Aus der Klinik für Allgemein, Viszeral- und Kinderchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

Untersuchung möglicher immunologischer Zielstrukturen für eine adjuvante Therapie des operablen Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

> Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> > VORGELEGT VON

Annika Siegmund

2008

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

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

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Christopher Poremba

Inhaltsverzeichnis

Inhal	tsverzeichnis1
1	Einleitung3
1.1	Das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus3
1.1.1	Epidemiologie
1.1.2	Ätiologie
1.1.3	Pathologie, Typisierung und Stadieneinteilung
1.1.4	Prognose
1.1.5	Therapiekonzepte6
1.2	Das epitheliale Zell-Adhäsionsmolekül (Ep-CAM)
1.2.1	Nomenklatur und Biologie
1.2.2	Prognosefaktor
1.2.3	Antikörpertherapie9
1.3	Der epidermaleWachstumsfaktorrezeptor p185 _{HER-2} 10
1.3.1	Nomenklatur
1.3.2	Funktion
1.3.3	$Zusammenhang \ von \ Protein \ddot{u} berexpression \ und \ Genamplifikation \ in \ verschieden en \ Geweben11$
1.3.4	Prognosefaktor
1.3.5	Antikörpertherapie 12
1.4	Aufgabenstellung und Zielsetzung 12
2	Material und Methoden 14
2.1	Material14
2.1.1	Tumorproben14
2.1.2	Positivkontrollen14
2.2	Methoden 15
2.2.1	Zellkultur 15
2.2.2	Anfertigung der Schnittpräparate17
2.2.3	Immunhistochemie
2.2.3.1	Grundlagen17
2.2.3.2	Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase-Technik (APAAP)
2.2.3.3	Der HercepTest™19
2.2.4	In-Situ-Hybridisierung
2.2.4.1	Grundlagen
2.2.4.2	P Chromogene in-situ-Hybridisierung (CISH) an Paraffinschnitten
2.2.5	Statistik

INHALT

3	Ergebnisse
3.1	Ergebnisse der Zellkultur (Vorversuch)
3.2	Ergebnisse der Immunhistochemie
3.2.1	Ep-CAM-Expression in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen
3.2.2	p185 _{HER-2} -Expression in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen
3.3	Prognostischer Einfluß
3.3.1	Prognostischer Einfluß der Ep-CAM- und p185 _{HER-2} -Expression32
3.3.2	Prognostischer Einfluß der Koexpression von Ep-CAM und p185 _{HER-2}
3.3.3	Prognostischer Einfluß histopathologischer Parameter33
3.4	Ergebnisse der Chromogenen-In-Situ-Hybridisierung (CISH)
4	Diskussion
4.1	Ep-CAM als immunologische Zielstruktur
4.1.1	Auswertung analog der Kriterien des HercepTest [™] 37
4.1.2	Eigene Ergebnisse im Literaturkontext
4.1.3	Ep-CAM-Expression und Tumorverhalten
4.2	p185 _{HER-2} als immunologische Zielstruktur
4.2.1	Der HercepTest™ auf cryokonserviertem Material41
4.2.2.	Eigene Ergebnisse im Literaturkontext42
4.3	Koexpression von Ep-CAM und p185 _{HER-2}
4.4	Ausblick
5	Anhang46
5.1	Materialien, Puffer, Lösungen, Geräte und Software
5.1.1	Materialien
5.1.2	Puffer und Lösungen
5.1.3	Geräte und Software
5.2	Tabellen
5.3	Abkürzungsverzeichnis
5.4	Tabellenverzeichnis
5.5	Abbildungsverzeichnis
6	Literaturverzeichnis
7	Danksagung60
8	Lebenslauf61
9	Zusammenfassung62

1 Einleitung

1.1 Das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland erkranken jährlich etwa 3.370 Männer und 880 Frauen an Speiseröhrenkrebs (*AG Bevölkerungsbezogener Krebsregister 2004*). Gemessen an der Gesamtheit bösartiger Neubildungen entspricht das einem Anteil von knapp zwei Prozent bei den Männern und etwa einem halben Prozent bei den Frauen. Der Anteil an den Krebstodesfällen liegt dabei mit drei Prozent bei den Männer bzw. einem Prozent bei den Frauen höher, in der "Rangliste" der Krebssterbefälle lag das Ösophaguskarzinom im Jahr 2000 bei den Männern an 10. und bei den Frauen an 15. Stelle.

Im europäischen Vergleich nimmt das Ösophaguskarzinom mit Inzidenzen von 7,3:100.000 bei der männlichen und 1,4:100.000 bei der weiblichen Bevölkerung eine Mittelstellung zwischen Frankreich (Inzidenz im Raum Calvados 26,5:100.000 Einwohner) und Griechenland (Inzidenz etwa 2:100.000 Einwohner) ein. Die weltweit höchste Inzidenz findet sich in China mit einer jährlichen Rate von 135,2 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner (*Ribeiro et al. 1996*).

Ebenso wie die Inzidenzen schwanken auch die Anteile der einzelnen Tumorentitäten: während die Zahl der Adenokarzinome besonders in den Vereinigten Staaten in den letzten Jahren exponentiell zugenommen hat und mittlerweile 60% aller Speiseröhrentumoren beträgt *(Enzinger et al. 2003)*, beziffern Bareiß und Mitarbeiter *(2002)* den Anteil der Plattenepithelkarzinome für Deutschland auf über 80%.

1.1.2 Ätiologie

Nikotin- und Alkoholmißbrauch sind die Hauptrisikofaktoren zur Entstehung ösophagealer Plattenepithelkarzinome in der westlichen Welt; laut Vaughan und Mitarbeitern (1995) sind 87% der Tumoren auf den Abusus dieser Substanzen zurückzuführen. In zahlreichen Studien konnte hierbei ein dosisabhängig erhöhtes Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden, das für Männer mit einem Alkoholkonsum von 120 g und mehr als 20 Zigaretten täglich auf das 100fache ansteigt.

Ätiologisch bedeutsam ist auch der Verzehr nitrosaminhaltiger Nahrungsmittel; diskutiert, aber durch Studien bisher unzureichend belegt, werden außerdem Mangelernährung bzw. Vitaminmangel, eine erhöhte Aufnahme von tierischen Fetten, der Genuß sehr heißer Getränke und stark gewürzter Speisen, berufliche Belastung durch Asbest und Gifte in der Gummiindustrie sowie verschiedene Virus- und Pilzinfektionen (*Bareiß et al. 2002, Bollschweiler et al. 2001, Messmann et al. 2001)*.

Neben diesen sogenannten exogenen Faktoren fällt die Assoziation mit verschiedenen endogenen Erkrankungen auf. So erkranken 10% der am Plummer-Vinson Syndrom leidenden Patienten und 2-20% der an Achalasie Erkrankten an einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Auch für Zöliakie, Sklerodermie und in seltenen Fällen bei Zenker'schen Divertikeln ist ein erhöhtes Risiko beschrieben. Nachgewiesen ist eine genetisch bedingte Tumorentstehung darüberhinaus für die Tylosis, eine seltene, autosomal dominant vererbte Hyperkeratose der Hände und Füße. Träger des auf dem Chromosom 17q25 lokalisierten Gens (*Risk et al. 1994*) erkranken bis zum 65. Lebensjahr mit einer Wahrscheinlichkeit von

3

95% an Speiseröhrenkrebs. Ein erhöhtes Risiko besteht außerdem nach Strahlentherapie des Halses oder des Thorax.

