Mamma- [53] [54] und beim Ösophaguskarzinom [34]. In einigen Studien wurde die prognostische Bedeutung differenzierter betrachtet und Subgruppen analysiert. So war bei pT1-Gallenblasen-Karzinomen die EpCAM-Überexpression ein signifikanter Prädiktor für eine schlechtere Prognose, in pT2-T4-Tumoren hatte sie keinen prognostischen Wert [45]. Auch bei den Ösophaguskarzinomen scheint der prognostische Einfluss von EpCAM nicht einheitlich zu sein. In diesem Falle beziehen sich die Unterschiede nicht auf die Stadien, sondern auf die unterschiedlichen histologischen Typen. So war beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus eine erniedrigte rezidivfreie Überlebensdauer (9 Monate vs. 43 Monate) bei starker (3+) EpCAM-Expression beobachtet worden. EpCAM war ein statistisch signifikanter, unabhängiger prognostischer Einflussfaktor [34]. Eine Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern (pT, pN, Grading) fand sich jedoch nicht [34]. Dahingegen wurde im Falle ösophagealer Adenokarzinome ein Überlebensvorteil einer

stärkeren EpCAM-Expression beschrieben [97]. In die Reihe der Tumoren, bei denen eine erhöhte EpCAM-Expression mit guter Prognose einhergeht, gehören auch das Nierenzellkarzinom [56] und das Bronchialkarzinom [24].

Interessanterweise wurde ein ähnlicher Zusammenhang in den zwei bislang verfügbaren Untersuchungen auch für das Magenkarzinom beschrieben. So beobachtete die Arbeitsgruppe um Songun einen Überlebensvorteil für Patienten mit Magenkarzinomen, die eine starke EpCAM-Expression aufwiesen [51]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen ebenfalls Warnecke und Kollegen [98]. Hervorzuheben ist jedoch bei der Songun Arbeit, dass der ungünstige prognostische Einfluss EpCAM-negativer Tumoren nur bei den Tumorstadien I und II zu messen war, aber nicht bei höheren Tumorstadien [51]. Bei diesen beiden Magenkarzinom-Arbeiten wurde nur die EpCAM-Expression des Gesamttumors untersucht. Insofern kann die Diskrepanz der Ergebnisse zum einen an der Heterogenität der EpCAM-Expression liegen, die in der vorliegenden Arbeit systematisch untersucht wurde. Zum anderen können die Unterschiede dadurch bedingt sein, dass bei Songun et al möglicherweise keine saubere Differenzierung zwischen Kardia- und "Nicht-Kardia"-Karzinomen erfolgt ist. Karzinome des gastroösophagealen Übergangs und der Kardia weisen Eigenschaften von Adenokarzinomen des Ösophagus auf, welche pathogenetisch häufig aus einem Barrett-Epithel entstehen [33]. Daher ist bei der Beurteilung von Karzinomen des Magens eine Abgrenzung sinnvoll [3][96]. Einen relevanten Unterschied der EpCAM-Expression dieser Tumorentitäten wurde auch von Deveci et al dokumentiert [52].

Da, wie bereits beschrieben, die EpCAM-Expression zwischen den unterschiedlichen histologischen Typen einer Tumorentität differieren kann, war der Bezug zur Laurén-Klassifikation ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit. In den bislang durchgeführten Untersuchungen zur EpCAM-Expression bei Magenkarzinomen konnte keine Korrelation zwischen EpCAM-Expression und der Laurén-Klassifikation beobachtet werden [80][82]. Die hier erhobenen Daten zeigten eine signifikant höhere EpCAM-Expression in Magenkarzinomen des intestinalen Typs ($p = 0,008$) im Vergleich zum diffusen Typ. Zu diesem Befund passt die Beobachtung, dass intestinale Metaplasien ebenfalls eine starke EpCAM-Expression aufwiesen. Da ein häufigeres Auftreten intestinaler Metaplasien in Zusammenhang mit dem intestinalen Typ des Magenkarzinoms steht [96] könnte man spekulieren, dass vor allem das intestinale Karzinom aus solchen intestinalen Metaplasien

hervorgeht. Hier muss allerdings die geringe Fallzahl von 31 Patienten beachtet werden, bei denen eine intestinale Metaplasie in der Normalmukosa beobachtet werden konnte.

Ein differenzielles Expressionsmuster bei den unterschiedlichen Typen nach Laurén konnte bereits für eine klinisch relevante therapeutische Zielstruktur, das HER2 Onkogen, beschrieben werden. Eine starke Expression trat signifikant häufiger beim intestinalen Typ auf und korrelierte hier mit einem kürzeren Überleben [99]. Interessanterweise zeigte die Gruppe der diffusen Karzinome eine signifikant höhere Anzahl von Tumoren, die in der Invasionsfront stärker EpCAM exprimierten als im Tumorzentrum. In diesem Fall war auch die prognostische Signifikanz der erhöhten EpCAM-Expression am Tumorrand recht ausgeprägt.