1.1.3 Pathologie, Typisierung und Stadieneinteilung

1.1.3.1 Pathologie

Das Ösophaguskarzinom läßt sich histologisch in erster Linie in Plattenepithel- und Adenokarzinome unterteilen, wobei die prozentualen Anteile einer starken geographischen Variation unterliegen. Im europäischen Mittel sind etwa 50-60% Plattenepithelkarzinome und 40-50% Adenokarzinome. Weniger als 5% sind anaplastische bzw. kleinzellige Karzinome, Zylindrome, Karzinoide oder Leiomyosarkome. Die Differenzierung ösophagealer Plattenepithelkarzinome reicht von hoch differenzierten Tumoren mit Verhornung und niedrigem Proliferationsindex (G1) bis hin zu gering differenzierten Tumoren mit ausgeprägter Kernpolymorphie und hoher Mitoseaktivität (G3) (*Stahl und Witte 2003, Zimmermann et al. 2006).* Neben den typischen Ösophagus-Plattenepithelkarzinomen gibt es noch drei seltene Varianten: Spindelzellkarzinome, verukköse und basaloide Plattenepithelkarzinome.

1.1.3.2 Typisierung

Nach der Lokalisation gegliedert entfallen 5-10% auf den zervikalen Ösophagus, 30-35% auf den (supra)bifurkalen Abschnitt und 50-60% auf den infrabifurkalen Teil des Ösophagus. Plattenepithelkarzinome treten dabei meist in den oberen zwei Dritteln, Adenokarzinome am ösophagogastralen Übergang auf.

Lokal fortgeschrittene Tumoren lassen sich in Abhängigkeit von ihrem Wachstum in die folgenden drei Grundtypen unterteilen: polypöses, ulzeröses und infiltratives Karzinom. Entsprechend der Vorgaben der *Japanese Society for Esophageal Diseases* werden bei auf Mukosa oder Submukosa beschränkten Tumoren in Anlehnung an das Magenfrühkarzinom flache, exophytisch oder exkaviert wachsende Karzinome unterschieden. Diese Bedeutung ist hinsichtlich der Therapieplanung relevant, da die beiden letztgenannten Typen für eine endoskopische Mukosaresektion aufgrund ihres Wachstums zumeist nicht in Betracht kommen.

1.1.3.3 Stadieneinteilung

Die direkte Ausbreitung des Karzinoms erfolgt nach den Wandschichten des Ösophagus in die umliegenden Organe und Gewebe. Metastasen finden sich am häufigsten in den regionären Lymphknoten, das Risiko steigt dabei von 5% für auf die Mukosa beschränkte Tumoren auf bis zu 80% bei die Umgebung infiltrierenden Karzinomen. Fernmetastasen finden sich zumeist in Lunge und Leber. Die intraösophageale Metastasierung entlang submuköser Lymphgefäße stellt außerdem eine besondere Form der Tumorausbreitung dar. Anhand der TNM-Klassifikation läßt sich das Ösophaguskarzinom wie alle bösartigen Neubildungen in vier UICC-Stadien einteilen:

Т	Primärtumor (infiltriert)
T1	Lamina propria (mucosae) und/oder Submukosa
T2	Muscularis propria
T3	Adventitia
T4	Nachbarstrukturen
N	Lymphknoten
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
М	Fernmetastasen
	Für Tumoren des oberen Ösophagusdrittels :
M1a	zervikale Lymphknoten
M1b	andere Fernmetastasen
	Für Tumoren des mittleren Ösophagusdrittels :
M1a	nicht anwendbar
M1b	andere Fernmetastasen
	Für Tumoren des unteren Ösophagusdrittels :
M1a	zöliakale Lymphknoten
M1b	andere Fernmetastasen

UICC-Stadium

Ι	T1	No	Мо
IIA	T2, T3	No	Мо
IIB	T1,T2	N1	Мо
III	T3	N1	Мо
	T4	jedes N	Мо
IV	jedes T	jedes N	M1
IVA	jedes T	jedes N	M1a
IVB	jedes T	jedes N	M1b

Da der Speiseröhrenkrebs in der Regel keine Frühsymptome verursacht (Schluckbeschwerden treten zum Beispiel erst bei einer über 50%-igen Lumeneinengung auf) und sich der Tumor aufgrund anatomischer Gegebenheiten (Fehlen einer Serosa) rasch ausbreitet, erfolgt die Diagnosestellung meist erst in einem bereits fortgeschrittenen Stadium. Die prozentualen Anteile betragen dabei je nach Stadium (*Bareiß et al. 2002*):

Ι	9%
II	16 %
III	34 %
IV	41 %

1.1.4 Prognose

Die Prognose ist eng mit dem Tumorstadium korreliert. In allen internationalen Tumorregistern spiegelt das prozentuale 5-Jahres-Überleben größenordnungsmäßig den Prozentsatz an Frühkarzinomen (UICC I) im jeweiligen Register wider (*Bareiß et al. 2002*). Die 5-Jahres-Überlebensraten nach Resektion betragen dabei den Stadien entsprechend (*Enzinger et al. 2003*):

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

Für Patienten im Stadium IV liegt das mediane Überleben bei 6 Monaten. Die Überlebensraten von Patienten mit Ösophaguskarzinom gehören somit zu den ungünstigsten aller Krebserkrankungen. Adenokarzinome weisen dabei gegenüber Plattenepithelkarzinomen eine bessere Langzeitprognose auf *(Siewert et al. 2001).*

Abgesehen vom Tumorstadium konnten der histologische Nachweis von Blutgefäßinvasion und eine bestehende Lymphangiosis carcinomatosa als relevante prognostische Faktoren charakterisiert werden. Auch molekulare Marker wie Wachstumsfaktoren und -rezeptoren, Regulatoren von Zellzyklus und Apoptose sowie Zelladhäsionsmoleküle sind Gegenstand der aktuellen Forschung, haben aber bislang keine Relevanz für die klinische Praxis.

Bollschweiler und Mitarbeiter (2001) weisen in diesem Zusammenhang auf die in die Prognoseforschung bisher nur unzulänglich miteinbezogene hohe Zahl schwerer Begleiterkrankungen bei Patienten mit Speiseröhrenkrebs hin (in erster Linie kardiovaskuläre und chronische Lungenerkrankungen). Auch metachrone oder synchrone Primärtumoren der Atemwege oder des Verdauungstrakts, die bei etwa 10% der Patienten auftreten, sind während des Stagings und der Nachsorgeuntersuchungen zu berücksichtigen.

1.1.5 Therapiekonzepte

Das Ösophaguskarzinom gehört zu den aggressivsten Tumorentitäten. Beinahe 90% aller Patienten sterben innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung. Demgegenüber stehen 5-Jahresüberlebensraten von 90% im Stadium I durch chirurgische Therapie. Nutzen und Risiko der zahlreichen differenzierten Behandlungskonzepte wurden in Meta-Analysen von den Arbeitsgruppen um Koshy (2004) und Malthaner (2004) kritisch untersucht, eine wirksame adjuvante Systemtherapie existiert bislang nicht. Die im Folgenden erläuterten Therapiemaßnahmen finden sich in den Übersichtsarbeiten von Enzinger (2003) und Zimmermann (2006).

1.1.5.1 Chirurgische Therapiemaßnahmen

Mittels radikaler En-bloc-Resektion des Ösophagus und systematischer (ggf. auch 2-Feld-) Lymphknotendissektion können im Stadium I und IIa 5-Jahresüberlebensraten von bis zu 90% erzielt werden, zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weisen allerdings mehr als 80% der Patienten fortgeschrittenere Tumorstadien auf, so daß die Überlebensraten nach alleiniger Resektion auf 20-40% (Stadium IIb und III) bzw. weniger als 10% (Stadium IV) sinken. Zur Resektion stehen dabei verschiedene Standardverfahren zur Verfügung. Bei lokalisiertem Tumor kann eine segmentale Resektion unter Erhalt der restlichen Speiseröhre durchgeführt werden, der Defekt wird dabei durch eine Transplantation eines isolierten Jejunalsegmentes überbrückt.

Meta-Analysen kontrollierter Studien (unter Ausschluß zervikaler Ösophaguskarzinome) haben gezeigt, daß neoadjuvante und adjuvante Therapien der alleinigen Resektion in Bezug auf die Überlebensraten nicht überlegen sind, für resektable Tumoren bleibt die isolierte Ösophagektomie daher die Therapie der Wahl *(Malthaner et al. 2004).* Zu erwähnen bleibt, daß neben dem exakten Staging insbesondere die Risikostratifizierung der Patienten unter Berücksichtigung der pulmonalen, hepatischen und kardialen Funktion notwendige Voraussetzung einer erfolgreichen Chirurgie ist.