Die Beobachtung, dass sich EpCAM vor allem in der Invasionsfront positiv zeigte und der Zusammenhang mit einer schlechten Prognose feststellbar war, lässt darauf schließen, dass EpCAM zur Progression von Magenkarzinomen beiträgt. Dies wäre nicht aufgefallen, wenn die Tumoreale nicht getrennt voneinander analysiert worden wären, was verdeutlicht, wie entscheidend eine solche systematisch durchgeführte selektive Untersuchung sein kann. Insbesondere, da sich nicht zuletzt durch die Einflüsse der Mikroumgebung, die biologischen Eigenschaften der Tumorzellen im Zentrum von denen an der Invasionsfront unterscheiden. Besonders gut ist dies beim kolorektalen Karzinom untersucht, bei dem ein sogenanntes „Tumor Budding“ am Invasionsrand auftreten kann und ein starker negativer prognostischer Marker ist [100]. Hierbei handelt es sich um Tumorsprossen, die mikroskopisch als einzelne Tumorzellen oder Tumorzellgruppen (bis maximal fünf Zellen) in der Invasionsfront des Karzinoms imponieren [101]. Das Tumor Budding ist der morphologische Ausdruck der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), die direkt am Invasionsrand an der Grenze zum gesunden Gewebe stattfinden kann und als wichtige Voraussetzung für die Metastasierung gilt. Nach aktueller Literaturlage geht eine EMT eigentlich mit dem Verlust der EpCAM-Expression einher [102]. Dies kann man auch bei kolorektalen Karzinomen beobachten [42]. Dabei muss hervorgehoben werden, dass im Gegensatz zur normalen Magenschleimhaut in der Normalmukosa des Dickdarms eine starke EpCAM-Expression physiologisch ist. Bei den ansonsten sehr stark EpCAM-exprimierenden kolorektalen Karzinomen war dann häufiger eine abgeschwächte Expression von EpCAM in der Invasionsfront zu sehen, was auch mit infiltrativem Wachstum und einem erhöhten Risiko für Lokalrezidive assoziiert war [42].

Wie lassen sich nun die zu diesen Daten unterschiedlichen Beobachtungen der vorliegenden Arbeit einordnen? In diesem Zusammenhang muss betont werden, dass hier nicht nur die Grenzfläche an der Invasionsfront untersucht wurde, sondern der gesamte Zellsaum, den man als Zentrumsfern bezeichnen kann und der gemeinhin als Proliferationszone von Tumoren gilt. In der Tat lassen sich beim Magenkarzinom in dieser Invasionsrand-nahen Zone häufiger proliferierende Zellen finden, als im Tumorzentrum [103]. Auch wenn in der vorliegenden Arbeit ein solcher Unterschied der Ki-67-Expression zwischen Invasionsfront und Tumorzentrum nicht beobachtet wurde, war es in diesem Zusammenhang besonders interessant, ob eine Korrelation der EpCAM-Expression und der Proliferation besteht. In früheren Arbeiten konnte beispielsweise im Falle von proliferierenden Gallengangszellen als Folge von verschiedenen hepatischen Pathologien (Leberzirrhose, noduläre Metaplasie u.a.) eine erhöhte EpCAM-Expression nachgewiesen werden, wobei Ki-67 als Proliferationsmarker diente. In vollständig differenzierten Hepatozyten war eine Ki-67-Expression hingegen nicht detektierbar [31].

Über erste Hinweise eines Zusammenhangs von EpCAM mit der Proliferation und dem Zellzyklus berichtete Münz aus der Arbeitsgruppe um Olivier Gires [36]. So konnte eine Reduktion der Proliferation bei einem Arrest des Zellzyklus in der G₁-Phase durch Herunterregulation der EpCAM-Expression mittels RNA-Interferenz bewirkt beobachtet. Um nun die Rolle von EpCAM für die Zellproliferation bei Magenkarzinomen näher beleuchten zu können, wurde in dieser Arbeit die Expression von EpCAM sowie die Expression von Ki-67 an Serienschnitten des TMAs untersucht und diese Befunde anschließend korreliert. Zunächst zeigte die Analyse eine Steigerung Ki-67-positiver Fälle von normaler Magenmukosa (36%) über intestinale Metaplasie (55%) bis zum Magenkarzinomgewebe (92%), was auf einen Anstieg der Proliferationsrate hinwies. Eine solche ansteigende Ki-67-Expression konnte auch anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden [104][105]. Spannend war dann der Befund, dass die Ki-67-Expression im Tumorgewebe, sowie in den Lymphknotenmetastasen mit der EpCAM-Expressionsstärke anstieg. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen vermehrter Ki-67-Expression und erhöhter EpCAM-Expression fand sich in allen Tumorarealen, ohne Unterschied zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront. Mit den bislang bekannten Daten der Biologie von EpCAM legt diese Korrelation nahe, dass EpCAM bei den Magenkarzinomzellen mit Proliferation assoziiert ist. Eine gleichzeitige Expression von EpCAM und Ki-67 konnte

bereits in früheren Arbeiten bei anderen Neoplasien beobachtet werden [30][37]. So konnte bei Plattenepithelkarzinomen der Cervix mithilfe von Ki-67 gezeigt werden, dass EpCAM-exprimierende Areale des Tumors stärker proliferierten als andere [37].

Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf einen proliferativen Einfluss von EpCAM hin. In der Subanalyse der Typen nach Laurén bestand beim diffusen Typ eine signifikant niedrigere Ki-67-Expression in den Primärtumoren als beim intestinalen und beim mixed Typ. Dies bekräftigt die Beobachtung, dass diffuse Magenkarzinome eine niedrigere Mitoserate aufweisen als die vom intestinalen Typ [5]. Interessanterweise zeigte sich allerdings beim diffusen Karzinom eine signifikant höhere Ki-67-Expression in den Lymphknotenmetastasen als in den Primärtumoren ($p = 0,004$). Dies, gemeinsam mit der Tatsache, dass der diffuse Typ stärkere Expressionsraten in der Invasionsfront aufwies, deutet darauf hin, dass insbesondere aggressive und progressionsfördernde Zellen beim Magenkarzinom vermehrt EpCAM exprimieren. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass durch Downregulation von EpCAM mittels siRNA eine signifikante Suppression der Proliferation, Koloniebildung, Adhäsion und Migration von Magenkarzinom-Zelllinien ausgelöst werden konnte [79]. Bei diesen *in vitro* Versuchen scheint dabei die proliferative Wirkung im Vordergrund zu stehen. Auch beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus lässt sich eine solche proliferationsfördernde Wirkung von EpCAM nachweisen und es wurde vermutet, dass EpCAM für das Auswachsen von Metastasen wichtig ist [106]. In diesem Zusammenhang war wichtig, dass disseminierte Tumorzellen und Mikrometastasen in Lymphknoten häufiger EpCAM-positiv sind. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete höhere EpCAM-Expression in den Lymphknotenmetastasen lässt sich daher mit den Daten des ösophagealen Plattenepithelkarzinoms in Einklang bringen. In diesem Zusammenhang ist es auch interessant, dass die EpCAM-Expression wahrscheinlich bei einigen Tumortypen, wie es auch für das Ösophaguskarzinom vermutet wurde, dynamisch ist [102]. Nach dieser Hypothese exprimieren Zellen im Primärtumor in der proliferativen Zone EpCAM. In dieser Phase trägt EpCAM als Signalmolekül zur Proliferation der Tumorzellen bei. Sobald Tumorzellen aus der proliferativen Phase in die migratorische Phase kommen und in das umgebende Gewebe eindringen, erlangen sie im Rahmen der EMT einer eher mesenchymalen Phänotyp. In dieser Situation wird EpCAM herunterreguliert. Signale, die bei den Zellen eine EMT initiieren, können dabei direkt aus der Mikroumgebung der

Invasionsfront kommen. In der Blutbahn und auf dem Weg zu den Zielorganen weisen die Tumorzellen häufig noch einen eher mesenchymalen Charakter auf. Wachsen dann die Tumorzellen in ihrer metastatischen Nische aus, wird EpCAM erneut exprimiert und fördert die Proliferation der Tumorzellen [102]. Gerade durch die beobachteten unterschiedlichen Effekte bei der räumlichen Verteilung der EpCAM-Expression, könnte ein solches Modell auch für das Magenkarzinom angenommen werden.

Bei der Frage, ob EpCAM ein prognostischer Marker für das Magenkarzinom ist, kann mit Sicherheit keine abschließende Aussage getroffen werden. Ein anderer Aspekt ist die therapeutische Anwendung. Vergewärtigt man sich die Erfolge von anti-EpCAM Antikörpern im Rahmen der Peritonealkarzinose u.a. beim Magenkarzinom [107] und bringt diese Daten mit den hier beschriebenen Befunden und den publizierten *in vitro* Daten [79] in einen Zusammenhang, ist durchaus vorstellbar, dass EpCAM ein therapeutischer Ansatzpunkt für systemische Therapien beim Magenkarzinom sein könnte. Aufgrund ihrer Heterogenität würde im Rahmen einer solchen anti-EpCAM Therapie eine immunhistochemische Testung zur Bestimmung der EpCAM-Expression, analog zu der in dieser Arbeit durchgeführten Methode, erforderlich werden. Vor einer systemischen anti-EpCAM Therapie bei Magenkarzinompatienten sollten in jedem Fall weitere Untersuchungen an prä-klinischen Modellen durchgeführt werden und die Expression von EpCAM in größeren multizentrischen Studien mit standardisierten Protokollen überprüft werden. Für solche Validierungsstudien wäre es essentiell, nicht nur einen zufällig gewählten Abschnitt des Primärtumors zu analysieren, sondern die verschiedenen relevanten Tumorareale getrennt zu untersuchen und Metastasengewebe zu berücksichtigen.

5. ANHANG

5.1. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Patientenkollektiv.....	22
Tabelle 2: Patientenkollektiv, aufgegliederte Aufstellung nach Laurén-Typ.....	23
Tabelle 3: HercepTest-Score nach DAKO	29
Tabelle 4: EpCAM-Expression im Gesamtkollektiv.....	35
Tabelle 5: EpCAM-Expression im Tumorzentrum.....	38
Tabelle 6: Korrelation der EpCAM-Expression mit histopathologischen Parametern	45
Tabelle 7: EpCAM-Expression in Tumoren des mixed Typs nach Laurén.....	46
Tabelle 8: Korrelation des EpCAM-Expressionsmusters mit Lymphknotenmetastasierung	46
Tabelle 9: Ki-67-Expression im Karzinomgewebe und Lymphknotenmetastasen.....	48
Tabelle 10: Ki-67 Expression der histologischen Typen nach Laurén	49
Tabelle 11: Korrelation zwischen Ki-67-Expression und EpCAM-Expression.....	51
Tabelle 12: Korrelation zwischen Ki-67- und EpCAM-Expression.....	52
Tabelle 13: Überlebensanalyse für histopathologische Parameter.....	54

5.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: TNM-Klassifikation	3
Abbildung 2: UICC-Stadien	4
Abbildung 3: Chirurgische Therapie des Magenkarzinoms.....	8
Abbildung 4: Stanzgerät (Tissue Arrayer).....	25
Abbildung 5: A) TMA-Paraffinblock, B) HE-gefärbter TMA-Schnitt.....	26
Abbildung 6: Auswertung des Patientenkollektivs.....	32