1.1.5.2 Strahlentherapie

Prinzipiell sind ösophageale Plattenepithelkarzinome strahlensensibel. Bei aufgrund schwerer Begleiterkrankungen nicht operablen Patienten lassen sich mit entsprechenden Strahlendosen (kumulativ 50-60 Gy) nach Angaben von Zimmermann und Mitarbeitern (2006) Remissionsraten von etwa 80% erzielen; eine dauerhafte Tumorkontrolle ist bei 2-Jahres-Überlebensraten von 4-27% und 5-Jahres-Überleben von maximal 20% derzeit allerdings noch nicht möglich.

1.1.5.3 Chemotherapie

Die Wirksamkeit der Chemotherapie beim metastasierten Ösophaguskarzinom wurde in zahlreichen Studien untersucht. Bei Monotherapie betrugen die medianen Überlebenszeiten 7 Monate; durch Polychemotherapie mit Cisplatin/Bleomycin- oder Cisplatin/5-FU-haltigen Regimen konnten bei auf die Therapie ansprechenden Patienten deutlich längere Überlebenszeiten (bis zu 15 Monate) erzielt werden. Im Vergleich dazu betragen die Überlebenszeiten von Patienten im fortgeschrittenen Stadium bei alleiniger Supportivtherapie etwa 6 Monate. Genannte Daten beziehen sich wohlgemerkt auf fortgeschrittene Tumorstadien; präoperative sowie adjuvante Chemotherapien werden zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur im Rahmen kontrollierter Studien empfohlen, da ein möglicher Benefit weiter kontrovers diskutiert wird und bisher nicht sicher nachgewiesen werden konnte (*Greer et al. 2005, Malthaner et al. 2004* sowie *Urschel et al. 2002* und *2003*).

1.1.5.4 Kombinationsschemata

Für hoch sitzende Tumoren (zervikal oder hoch intrathorakal) ist die Kombination aus Chemotherapie und Radiatio der Chirurgie prognostisch gleichwertig; sie sollte in diesen Fällen aufgrund der besseren Lebensqualität (Erhalt des Larynx) der Operation vorgezogen werden (*Stahl und Witte 2003*). Die Arbeitsgruppen von Koshy (2004) und Patel (2004) beschrieben auch für fortgeschrittene Karzinome 5-Jahres-Überlebensraten von 20%, sofern eine simultane Radiochemotherapie in optimaler Dosis unter gleichzeitiger Supportivtherapie eingesetzt wurde.

Nutzen und Risiko neoadjuvanter Chemostrahlentherapie sind Gegenstand derzeitiger Studien. Auch die im Individualfall häufig erörterte Frage einer zusätzlichen Radiochemotherapie bei R1-resezierten Tumoren ist derzeit in Ermangelung fehlender klinischer Daten nicht zu beantworten (*Malthaner et al. 2004*).

1.1.5.5 Wachstumsfaktoren/Zytokine

Es gibt derzeit keine Hinweise auf eine zytotoxische Aktivität von Zytokinen (Interferon, Interleukine, Tumornekrosefaktor) beim Speiseröhrenkrebs. Auch die Anwendung von Interferon- α in Kombination mit 13-cis-Retinoiden scheint im Gegensatz zu positiven Berichten bei anderen Plattenepithelkarzinomen beim Ösophaguskarzinom nicht wirksam zu sein (*Kok et al. 1997*).

Zusammenfassend läßt sich konstatieren, daß – abgesehen von weit proximal gelegenen Tumoren – eine kurative Therapie des Ösophaguskarzinoms derzeit nur mit chirurgischen Maßnahmen zu erreichen ist. Die 5-Jahres-Überlebensraten Ro-resezierter Plattenepithelkarzinome für Patienten mit einem Frühkarzinom (Stadium I) liegen mittlerweile bei bis zu 90% (*Lerut et al. 2001*); die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Männer jedoch bei 11% und für Frauen bei 8% (*AG Bevölkerungsbezogener Krebsregister 2004*). Anzumerken ist außerdem, daß bei Behandlung in palliativer Intention Chemotherapie oder palliative Lokalmaßnahmen (endoskopische Tubus- bzw. Stentimplantation, Lasertherapie, intraluminale Bestrahlung mit oder ohne Bougierung) der nur kurzzeitig symptomatisch helfenden Chirurgie vorzuziehen sind (*Stahl et al. 2004*).

1.2 Das epitheliale Zell-Adhäsionsmolekül (Ep-CAM)

1.2.1 Nomenklatur und Biologie

Das epitheliale Zell-Adhäsionsmolekül (*Epithelial-cellular adhesion molecule*) Ep-CAM (CD326, 17-1A, GA733-2, EGP 40) ist ein transmembranes 40 kD Glykoprotein (*Göttlinger et al. 1986, Simon et al. 1990*), welches sich an der basolateralen Membran der meisten gesunden glandulären Epithelien und Übergangsepithelien befindet. Im normalen Plattenepithel (ebenso wie in mesenchymalem, muskulärem und neuroendokrinen Gewebe) läßt sich das Protein hingegen nicht nachweisen (*Balzar et al. 1999, Latza et al. 1990*).

De Boer (1999) beschrieb eine Ep-CAM-Expression bei embryonalem und in Regeneration befindlichem Lebergewebe, wohingegen gesundes Lebergewebe bis auf die Gallengangsepithelien Ep-CAM-negativ ist. Anderson und Mitarbeiter (1999) beobachteten eine Ep-CAM-Expression bei Zellinien der Keimbahn und in embryonalen Stammzellen von Mäusen.

Ep-CAM wirkt Ca²⁺-unabhängig als homophiles Zell-Zell-Adhäsionsmolekül (daher die Namensgebung durch Litvinov und Mitarbeiter (1994)), gehört jedoch nicht zu einer der vier Hauptgruppen der

Zelladhäsionsmoleküle: den Cadherinen, Integrinen, Selectinen sowie der Immunglobulin-Superfamilie (*Hynes et al. 1992*).

Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei EGF-ähnlichen Domänen, es folgen eine Cystein-reiche Region, die Transmembrandomäne und ein kurzer zytoplasmatischer Teil, der zwei α -actinin-Bindungsstellen besitzt (*Balzar et al. 1998 und 1999*).

In der (älteren) Literatur findet sich vielfach die Angabe, Ep-CAM würde kodiert durch das auf dem langen Arm des Chromosoms 4 gelegene *GA733-2*-Gen, welches zusammen mit dem sich auf Chromosom 1 befindenden (und vermutlich durch Retroposition aus *GA733-2* entstandenen) *GA733-1*-Gen die *GA733-*Genfamilie bildet. *GA-733-*ähnliche Sequenzen finden sich im Genom aller Säuger und Vögel, was die funktionale Bedeutung dieses Proteins deutlich macht (*Linnenbach et al. 1993*). Calabrese und Mitarbeiter lokalisierten das für Ep-CAM-kodierende Gen im Jahr 2001 allerdings auf dem Chromosom 2p21 und das in 49 der cDNA-übereinstimmende, ehemals als *GA733-1* bezeichnete Gen auf Chromosom 1p32. Es erfolgte außerdem eine Umbenennung der Gene in *TACSTD* (tumor-associated calcium-signal-transducer) 1 und 2.

Für verschiedene Tumorentitäten konnte eine Ep-CAM-Überexpression (im Vergleich zur o.g. physiologischen Expression im Normalgewebe) bzw. de novo-Expression gezeigt werden, so bspw. für das Mammakarzinom (*Gastl et al. 2000*), für das kleinzellige Bronchialkarzinom (*Brezicka 2005*) und das Plattenepithelkarzinom der Lunge (*Piyathilake et al. 2000*) sowie nicht zuletzt für kolorektale Karzinome (*Xie et al. 2005*). Außerdem korreliert die Ep-CAM-Expression mit dem Grad der cervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) und verschiedenen Proliferationsmarkern (CK5, CK14 und Ki-67) (*Litvinov et al. 1996*).

Die genannten Erkenntnisse führten zur Interpretation von Ep-CAM im Sinne einer flexiblen Zwischenverbindung bei Wachstum und Gewebeorganisation (*Balzar et al. 1998 und 1999 sowie Winter et al. 2003*).

1.2.2 Prognosefaktor

Die Arbeitsgruppen um Spizzo und Gastl (2002, 2000) sowie Tandon (1990) zeigten, daß eine Ep-CAM-Überexpression beim Mammakarzinom mit einem kürzeren rezidivfreien und Gesamtüberleben einhergeht. Auch für das Gallenblasenkarzinom (*Varga et al. 2004*) und das Ovarialkarzinom (*Spizzo et al.* 2006) konnte die Ep-CAM-Expression als unabhängiger prognostischer Marker identifiziert werden.

1.2.3 Antikörpertherapie

Der gegen Ep-CAM als Antigen gerichtete monoklonale Antikörper Edrecolomab (Panorex[®]) ist ein Gammaglobulin der Maus und gehört zur Subklasse IgG_{2a}. Es werden verschiedene Wirkmechanismen diskutiert, darunter vor allem die Aktivierung des Komplementsystems und Induktion der Komplementvermittelten Zytotoxizität sowie die Zytolyse und Phagozytose über die Antikörper-vermittelte Zellzytotoxizität (*Adkins et al. 1998 und Pantel 2001*).

Nachdem Riethmüller und Mitarbeiter in einer Multicenterstudie einen signifikanten Anti-Tumor-Effekt bei kolorektalen Karzinomen beschrieben hatten, wurde Edrecolomab in Deutschland im August 1994 unter der

Auflage, weitere klinische Studien durchzuführen, die Zulassung zur adjuvanten Therapie des Kolonkarzinoms im Stadium III erteilt. In Zwischenanalysen zeigte sich jedoch die Unterlegenheit gegenüber der empfohlenen Standardtherapie mit 5-FU/Folinsäure, die Ende 2000 zur Marktrücknahme führte. Der potentielle Gewinn einer Kombinationstherapie mit Edrecolomab und Chemotherapie wird kontrovers diskutiert (*Fields et al. 2002, Punt et al. 2002 und 2003, Riethmüller et al. 1998*) und ist Gegenstand derzeitiger Studien.

In der Folge wurden verschiedene humanisierte Antikörper entwickelt, die im Tierversuch Edrecolomab gleichwertig waren (*Ammons et al. 2003, Huls et al. 1999, Naundorf et al. 2002*) und aufgrund einer verlängerten Halbwertszeit beim Menschen einen noch größeren Effekt erwarten lassen. Zuletzt beschrieben Schlereth und Mitarbeiter (2005) im Mausmodell den sehr hohen T-Zell-vermittelten Effekt des konstruierten bispezifischen Ep-CAM/CD3-Antikörpers MT110.

1.3 Der epidermaleWachstumsfaktorrezeptor p185_{HER-2}

1.3.1 Nomenklatur

Das *neu*-Gen wurde erstmals als aktiviertes, transfomierendes Gen in chemisch induzierten neuroektodermalen Tumoren bei Ratten entdeckt (*Shih et al. 1981*).

In der Folge beschrieben die Arbeitsgruppen von Schechter (1984 und 1985) sowie Coussens (1985) die Ähnlichkeit des menschlichen Proto-Onkogens mit dem für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) kodierenden *erbB*-Gen und identifizierten es von diesem unabhänig als *erbB*-verwandtes Gen, genannt *erbB*-2 oder *HER*-2.

Dieses Gen (im folgenden als *HER-2* bezeichnet) kodiert ein 185kDa Transmembran-Glykoprotein (p185_{HER-2}). p185_{HER-2} konnte der Familie des EGFR zugeordnet werden. Diese enthält neben dem EGFR (erbB) und p185_{HER-2} (erbB-2) noch die weiteren Mitglieder HER-3 (erbB-3) und HER-4 (erbB-4) (*Kraus et al. 1989, Plowman et al. 1993*). Alle vier Proteine gehören zur Superfamilie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (TKR) und enthalten neben der Transmembrandomäne zwei Cystein-reiche extrazelluläre Domänen (*Coussens et al. 1985*). Die vier TKR sind normalerweise in verschiedenen Variationen koexprimiert und finden sich physiologisch in zahlreichen Geweben mit Ausnahme des hämatopoetischen Systems (*Cohen et al. 1989, Coussens et al. 1985, Natali et al. 1990*).

Lokalisiert wurde das menschliche *HER-2-*Gen auf dem Chromosom 17q12-21.32 (*Popescu et al. 1989*). *HER-*2 ist hochkonserviert und findet sich auch in Organismen wie Caenorhabiditis elegans und Drosophila melanogaster (*Rubin und Yarden 2001*).

1.3.2 Funktion

Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivierung der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren durch ihre Liganden reguliert (*Rubin und Yarden 2001*). Derzeit sind zehn Liganden bekannt, die in Untergruppen gegliedert werden können. Für p185_{HER-2} konnte bis heute kein direkter Ligand nachgewiesen werden (*Holbro 2003*). Die Arbeitsgruppen um Tzahar (*1996*) und Graus-Porta (*1997*) zeigten allerdings, daß p185_{HER-2} als bevorzugter Bindungspartner der anderen Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (EGFR, HER-3 und

HER-4) nach durch Liganden-Bindung induzierter Bildung von Heterodimeren länger dauernde Phosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne und somit auch stärkere Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden (einschließlich der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase- und der Phosphatidylinositol-3'Kinase-Kaskade) (*Yarden und Sliwkowski 2001*) hervorruft.

Venter und Mitarbeiter (1987) zeigten, daß p185_{HER-2} auf Mammakarzinomzellen im Vergleich zu nicht dysplastischen Zellen 100fach stärker exprimiert sein kann; es wird spekuliert, daß es in diesen Fällen zu spontanen Dimerisationen kommt, die in einer Aktivierung der Signalkaskaden resultieren (*Holbro 2003*).

1.3.3 Zusammenhang von Proteinüberexpression und Genamplifikation in verschiedenen Geweben

Seit der Entdeckung des *HER-2*-Gens bzw. seines Genprodukts p185_{HER-2} haben zahlreiche Arbeitsgruppen eine *HER-2*-Genamplifikationen und/oder p185_{HER-2}-Überexpressionen für verschiedene Tumorentitäten nachgewiesen. Am besten untersucht ist zweifelsfrei das Mammakarzinom: die Rate der Amplifikation in Kombination mit einer Überexpression liegt hier bei ca. 25-30%. Neben der Genamplifikation als häufigster Ursache der Proteinüberexpression wurde für das Mammakarzinom in 3-10% der Fälle auch eine isolierte Rezeptorzunahme ohne Amplifikation beschrieben (*Pauletti et al. 1996, Slamon et at. 1989, Venter et al. 1987*).

Andere Tumorgewebe (Lunge, Harnblase, Speiseröhre) weisen im Vergleich zur Genamplifikation eine deutlich höhere Proteinüberexpression auf, was eine Kontrolle der Expression auf Transkriptions- und/oder Translationsebene nahelegt (sofern nicht technisch bedingte Defizite in der Nachweisbarkeit ursächlich ausschlaggebend sind) (*Hynes et al. 1994*).

1.3.4 Prognosefaktor

Slamon und Mitarbeiter beschrieben die *HER-2*-Genamplifikation bereits 1987 als unabhängigen prognostischen Marker, der mit einem geringeren Gesamt- und krankheitsfreien Überleben korreliert. Dieser Zusammenhang ist durch verschiedenste Arbeitsgruppen bestätigt worden (*Ciocca et al. 1992, Press et al. 1997, Sjögren et al. 1998*).