Abbildung 7: EpCAM-Expression in Normalmukosa.....	33
Abbildung 8: EpCAM-Expression in intestinaler Metaplasie.....	33
Abbildung 9: EpCAM-Expression im Magenkarzinom.....	34
Abbildung 10: EpCAM-Expression von Tumorzentrum und Invasionsgebiet.....	36
Abbildung 11: EpCAM-Expression der Typen nach Laurén.....	37
Abbildung 12: EpCAM-Expression im Tumorzentrum.....	39
Abbildung 13: EpCAM-Expression in der Invasionsfront.....	40
Abbildung 14: Heterogenität der EpCAM-Expression.....	41
Abbildung 15: EpCAM-Expression in Lymphknotenmetastasen.....	42
Abbildung 16: EpCAM-Expression von Primärtumor und Lymphknotenmetastase.....	42
Abbildung 17: EpCAM-Expression in Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression im Primärtumor.....	43
Abbildung 18: EpCAM-Expression von verschiedenen Tumorarealen.....	44
Abbildung 19: Ki-67-Expression beim diffusen Typ nach Laurén.....	48
Abbildung 20: Verteilung der Ki-67-Expression im Gesamttumor.....	49
Abbildung 21: Korrespondierende EpCAM- und Ki-67-Expression.....	50
Abbildung 22: Korrelation von Ki-67- und EpCAM-Expression.....	51
Abbildung 23: Ki-67- und EpCAM-Expression in den Typen nach Laurén.....	52
Abbildung 24: Einfluss des UICC-Stadiums auf das Gesamtüberleben.....	53
Abbildung 25: Einfluss des EpCAM-Expressionsmusters auf das Gesamtüberleben.....	55
Abbildung 26: Prognostischer Einfluss einer stärkeren Expression in der Invasionsfront. .	56

6. LITERATURVERZEICHNIS

Literaturverzeichnis

- [1] Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends., 7.Ausgabe, Robert Koch Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) (Berlin, 2010)
- [2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics 2002, CA Cancer J Clin (2005), 55(2): 74-108
- [3] Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer, World Journal of Gastroenterology (2006), 12(3): 354-362
- [4] Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction, Br J Surg (1998), 85(11): 1457-1459
- [5] World Health Organisation Classification of Tumors – Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System, , Hamilton S.R., Aaltonen L.A.; IARC Press (Lyon, 2000)
- [6] Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology, Lancet (1975), 2(7924): 58-60
- [7] Correa P. Is gastric cancer preventable?, Gut (2004), 53(9): 1217-1219
- [8] Borrmann R. Geschwulste des Magens und Duodenums, Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie und Histologie , Henke F, Lubarsch O. (1926)
- [9] Laurén P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histoclinical classification, Acta Pathol Microbiol Scand (1965), 64(): 31-49
- [10] Laurén P. Histogenesis of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma, Scand J Gastroenterol Suppl (1991), 180(): 160-4
- [11] Schumacher IK, Hunsicker A, Youssef PS, Lorenz D. Current concepts in gastric cancer surgery, Saudi Med J (2002), 23(1): 62-8
- [12] Ott K, Lordick F, Blank S, Büchler M. Gastric cancer: surgery in 2011, Langenbecks Arch Surg (2011), 396(6): 743-58
- [13] Lordick F, Jäger D. Current Status and Future of Chemotherapy and Biochemotherapy in Gastroesophageal Cancers, Gastrointest Cancer Res (2008), 2(4): 187-197

-
- [14] Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJH, Nicolson M, Scarffe H, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ, Smith DB, Langley RE, Verma M, Weeden S and Chua YJ. Perioperative Chemotherapy versus Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Cancer, *N Eng J Med* (2006), 355(1): 11-20
- [15] Chua YJ, Cunningham D. The UK NCRI MAGIC trial of perioperative chemotherapy in resectable gastric cancer: Implications for clinical practice, *Annals of Surgical Oncology* (2007), 14(10): 2687-2690
- [16] Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, Kinoshita T, Fujii M, Nashimoto A, Furakawa H, Nakajima T, Ohashi Y, Imamura H, Higashino M, Yamamura Y, Kurita A, Arai K. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral flouropirimidine, *N Engl J Med* (2007), 357(18): 1810-20
- [17] Bang YJ, van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-esophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open label, randomized controlled trial, *Lancet* (2010), 376(9742): 687-697
- [18] Calabrese G, Crescenzi C, Morizio E, Palka G, Guerra E, Alberti S. Assignment of TACSTD₁ (alias TROP₁, M4S₁) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD₂ (alias TROP₂, M1S₁) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization, *Cytogenet Cell Genet* (2001), 92(1-2): 164-5
- [19] Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM), *J Mol Med* (1999), 77(10): 699-712
- [20] Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer, *British Journal of Cancer* (2007), 96(3): 417-423
- [21] Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, Koprowski H. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies., *Proc Natl Acad Sci USA* (1979), 76(3): 1438-1442
- [22] Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dünser M, Mikuz G. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival, *The Lancet* (2000), 356(9246): 1981-2
- [23] Fong D, Steurer M, Obrist P, Barbieri V, Margreiter R, Amberger A, Laimer K, Gastl G, Tzankov A, Spizzo G. Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance, *J Clin Pathol* (2008), 61(1): 31-35
- [24] Went P, Vasei M, Bubendorf L, Terracciano L, Tornillo L, Riede U, Kononen J, Simon R, Sauter G, Baeuerle PA. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers, *British Journal of Cancer* (2006), 94(1): 128-135
-