Der prädiktive Wert des *HER-2-/*p185_{HER-2}-Status in Bezug auf adjuvante Hormon- und Chemotherapien wird kontrovers diskutiert, ein Überblick findet sich bei Dowsett und Mitarbeitern (2000).

1.3.5 Antikörpertherapie

Trastuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper (rhuMAb HER2), bei dem nur noch die Antigenbindungsstellen aus murinen Sequenzen bestehen. Trastuzumab bindet etwa dreifach stärker als der murine Antikörper Mab 4D5 an die extrazelluläre Domäne von p185_{HER-2}, seine Hemmwirkung gegenüber Zellinien und Xenografts, die p185_{HER-2} verstärkt exprimieren, ist dabei vergleichbar (*Carter et al.* 1992).

Die Wirksamkeit von Trastuzumab als Monotherapie oder in Kombination mit Zytostatika wurde in mehreren Phase II- und Phase III-Studien (*Baselga et al. 1996, Pegram et al. 1998, Slamon et al. 2001*), an denen Frauen mit metastasierten, p185_{HER-2}-überexprimierenden Mammakarzinomen teilnahmen,

überprüft: Trastuzumab erwies sich bei in der Regel guter Verträglichkeit als wirksames Mittel zur Hemmung des Tumorwachstums. So konnten bspw. Slamon und Mitarbeiter *(2001)* für die Kombinationsbehandlung aus Trastuzumab und verschiedenen chemotherapeutischen Regimen ein höheres und verlängertes Ansprechen (50 vs. 32%, 9,1 vs. 6,1 Monate) sowie ein verlängertes progressionsfreies (7,4 vs. 4,6 Monate) und Gesamtüberleben (25,2 vs. 20,3 Monate) gegenüber der alleinigen Chemotherapie nachweisen.

Die Wirksamkeit des Antikörpers in der adjuvanten Situation wurde in der HER(ceptin[®])-A(djuvant)-Studie untersucht: für die Gruppe der p18_{5HER-2}-überexprimierenden Patientinnen, die nach adjuvanter Chemotherapie eine einjährige Trastuzumab-Behandlung erhielt, konnte ein signifikant verlängertes krankheitsfreies Überleben gezeigt werden (*Piccart-Gebhart et al. 2005*).

Trastuzumab ist in Deutschland seit August 2000 als First-line-Therapie in Kombination mit Paclitaxel für Patientinnen, die für eine Anthrazyklinbehandlung ungeeignet sind, und als Second- oder Third-line-Monotherapie zur Behandlung von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, deren Tumoren p185_{HER-2} überexprimieren, zugelassen (*Deutsches Ärzteblatt 2002*). Aufgrund der Ergebnisse der HERA-Studie wurde der Antikörper im Mai 2006 in Kombination mit Chemotherapie auch für die adjuvante Behandlung zugelassen (*Deutsches Ärzteblatt 2006*).

1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Trotz Operation in kurativer Absicht liegen die mittleren 5-Jahres-Überlebensraten bei Patienten mit einem operablen Plattenepithelkarzinom des Ösophagus bei nur 30-40%. Präoperative sowie adjuvante Chemotherapien werden aufgrund des umstrittenen Nutzens zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur im Rahmen kontrollierter Studien empfohlen. Die Suche nach neuen therapeutischen Zielstrukturen zur Behandlung zum einen und die präzisere und individuelle Risikostratifizierung mittels molekularer Prognosefaktoren zur Identifizierung der von einer zukünftigen adjuvanten Therapie profitierenden Patienten zum anderen ist daher dringend erforderlich.

Zwei mögliche therapeutische Zielstrukturen stellen die beiden oben genannten Oberflächenproteine Ep-CAM und p185_{HER-2} dar. Für beide Proteine wurden Antikörper (Edrecolomab und Trastuzumab) entwickelt, die in klinischen Studien bei anderen Tumorentitäten einen signifikanten antitumoralen Effekt zeigten. In der vorliegenden Arbeit wurden bei 70 Plattenepithelkarzinompatienten die Expressionsmuster dieser beiden Proteine mittels immunhistochemischer Methoden untersucht. Dabei galt es in erster Linie folgende Fragen zu beantworten:

- Wie häufig und in welcher Stärke sind Ep-CAM und p185_{HER-2} bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus exprimiert?
- 2. Wie korreliert die Expression von Ep-CAM und p185_{HER-2} mit TNM-Stadium sowie Grading und hat die Expression einen Einfluß auf die Prognose des Patienten?
- 3. Gibt es Koexpressionen von Ep-CAM und p185_{HER-2} im untersuchten Kollektiv und haben diese eine mögliche klinische Relevanz?

Da der Mechanismus der p185_{HER-2}-Überexpression für das ösophageale Plattenepithelkarzinom (im Gegensatz zu anderen Entitäten wie beispielsweise dem Mammakarzinom) noch nicht untersucht ist, wurde für den Fall einer nachgewiesenen Protein-Überexpression im untersuchten Kollektiv eine In-Situ-Hybridisierung vorgesehen. Diese sollte die Möglichkeit einer Gen-Amplifikation als induzierenden Faktor untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tumorproben

Das Untersuchungskolletiv umfaßte prospektiv gesammelte cryokonservierte Proben von 70 Patienten, die in den Jahren 1994-2001 in der Allgemeinchirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Eppendorf in kurativer Intention an einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus operiert wurden. Für die Entnahme von Tumormaterial für Forschungszwecke lag eine Genehmigung der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg vor. Alle an der Studie beteiligten Patienten gaben eine schriftliche Einwilligungserklärung ab. Die Proben wurden direkt nach der Entnahme in TissueTec[®] eingebettet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei –80°C konserviert.

Histologisch ergab sich in allen 70 Fällen ein Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Die Patienten waren bei Diagnosestellung im Alter zwischen 43 und 74 Jahren, der Altersmedian lag bei 61 Jahren. Die pTNM-Klassifikation erfolgte anhand der UICC-Kriterien *(Wittekind et al. 2002)*. Die Daten der Patienten werden tabellarisch im Anhang (Tab. 8) zusammengefaßt.

In fünf Fällen bestand eine R1-Situation, fünf Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Fernmetastasen auf und weitere fünf verstarben innerhalb von 30 Tagen perioperativ nicht-tumorbedingt. Für zwei weitere Patienten konnten keine relevanten Nachbeobachtungsdaten erhoben werden. Nach Ausschluß dieser Patienten standen für die Überlebenszeitanalysen 53 Patienten zur Verfügung. Hierfür wurden postoperativ Daten zum weiteren Verlauf der Erkrankung erhoben und in halbjährlichen Abständen die weiterbehandelnden Ärzte der Patienten kontaktiert. Anhand eines Fragebogens wurden Informationen über Zeitpunkt und Lokalisation von aufgetretenen Lokalrezidiven und Fernmetastasen bzw. im Sterbefall Informationen über Todeszeitpunkt und Todesursache ermittelt. Für die 53 beobachteten Patienten waren Daten zum klinischen Verlauf von mindestens zwei Monaten vorhanden und die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 15 Monate (2 – 95 Monate).

Zur Messung der *HER-2*-Amplifikation wurden zusätzlich Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Tumore von 11 Patienten mittels In-Situ-Hybridisierung untersucht.

2.1.2 Positivkontrollen

Der für die Untersuchung der p185_{HER-2}-Expression standardisiert durchzuführende HercepTest[™] der Fa. DAKO verwendet als Positivkontrollen in Paraffin eingebettete Brustkrebszellinien mit bekannter p185_{HER-2}-Expressionsstärke. Da die für diese Arbeit verwendeten Patientenproben cryokonserviert vorlagen, mußte vor Beginn des eigentlichen Versuchs der Nachweis erfolgen, daß der HercepTest[™] auch für cryokonserviertes Material verwendet werden kann. Zu diesem Zweck wurde ein Zellkultur-Vorversuch durchgeführt.

Dafür wurden zwei Brustkrebszellreihen verwendet, die beim standardisierten HercepTest[™] in Paraffin eingebettet (dem Kit beigefügt) als Kontrollen dienen. Es handelt sich dabei um SK-BR-3, eine p185_{HER-2}überexprimierende (Score: 3+) Zellinie, und MDA-MB-231, welche p185_{HER-2} nicht exprimiert (Score: 0). Bei den Zellinien handelt es sich um adhärent wachsende Zellen. Für die Kultivierung wurden die in der Produktinformation empfohlenen Medien verwendet. Für SK-BR-3 handelte es sich dabei um McCoy's 5A mit 1,5 mM L-Glutamin und 2,2 g/l NaHCO₃ sowie 10% Fetalem Kälberserum (FKS). Für MDA-MB-231 wurde Leibovitz's L-15 Medium, ebenfalls mit 10% FKS, verwendet (da dieses Medium kein NaHCO₃ enthält, sollte kein CO₂-Inkubator benutzt werden).

Für die Kontrolle der Ep-CAM-Expression wurde zum einen die Mammakarzinom-Zellinie MCF-7 verwendet, welche das Ep-CAM-Protein stark exprimiert. MCF-7 wurde in RPMI-1640 versetzt mit 10% FKS kultiviert. Zum anderen wurden Gewebeschnitte von (mehrfach als EpCAM-positiv getesteter) Kolonmukosa eingesetzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zellinien wurden wie folgt kultiviert, die dafür notwendigen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank durchgeführt.

2.2.1.1 Auftauen und Einsäen der Zellen

- Cryoröhrchen unter fließendem Wasser vorsichtig antauen
- Rascher Transfer unter die Sterilbank: Desinfektion des Röhrchens von außen und Resuspension der Zellen in 500µl Schritten in ca. 10 ml Medium (Prävention eines "osmotischen Schocks")
- 8 min mit 1250 U/min zentrifugieren
- Überstand abgießen, mit 5 ml Medium resuspendieren und in eine T 25-Zellkulturflasche geben
- Inkubation im Brutschrank bei 37 °C (SK-BR-3 und MCF-7 mit 5 CO₂, MDA-MB-231 ohne CO₂)

Um den initialen Anheftungsprozeß der Zellen am Boden der Kulturflasche nicht zu stören, sollten die Zellen die nächsten 24 Stunden ruhen. Nach zwei bis drei Tagen können die Zellen dann unter dem Phasenkontrastmikoskop untersucht werden, um Zelldichte und Wachstum zu begutachten. Ein gutes Wachstum der Kultur zeigt sich außerdem am Farbumschlag des Mediums von rot zu gelb: der Phenolrotindikator zeigt die pH-Wert-Erniedrigung als Folge der Metabolisierung von Glucose zu Lactat.

2.2.1.2 Passagieren der Zellen

Ist *in vitro* der Boden der Kulturflasche als Substrat der Zellen vollständig eingenommen, sinkt bei strikt adhärenten Zellen die Proliferationsrate stark ab. Dies kann bis zum Absterben der Kultur führen. Es ist deshalb nötig, die Zellen nach Erreichen der Maximaldichte zu verdünnen, zu passagieren. Die Zellen werden dabei unter Verdünnung vom alten in ein neues Kulturgefäß überführt (*Lindl 2002*).

Beim Mediumwechsel wurde die Größe der Zellpopulation unter dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Bei Indikation erfolgte nicht nur der Wechsel des Mediums, sondern die Passagierung unter sterilen Bedingungen wie folgt:

- Altes, verbrauchtes Medium absaugen
- Die Zellen mit auf 37°C vorgewärmter PBS-Lösung waschen, dann eine kleine Menge (T 25-Kolben: 2ml, T 75-Kolben: 5ml) Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 Trypsin/0,02 EDTA) zugeben
- Inkubation bei 37°C für 5-10′
- Mikroskopische Kontrolle (ob die Zellen komplett abgelöst sind), ggf. vorsichtig abklopfen (*Shake Off-*Verfahren)
- Trypsinierung mit frischem Medium abstoppen: T 25-Kolben 5 ml, T 75-Kolben 10 ml, anschließend 8 min mit 1250 U/min zentrifugieren
- Überstand abpipettieren, mit PBS-Puffer waschen, erneute Zentrifugation (8 min, 1250 U/min)
- Überstand verwerfen und Pellet in neuem Medium resuspendieren
- Bestimmung der Zellzahl (s.u.), ggf. Splitting (von ATCC empfohlene Konzentration: 1,5-2 x 10⁵ Zellen pro ml Medium) und Überführung in ausreichend großen neuen Kolben, der bereits vorgewärmtes Medium enthält.
- Inkubation bei 37°C (SK-BR-3 und MCF-7 mit 5 CO₂, MDA-MB-231 ohne CO₂)

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Für die Wachstumsgeschwindigkeit ist die initial zugesetzte Zellzahl bei den meisten adhärent wachsenden Zellreihen von großer Bedeutung: zu dünn ausgesäte Zellen wachsen nur langsam, zu dicht ausgesäte Zellen müssen zu oft passagiert werden, wobei jede Subkultivierung mit einem Verlust von Zellen einhergeht. Die regelmäßige Zellzählung vor einer erneuten Aussaat kann den Erfolg der Kultivierung folglich erheblich verbessern. Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde außerdem eine Färbung mit 0,18% Trypanblau durchgeführt (*Lindl 2002*).

- Verdünnte Zellsuspension (0,1 ml Zellsuspension und 0,9 ml PBS mit 0,2 Trypanblau) in die vorbereitete Fuchs-Rosenthal-Zählkammer füllen (die Kammer dabei möglichst exakt füllen, um das vorgegebene (und der Formel zugrunde liegende) Volumen nicht zu unter- oder überschreiten)
- Unter dem Phasenkontrastmikroskop 5 Großquadrate (à 1mm²) auszählen; blau gefärbte Zellen werden als nicht vital eingestuft und deshalb nicht gezählt.
- Die Gesamtzahl der Zellen berechnet sich aus der Zahl der gezählten vitalen Zellen multipliziert mit 1000 ("Kammerindex" aus Zählfläche und Kammertiefe von 0,2 mm), 10 (Verdünnung mit PBS) und dem Volumen der Gesamtsuspension in Milliliter.

2.2.1.4 Konservierung

Die kultivierten Zellen wurden im gleichen Material (TissueTec[®]) wie die Patientenproben cryokonserviert. Die aus diesen Blöckchen angefertigten, 5 µm dicken Schnitte wurden dann dem Protokoll des HercepTest[™] folgend einer immunhistochemischen Färbung unterzogen (s. Kap. 2.2.3.3).

2.2.2 Anfertigung der Schnittpräparate

Für die Durchführung der immunhistochemischen Versuche wurden 5 μ m dicke Serienschnitte der cryokonservierten Tumorblöcke angefertigt und auf Superfrost Plus® Objektträger aufgezogen. Die Gewebeschnitte wurden bis zur Durchführung der Immunhistochemie bei –20°C gelagert.

Für die In-Situ-Hybridisierung wurden ebenfalls 5 μ m-Schnitte der Paraffinblöcke präpariert, auf Objektträger aufgezogen und anschließend für 60 Minuten bei 56°C getrocknet; die Aufbewahrung der Schnitte erfolgte bei 4 – 8°C.

Außerdem wurde für beide Versuchsreihen je ein weiterer konsekutiver Schnitt angefertigt und HE-gefärbt. Er diente sowohl zur Bestätigung, daß noch Tumorareale vorhanden waren, als auch zur Identifikation derselben im Vergleich mit den Präparaten der In-Situ-Hybridisierungs-Analysen.

(Ausführliche Listen der bei den Versuchsreihen benutzten Materialen und Geräte sowie der verwendeten selbstangesetzten Lösungen und Puffer finden sich im Kapitel 6.1.)