-
- [25] Breuhahn K, Baeuerle PA, Peters M, Prang N, Töx U, Köhne-Volland R, Dries V, Schirmacher P, Leo E. Expression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) in chronic (necro-)inflammatory liver diseases and hepatocellular carcinoma, *Hepatol Res* (2006), 34(1): 50-6
- [26] Litvinov SV, Velders MP, Bakker H, Fleuren GJ, Warnaar SO. Ep-CAM: A human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule, *The Journal of Cell Biology* (1994), 125(2): 437-446
- [27] Winter MJ, Nagelkerken B, Martens AE, Rees-Bakker HA, Briare-de Bruijn IH, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak, *Exp Cell Res* (2003), 285(1): 50-8
- [28] Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ et al. Epithelial Cell Adhesion Molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins, *The Journal of Cell Biology* (1997), 139(5): 1337-1348
- [29] Armstrong A, Eck SL. EpCAM – A new therapeutic target for an old cancer antigen, *Cancer Biology & Therapy* (2003), 2(4): 320-326
- [30] Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM, *Nature Cell Biology* (2009), 11(2): 162-171
- [31] de Boer CJ, van Krieken J, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver, *J. Pathol.* (1999), 188(2): 201-206
- [32] Wong NA, Warren BF, Piris J, Maynard N, Marshall R, Bodmer WF. EpCAM and gpA33 are markers of Barrett's metaplasia, *J Clin Pathol* (2006), 59(3): 260-263
- [33] Bollschweiler E and Holscher AH. Carcinoma of the esophagus--actual epidemiology in Germany, *Onkologie* (2001), 24(2): 180-184
- [34] Stoecklein NH, Siegmund A, Scheunemann P, Luebke AM, Erbersdobler A, Verde PE, Eisenberger CF, Peiper M, Rehders A, Esch JS, Knoefel WT, Hosch SB. Ep-CAM expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker, *BMC Cancer* (2006), 6(): 165
- [35] Linnenbach AJ, Seng B, Wu S, Robbins S, Scollon M, Pyrc J, Druck T, Huebner K.. Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes, *Molecular and cellular biology* (1993), 13(3): 1507-1515
- [36] Münz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation, *Oncogene* (2004), 23(34): 5748-5758
-

-
- [37] Litvinov SV, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, Fleuren GJ, Warnaar SO. Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation, *American Journal of Pathology* (1996), 148(3): 865-75
- [38] Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins, *The Journal of Cell Biology* (1993), 123(3): 513-522
- [39] Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67, *J Immunol* (1984), 133(4): 1710-1715
- [40] Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy, *Cancer Research* (2004), 64(16): 5818-5824
- [41] Went P, Dirnhofer S, Salvisberg T, Amin MB, Lim SD, Diener PA, Moch H. Expression of Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) in renal epithelial tumors, *Am J Surg Pathol* (2005), 29(1): 83-88
- [42] Gonsens MJEM, van Kempen LCL, van de Velde CJH, van Krieken JH, Nagtegaal ID. Loss of membranous EpCAM in budding colorectal carcinoma cells, *Modern Pathology* (2007), 20(2): 221-232
- [43] Momburg F, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, Möller P. Immunohistochemical study of the expression of Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues, *Cancer Research* (1987), 47(11): 2883-2891
- [44] Brunner A, Prelog M, Verdorfer I, Tzankov A, Mikuz G, Ensinger C. EpCAM is predominantly expressed in high grade and advanced stage urothelial carcinoma of the bladder, *J Clin Pathol* (2008), 61(3): 307-10
- [45] Varga M, Obrist P, Schneeberger S, Mühlmann G, Felgel-Farnholz C, Fong D, Zitt M, Brunnhuber T, Schäfer G, Gastl G, Spizzo G. Overexpression of Epithelial Cell Adhesion Molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival, *Clinical Cancer Research* (2004), 10(9): 3131-3136
- [46] Prince S, Zeidman A, Dekel Y, Ram E, Koren R. Expression of epithelial cell adhesion molecule in gallbladder carcinoma and its correlation with clinicopathological variables, *Am J Clin Pathol* (2008), 129(3): 424-429
- [47] Raffel A, Eisenberger CF, Cupisti K, Schott M, Baldus SE, Hoffmann I, Aydin F, Knoefel WT, Stoecklein NH. Increased EpCAM expression in malignant insulinoma: potential clinical implications, *European Journal of Endocrinology* (2010), 162(2): 391-398
-