2.2.3 Immunhistochemie

2.2.3.1 Grundlagen

Immunhistochemische Nachweise (IHC) beruhen auf der Ausbildung von Immunkomplexen, bestehend aus Antigenen (Ag) und Antikörpern (Ak). Die dafür notwendige Ag-Ak-Reaktion erfolgt, wenn ein für ein bestimmtes Antigen spezifischer Antikörper auf betreffendes Antigen trifft. Mittels verschiedener Detektionsverfahren können diese Ag-Ak-Komplexe nachgewiesen werden: als direkte Methode (mit bereits direkt markierten Antikörpern wie beim HercepTest[™]) oder als indirekte Methode (mit weiterer Verstärkung der Immunreaktion im Anschluß an die eigentliche Ag-Ak-Komplexbildung wie bei der Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase-Technik, kurz APAAP) (*Boenisch 2003*).

2.2.3.2 Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase-Technik (APAAP)

Die 1984 durch Cordell et al. beschriebene APAAP-Methode ist eine Antikörperbrücken-Technik für monoklonale Antikörper. Die Bindung des spezifischen Primärantikörpers an das Antigen wird dabei indirekt über die Farbreaktion des durch Enzyme des APAAP-Komplexes umgesetzten Substrats nachgewiesen.

Für die Versuchsreihe wurden der gegen EpCAM gerichtete monoklonale Antikörper BerEP4 sowie Paare cryokonservierter Gewebeproben verwendet. Als Positivkontrolle dienten Gewebeschnitte von (mehrfach als EpCAM-positiv getesteter) Kolonmukosa sowie Präparate von MCF-7-Zellen; für die Negativkontrolle wurde ein Objektträger (OT) jedes Gewebe-Paars mit dem Kontroll-Antikörper MOPC-21, einem monoklonalen Antikörper der Klasse IgG1, der nicht mit menschlichen Antigenen reagiert, inkubiert. Die Inkubationen mit den verschiedenen Antikörpern erfolgten in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur, die Inkubation in der Substratlösung lichtgeschützt, die Waschungen mit Tris-Puffer auf dem Schüttler.

2.2.3.2.1 Durchführung

Gewebevorbereitung:

- Gewebeschnitte 30 min lufttrocknen
- 5 min Fixierung in Aceton
- Einstellen in Tris-Puffer und 3 x 5 min spülen
- 30 min AB-Serum (1:10 mit Tris-Puffer)
- OT abklopfen (nicht spülen)

Färbung:

- 45 min Inkubation mit dem Primärantikörper BerEP4 bzw. MOPC-21 (Konzentration je 2 µg/ml)
- 3 x 5 min spülen mit Aqua dest.
- 30 min Inkubation mit dem Brückenantikörper Kaninchen-anti-Maus Z0259 (Konzentration der Stammlösung 2,7 g/l, Verdünnung 1:50 mit Tris-Puffer)
- 3 x 5 min spülen mit Aqua dest.
- 30 min Inkubation mit der APAAP-Lösung (Konzentration der Stammlösung 0,1 g/l, Verdünnung 1:100 mit Tris-Puffer)
- 3 x 5 spülen mit Aqua dest.
- 30 min Substrat

Waschen und Gegenfärbung:

- 2 x kurz spülen mit Aqua dest.
- 3 min Gill's Hämatoxilin
- 1 x kurz spülen mit Aqua dest.
- 10 min Bläuen (unter laufenden Leitungswasser)
- 2 x kurz spülen mit Aqua dest.
- Eindecken mit Aquatex
- (Aufbewahrung der OT lichtgeschützt bei Raumtemperatur)

2.2.3.2.2 Auswertung

Zum Zeitpunkt der Auswertung existierte kein standardisiertes anerkanntes Verfahren zur Klassifizierung der mittels Immunhistochemie nachgewiesenen Ep-CAM-Expression. Spizzo und Mitarbeiter (2003) präferieren eine semiquantitative Einteilung der Gewebe in "niedrig-, mittel- und stark-exprimierend", die von dieser Arbeitsgruppe zur Klassifizierung der Proteinexpression angewendet wird und auch in den Untersuchungen von Martin und Mitarbeitern (1999) Anwendung fand. Van Diest (1997) schlägt für alle immunhistochemischen Verfahren als Weiterentwicklung der semiquantitativen Einteilung einen sog. Histo-Score vor, bei dem die Klassifizierung anhand des Produkts aus Färbeintensität (0-3+) und Anteil der in der jeweiligen Intensität gefärbten Zellwände erfolgen soll (wie verwendet zur Quantifizierung des Hormonrezeptor-Status beim Mammakarzinom). Er räumt jedoch ein, daß die prozentualen Anteile in der Praxis überwiegend geschätzt und nicht gezählt werden. Aus Gründen der Praktikabilität und der

Vergleichbarkeit erfolgte die Auswertung der Versuchsreihe anhand des *Hercep-Score* (s. Kap. 2.2.3.3), da mit dieser standardisierten Klassifizierung ebenfalls die Expression eines Membranproteins erfaßt wird. Ein heterogenes Expressionsmuster wurde dabei definiert als unterschiedliche Färbeintensitität in mehr als 25% der Ep-CAM-positiven Tumorzellen.

2.2.3.3 Der HercepTest[™]

Der DAKO HercepTest[™] ist ein semi-quantitativer Test zur Untersuchung der p185_{HER-2}-Expression in standardisiert verarbeiteten, Paraffin-eingebetteten Gewebeproben; ursprünglich zugelassen, um potentielle Kandidatinnen für eine Trastuzumab-Therapie beim Mammakarzinom zu finden.

Der Test enthält neben allen notwendigen Reagenzien eine Positivkontrolle in Form von drei auf Objektträgern aufgebrachten Brustkrebs-Zellinien unterschiedlich starker Proteinexpression (MDA-231: 0, MDA-175: 1+, SK-BR-3: 3+) sowie ein Reagenz für Negativkontrollen (Ig-Fraktion aus Kaninchenserum mit gleicher Proteinkonzentration wie im Primärantikörperreagenz). Die Antikörper-Inkubation erfolgte entsprechend dem DAKO-Protokoll in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

Für die Versuchsreihe wurden nach Durchführung des Vorversuchs Paare cryokonservierter Gewebeproben entsprechend dem DAKO-Protokoll getestet. Die im Protokoll vorgesehene Gewebevorbehandlung für Paraffin-eingebettete Schnitte wurde dabei durch die im Labor etablierte IHC-Vorbehandlung für cryokonservierte Gewebeproben ersetzt. Neben den dem Test-Kit beiliegenden Kontroll-Objektträgern wurden außerdem die im Rahmen des Vorversuchs gewonnenen Schnitte der cryokonservierten Zellreihen als Positivkontrollen eingesetzt.

2.2.3.3.1 Durchführung

DAKO Kontroll-OT:

- Entparaffinierung: 2 x 5 min Xylol
- Abklopfen, anschließend 2 x 3 min 95 -iger Alkohol (EtOH)
- Abklopfen, anschließend 2 x 3 min 70 -iger Alkohol (EtOH)
- Abklopfen, kurz Aqua dest.
- Epitop Retrieval: Inkubation in der Epitop Retrieval-Lösung für 40 min bei 95 -99°C, anschließend Abkühlen im Waschpuffer für 20 min bei Raumtemperatur
- → Färbung

Cryo-Gewebeschnitte bzw. Zytospins:

- Gewebeschnitte 30 min lufttrocknen, anschließend 2 min Fixierung in Aceton und Einstellen in Waschpuffer
- → Färbung

Färbung:

- Waschpuffer abklopfen und Gewebeproben mit DAKO-Fettstift markieren, damit die Reagenzien immer das Schnittareal bedecken
- 5 min Peroxidase-Blockierungsreagenz
- vorsichtige Spülung mit Waschpuffer, anschließend 5 min waschen
- 30 min Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. dem negativen Kontrollreagenz
- vorsichtige Spülung mit Waschpuffer, anschließend 5 min waschen
- 30 min Inkubation mit dem Visualisierungs-Reagenz
- vorsichtige Spülung mit Waschpuffer
- 10 min Inkubation mit DAB-Substrat-Chromogen-Lösung
- vorsichtige Spülung mit Aqua dest.
- 3 min Hämatoxilin
- 10 min Bläuen (unter laufendem Leitungswasser)
- 2 x kurz spülen mit Aqua dest.
- Eindecken mit Entellan
- (Aufbewahrung der OT lichtgeschützt bei Raumtemperatur)

2.2.3.3.2 Auswertung (Hercep-Score)

Für die Auswertung des HercepTests[™] darf nur die Färbung der Zellmembran gewertet werden. Zytoplasmatische Färbung sollte als unspezifisch angesehen und für die Interpretation nicht berücksichtigt werden (*Press et al. 1994*). Die Richtlinien für die Einteilung finden sich in Tabelle 1. Als Vergleich dienen die DAKO-Kontroll-Objektträger sowie der DAKO *Atlas for Interpretation of HercepTest*[™] *Staining* mit repräsentativen Aufnahmen verschiedener Färbeintensitäten.