-
- [48] Takes RP, Baatenborg de Jong RJ, Wijffels K, Schuurin E, Litvinov SV, Hermans J, van Krieken HJM. Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer, *J Pathol* (2001), 194(3): 298-302
- [49] Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G and Dirnhofer S. Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas, *Human Pathology* (2004), 35(1): 122-128
- [50] Martin IG, Cutts SG, Birbeck K, Gray S, Quirke P. Expression of the 17-1A antigen in gastric and gastro-oesophageal junction adenocarcinomas: a potential immunotherapeutic target?, *J Clin Pathol* (1999), 52(9): 701-704
- [51] Songun I, Litvinov SV, van de Velde CJ, Pals ST, Hermans J, van Krieken JH. Loss of Ep-CAM (CO17-1A) expression predicts survival in patients with gastric cancer, *British Journal of Cancer* (2005), 92(9): 1767-1772
- [52] Deveci MS and Deveci G. Prognostic value of p53 protein and MK-1 (a tumor-associated antigen) expression in gastric carcinoma, *Gastric Cancer* (2007), 10(2): 112-116
- [53] Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Simon R, Spichtin H, Maurer R, Metzger U, von Castelberg B, Bart R, Stopatschinskaya S, Köchli OR, Haas P, Mross F, Zuber M, Dietrich H, Bischoff S, Mirlacher M, Sauter G, Gastl G. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer, *Breast Cancer Research and Treatment* (2004), 86(3): 207-213
- [54] Spizzo G, Obrist P, Ensinger C, Theur I, Dünser M, Ramoni A, Gunsilius E, Eibl G, Mikuz G, Gastl G. Prognostic significance of EpCAM and Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer, *Int J Cancer* (2002), 98(6): 883-888
- [55] Spizzo G, Gastl G, Wolf D, Gunsilius E, Steurer M, Fong D, Amberger A, Margreiter R, Obrist P. Correlation of COX-2 and EpCAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival, *British Journal of Cancer* (2003), 88(4): 574-578
- [56] Seligson D, Pantuck A, Liu X, Huang Y, Horvath S, Bui M, Han K, Correa A, Eeva M, Tze S, Belldegrun A, Figlin R. Epithelial Cell Adhesion Molecule (KSA) Expression: Pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma, *Clinical Cancer Research* (2004), 10(8): 2659-2669
- [57] Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MHT, Yu H, Shi T, Figlin RA, Horvath S, Belldegrun AS. Using protein expressions to predict survival in clear renal cell carcinoma, *Clinical Cancer Research* (2004), 10(16): 5464-5471
- [58] Kim KJ, Herlyn D, Wong KK, Park DC, Schorge JO, Lu KH, Skates SJ, Cramer DW, Berkowitz RS, Mok SC. Identification of epithelial cell adhesion molecule autoantibody in patients with ovarian cancer, *Clin Cancer Res* (2003), 9(13): 4782-91

-
- [59] Laimer K, Fong D, Gastl G, Obrist P, Kloss F, Tuli T, Gassner R, Rasse M, Norer B, Spizzo G. EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity: frequency and relationship to clinicopathological features, *Oral Oncology* (2008), 44(1): 72-77
- [60] Ensinger C, Kremser R, Promegger R, Spizzo G, Schmid KW. EpCAM overexpression in thyroid carcinomas - A histopathological study of 121 cases, *J Immunother* (2006), 29(5): 569-573
- [61] Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Gatreux V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer, *The New England Journal of Medicine* (2005), 353(16): 1659-72
- [62] Riethmüller G, Schneider-Gädick E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Höffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmayr R. Randomized trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group, *Lancet* (1994), 343(8907): 1177-1183
- [63] Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Höffken K, Gruber R, Funke I, Pichlmaier H, Hirche H, Buggisch P, Witte J and Pichlmayr R. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial, *Journal of Clinical Oncology* (1998), 16(5): 1788-1794
- [64] Punt CJ, Nagy A, Douillard JY, Figer A, Skovsgaard T, Monson J, Barone C, Fountzilas G, Riess H, Moylan E, Jones D, Dethling J, Colman J, Coward L, MacGregor S. Edrecolomab (17-1A-antibody) alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomized study, *The Lancet* (2002), 360(9334): 671-677
- [65] Naundorf S, Preithner S, Mayer P, Lippold S, Wolf A, Hanakam F, Fichtner I, Kufer P, Raum T, Riehtmüller G, Baeuerle PA, Dreier T. In vitro and in vivo activity of MT201, a fully human monoclonal antibody for pancarcinoma treatment, *Int J Cancer* (2002), 100(1): 101-110
- [66] Richter CE, Cocco E, Bellone S, Bellone M, Casagrande F, Todeschini P, Rüttinger D, Silasi DA, Azodi M, Schwartz PE, Rutherford TJ, Pecorelli S, Santin AD. Primary cervical carcinoma cell lines overexpress epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and are high sensitive to immunotherapy with MT201, a fully human monoclonal anti-EpCAM antibody, *International Journal of Gynecological Cancer* (2010), 20(9): 1440-1447
- [67] Prang N, Preithner S, Brischwein K, Göster P, Wöppel A, Müller J, Steiger C, Peters M, Baeuerle PA, da Silva AJ. Cellular and complement-dependent cytotoxicity of EpCAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines, *British Journal of Cancer* (2005), 92(2): 342-349
-

-
- [68] Xiang W, Wimberger P, Dreier T, Diebold J, Mayr D, Baeuerle PA, Kimmig R. Cytotoxic activity of novel human monoclonal antibody MT201 against primary ovarian tumor cells, *J Cancer Res Clin Oncol* (2003), 129(6): 341-348
- [69] Richter CE, Cocco E, Bellone S, Silasi DA, Rüttinger D, Azodi M, Schwartz PE, Rutherford TJ, Pecorelli S, Santin AD. High-grade, chemotherapy-resistant ovarian carcinomas overexpress epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) and are highly sensitive to immunotherapy with MT201, a fully human monoclonal anti-EpCAM antibody, *Am J Obstet Gynecol* (2010), 203(6): 582.e1-7
- [70] Münz M, Murr A, Kvesic M, Rau D, Mangold S, Pflanz S, Lumsden J, Volkland J, Fagerberg J, Riethmüller G, Rüttinger D, Kufer P, Baeuerle PA, Raum T. Side-by-side analysis of five clinically tested anti-EpCAM monoclonal antibodies, *Cancer Cell International* (2010), 10(): 44
- [71] Oberneder R, Weckermann D, Ebner B, Quadl C, Kirchinger P, Raum T, Locher M, Prang N, Baeuerle PA, Leo E. A phase I study with adecatumumab, a human antibody directed against epithelial cell adhesion molecule, in hormone refractory prostate cancer patients, *European Journal of Cancer* (2006), 42(15): 2530-2538
- [72] Marschner N, Rüttinger D, Zugmaier G, Nemere G, Lehmann J, Obrist P, Baeuerle PA, Wolf A, Schmidt M, Abrahamsson PA, Reinhardt C, Heidenreich A. Phase II study of the human anti-epithelial cell adhesion molecule antibody adecatumumab in prostate cancer patients with increasing serum levels of prostate-specific antigen after radical prostatectomy, *Urol Int* (2010), 85(4): 386-95
- [73] Schmidt M, Scheulen ME, Dittrich C, Obrist P, Marschner N, Dirix L, Schmidt M, Rüttinger D, Schuler M, Reinhardt C, Awada A. An open-label, randomized phase II study of adecatumumab, a fully human anti-EpCAM antibody, as monotherapy in patients with metastatic breast cancer, *Ann Oncol* (2010), 21(2): 275-82
- [74] Heiss MM, Ströhlein MA, Jäger M, Kimmig R, Burges A, Schoberth A, Jauch KW, Schildberg FW, Lindhofer H. Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies, *Int J Cancer* (2005), 117(3): 435-443
- [75] Ströhlein MA, Siegel R, Jäger M, Lindhofer H, Jauch KW, Heiss MM. Induction of anti-tumor immunity by trifunctional antibodies in patients with peritoneal carcinomatosis, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2009), 28(): 18
- [76] Burges A, Wimberger P, Kümper C, Gorbounova V, Sommer H, Schmalfeldt B, Pfisterer J, Lichinitser M, Makhson A, Moiseyenko V, Lahr A, Schulze E, Jäger M, Ströhlein MA, Heiss MM, Gottwald T, Lindhofer H, Kimmig R. Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3-antibody: a phase I/II study, *Clin Cancer Res* (2007), 13(13): 3899-3905
- [77] Ruf P, Gires O, Jäger M, Fellingner K, Atz J, Lindhofer H. Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer, *British Journal of Cancer* (2007), 97(3): 315-321
-

-
- [78] Heiss MM, Murawa P, Koralewski P, Kutarska E, Kolesnik OO, Ivanchenko VV, Dudnichenko AS, Aleknaviciene B, Razbadauskas A, Gore M, Ganea-Motan E, Ciuleanu T, Wimberger P, Schmittel A, Schmalfeldt B, Burges A, Bokemeyer C, Lindhofer H, Lahr A, Parsons SL. The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: results of a prospective randomized phase II/III trial, *Int J Cancer* (2010), 127(9): 2209-2221
 - [79] Du W, Ji H, Cao S, Wang L, Bai F, Liu J, Fan D. EpCAM: A potential antimetastatic target for gastric cancer, *Dig Dis Sci* (2010), 55(8): 2165-2171
 - [80] Wenqi D, Li W, Shanshan C, Bei C, Yafei Z, Feihu B, Jie L, Daiming F. EpCAM is overexpressed in gastric cancer and its downregulation suppresses proliferation of gastric cancer, *J Cancer Res Clin Oncology* (2009), 135(9): 1277-1285
 - [81] Scheunemann P, Stoecklein NH, Hermann K, Rehders A, Eisenberger CF, Knoefel WT, Hosch SB. Occult disseminated tumor cells in lymph nodes of patients with gastric carcinoma. A critical appraisal of assessment and relevance, *Langenbecks Arch Surg* (2009), 394(1): 105-113
 - [82] Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G and Dirnhofer S. Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas, *Human Pathology* (2004), 35(1): 122-128
 - [83] Heideman DA, Snijders PJ, Craanen ME, Bloemena E, Meijer CJ, Meuwissen SG, van Beusechem VW, Pinedo HM, Curiel DT, Haisma HJ, Gerritsen WR. Selective gene delivery toward gastric and esophageal adenocarcinoma cells via EpCAM-targeted adenoviral vectors, *Cancer Gene Therapy* (2001), 8(5): 342-351
 - [84] Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing, *Lab Invest* (1986), 55(2): 244-248
 - [85] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of hundreds of specimens, *Nature Med* (1998), 4(7): 844-847
 - [86] Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of Tissue Microarrays: Progress in the Discovery and Validation of Cancer Biomarkers, *Journal of Clinical Oncology* (2008), 26(34): 5630-5637
 - [87] Bubendorf L, Nocito A, Moch H and Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies, *J Pathol* (2001), 195(1): 72-79
 - [88] Packeisen J, Buerger H, Krech R, Boecker W. Tissue microarrays: a new approach for quality control in immunochemistry, *J Clin Pathol* (2002), 55(8): 613-615
 - [89] Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified... Tissue microarray technology, *J Clin Pathol: Mol Pathol* (2003), 56(4): 198-204
-

-
- [90] Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints, *Am J Pathol* (2001), 159(6): 2249-56
 - [91] Bratthauer GL. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods., *Methods Mol Biol.* (2010), 588(): 257-70
 - [92] DAKO A/S, Hoffmann-La Roche F. HercepTest™ Interpretation Manual - Gastric Cancer.
http://www.dako.com/de/29018_05may10_herceptest_interpretation_manual_gastric_cancer.pdf - letzter Zugriff 02.11.2014
 - [93] Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer, *J Clin Oncol* (2007), 25(1): 118-145
 - [94] Kroepil F, Dulian A, Vallböhmer D, Geddert H, Krieg A, Vay C, Topp SA, Schulte am Esch J, Baldus SE, Gires O, Knoefel WT, Stoecklein NH. High EpCAM expression is linked to proliferation and lauren classification in gastric cancer, *BMC Research Notes* (2013), 253(6):
 - [95] Rajkumar T, Vijayalakshmi N, Gopal G, Sabitha K, Shirley S, Raja UM, Ramakrishnan SA. Identification and validation of genes involved in gastric tumorigenesis, *Cancer Cell International* (2010), 10(45):
 - [96] Calli Demirkan N, Tuncyürek M, Ugur Ertan E, Bülent Alkanat M, Icöz G . Correlation of histological classifications of gastric carcinomas with location and prognosis, *Gastroenterol Clin Biol* (2002), 26(6-7): 610-5
 - [97] Lindenlauf N, Vay C, Topp SA, Eisenberger CF, Baldus SE, Hölscher AH, Knoefel WT, Stoecklein NH. Down-regulation of EpCAM correlates with an unfavorable Prognosis in the Metaplasia-Carcinoma-Sequence of Barrett's Carcinoma, *Chirurgisches Forum und DGAV Forum 2009* Forumband 38, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie (2009)
 - [98] Warneke VS, Behrens HM, Haag J, Krüger S, Simon E, Mathiak M, Ebert MP, Röcken C. Members of the EpCAM signalling pathway are expressed in gastric cancer tissue and are correlated with patient prognosis, *British Journal of Cancer* (2013), 109(8): 2217-27
 - [99] Tanner M, Hollmén M, Junttila TT, Kapanen AI, Tammola S, Soini Y, Helin H, Salo J, Joensuu H, Sihvo E, Elenius K, Isola J. Amplification of HER-S in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIa gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab, *Annals of Oncology* (2005), 16(2): 273-278
 - [100] Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice, *Modern Pathology* (2012), 10(25): 1315-25
-

-
- [101] Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma, *Histopathology* (2007), 1(50): 151-62
- [102] Gires O, Stoecklein NH. Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences, *Cell Mol Life Sci* (2014), 22(71): 4393-4402
- [103] Lazar D, Taban S, Sporea I, Dema A, Cornianu M, Lazar E, Goldis A, Vernic C. Ki-67 expression in gastric cancer. Results from a prospective study with long-term follow-up, *Romanian Journal of Morphology and Embryology* (2010), 51(4): 655-661
- [104] Forones NM, Carvalho AP, Giannotti-Filho O, Lourenço LG, Oshima CT. Cell proliferation and apoptosis in gastric cancer and intestinal metaplasia, *Arq Gastroenterol* (2005), 42(1): 30-34
- [105] Zheng Y, Wang L, Zhang JP, Yang JY, Zhao ZM, Zhang XY. Expression of p53, c-erbB-2 and Ki67 in intestinal metaplasia and gastric carcinoma, *World J Gastroenterol* (2010), 16(3): 339-344
- [106] Driemel C, Kremling H, Schumacher S, Will D, Wolters J, Lindenlauf N, Mack B, Baldus SA, Hoya V, Pietsch JM, Panagiotidou P, Raba K, Vay C, Vallböhmer D, Harréus U, Knoefel WT, Stoecklein NH, Gires O. Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer, *Oncogene* (2014), 41(33): 4904-15
- [107] Jäger M, Schoberth A, Ruf P, Hess J, Hennig M, Schmalfeldt B, Wimberger P, Stroehlein M, Theissen B, Heiss MM, Lindhofer H. Immunomonitoring results of a phase II/III study of malignant ascites patients treated with the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3), *Cancer Res* (2012), 1(72): 24-32

Danksagung

Zu allererst danke ich Herrn Professor Dr. med. W. T. Knoefel, dass ich meine Dissertation in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie durchführen konnte.

Herrn Professor Dr. med. Nikolas Stoecklein danke ich für die Überlassung des Themas und für die hervorragende Betreuung dieser Doktorarbeit. Frau Dr. med. Feride Kroepil danke ich für Ihre unermüdliche Geduld und Hartnäckigkeit, mich stets zu motivieren. In etlichen Gesprächen und Diskussionen wurde diese Arbeit erst zu dem gemacht, was sie heute ist.

Besonderer Dank gilt auch dem Team des Chirurgischen Forschungslabors, hier insbesondere Imke Hoffmann, Anna-Carina Vaerst und Sarah Schumacher. Sie standen mir bei den Laborarbeiten und technischen Fragen im gesamten Verlauf dieser Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite.

Frau PD Dr. med. Helene Geddert danke ich für die Zusammenarbeit und Hilfe bei der Auswahl der geeigneten Präparate und Stanzbezirke für die Tumor- und Gewebeproben. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Stephan Baldus für pathologische Mitbeurteilung der durchgeführten Proben und seine Geduld und Hilfe bei späteren Nachfragen.

Frau Alexandra Brandt danke ich für Ihre hervorragende Arbeit als Tumordokumentationsassistentin, die Follow-up Daten der Patienten stets auf dem aktuellen Stand zu halten.

Besonders danken möchte ich vor allem meiner Familie, hier insbesondere meinem Vater, der immer, teils ermahnend, mich stets motiviert hat und Mut zugesprochen hat.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.