Färbemuster	Score	HER-2-Protein-Überexpression
Keine Färbung oder Membranfärbung in weniger als	0	Negativ
10% der Tumorzellen	0	Negativ.
Kaum sichtbare Membranfärbung in mehr als 10%		
der Tumorzellen./	1+	Negativ.
Membranfärbung nicht vollständig ausgeprägt.		
Schwache bis moderate, komplette	2.	Cohursch positiv
Membranfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen.	2+	Schwach positiv.
Starke, komplette Membranfärbung in mehr als 10%	2.	Charle manife
der Tumorzellen.	5+	stark positiv.

TABELLE 1: KRITERIEN DES HERCEPTEST[™]

2.2.4 In-Situ-Hybridisierung

2.2.4.1 Grundlagen

Die Methode der in-situ-Hybridisierung (ISH) wurde erstmals 1969 von der Arbeitsgruppe um Gall und Pardue sowie unabhängig davon durch John und Mitarbeiter beschrieben. Sie ermöglicht das Auffinden spezifischer DNA-Sequenzen in Interphase-Kernen oder auf Metaphase-Chromosomen (*Joos et al. 1994*). Grundlage des Verfahrens ist die Renaturierung komplementärer DNA-Stränge: der *in situ* vorliegenden Ziel-DNA und der hinzugegebenen Sonden-DNA. Entscheidend ist dabei, daß es sich bei der Bildung einer Doppelhelix aus zwei einzelnen DNA-Strängen um einen reversiblen Prozeß handelt. Kenngröße des thermodynamischen Gleichgewichts der Hybridisierung ist der durch verschiedene Parameter beeinflußte Schmelzpunkt

 $T_m = 81,5^{\circ}C + 16,61 \log [mol Na^+/l] + 0,41 [\%G+C] - [\% Formamid];$

d.h. T_m wird erhöht (Förderung der Ausbildung des DNA-Hybrids) durch monovalente Kationen sowie den Guanosin-Cytosin-Gehalt der DNA und erniedrigt durch Helix-destabilisierende Chemikalien (wie Formamid) sowie Basenfehlpaarungen (*Joos et al. 1994, Swiger et al. 1996*).

Das Hybridisierungsprotokoll läuft dabei prinzipiell wie folgt ab:

Ziel- und Sonden-DNA werden durch Temperaturerhöhung denaturiert (= Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen beider Ketten). Die anschließend vorliegenden Einzelstränge befinden sich in einem höchst instabilen Zustand und lagern sich im Zuge der Renaturierung (bei Temperaturerniedrigung) mit komplementären Sequenzen zusammen. Neben homogenen Ziel- und Sonden-DNA-Paaren entstehen dabei auch heterogene Doppelstränge aus Sondenund Ziel-DNA. Durch die stringenten Waschschritte werden die Sondenanteile, die nicht oder unspezifisch gebunden haben, entfernt. Die verschiedenen, nachfolgend genannten Detektionsmethoden dienen dem Nachweis der Ziel-DNA-Sequenz *in situ*.

Gall und Pardue sowie John und Mitarbeiter (1969) markierten die DNA radioaktiv und wiesen die spezifisch gebundene DNA mittels Autoradiographie nach. Um die mit diesem Verfahren verbundenen Schwierigkeiten (lange Expositionszeiten, aufwendige Sicherheitsbestimmungen und Entsorgungsprobleme, extrem instabile und teilweise unspezifische Signale) zu minimieren, wurden nicht-radioaktive Detektionsmethoden entwickelt.

Zu diesen neueren Verfahren gehören die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) (*Joos et al. 1994, Pauletti et al. 1996*) und die chromogene in-situ-Hybridisierung (CISH). Beide Methoden können als gleichwertige Nachweisverfahren angesehen werden (*Arnould et al. 2003, Madrid und Lo 2004, Tanner et al. 2000, Zhao et al. 2002*). Die CISH bietet dabei neben der Möglichkeit, die Signale mit einem gewöhnlichen Mikroskop nachzuweisen, den großen Vorteil einer höheren Signalstabilität. Die Proben können deshalb (bei einfacher Lagerung) über einen längeren Zeitraum für die Analyse genutzt werden. Die Methode ist darüberhinaus weniger kostenintensiv und einfacher durchzuführen. Vorteile der FISH sind eine schnellere Durchführbarkeit (mit direkt-markierten Sonden) sowie die Möglichkeit, mit unterschiedlich markierten Sonden während eines Experiments verschiedene DNA-Sequenzen nachzuweisen.

2.2.4.2 Chromogene in-situ-Hybridisierung (CISH) an Paraffinschnitten

2.2.4.2.1 Vorbehandlung

Der Erfolg der Hybridisierung ist neben der Unterdrückung einer unspezifischen Sondenbindung von der Zugänglichkeit der Sonden-DNA zur Ziel-DNA abhängig. Durch die Vorbehandlung des Gewebes mit dem Enzym Pepsin vor der eigentlichen Hybridisierung werden zytoplasmatische und nukleäre Proteine, die den Zugang zur Ziel-DNA erschweren, entfernt. Es besteht darüberhinaus die Möglichkeit, die Dauer der Pepsin-Behandlung durch eine vorausgehende Inkubation mit Natriumthiocyanat (NaSCN) zu reduzieren *(Scherthan et al. 1994).* Wichtig ist dabei eine optimal auf das Gewebe abgestimmte Vorbehandlungs-Zeit: während ein zu schwacher Verdau die Sondenbindung erschwert, kann ein zu starker Verdau zur Zerstörung der Kernmorphologie und schließlich auch zum DNA-Verlust führen *(ebd.).*

Da für diesen Versuch Paraffin-Schnitte verwendet wurden, mußten diese vor der o.g. Vorbehandlung noch entparaffiniert werden. Der Pepsin-Verdau und die Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) erfolgten in einer feuchten Kammer.

Durchführung:

- 2 x 8 min Xylol
- 2 x 8 min Methanol
- Gewebeschnitte lufttrocknen
- Schnitte 1 min in Citratpuffer kochen
- Schnelle Überführung in 1M NaSCN, dann 10 min inkubieren
- 2 x 1 min Aqua dest.
- 5 min PBS
- Pepsinverdau bei 37°C (Zeit je nach Gewebe zwischen 1 und 3 min)
- 5 min PBS
- 5 min MgCl + PBS
- Schnitte mit 100-200 µl PFA überdecken und 5 min bei 37°C inkubieren
- 5 min PBS
- Dehydrierung: aufsteigende Alkohol-Reihe (je 1 min 80, 96, 100)
- Gewebeschnitte lufttrocknen

2.2.4.2.2 Hybridisierung

Neben den erwähnten Einflußgrößen (Kationengehalt, Guanin-Cytosin-Gehalt, Temperatur) ist das Gelingen der Hybridisierung auch von der Konzentration der Sonden-DNA, dem pH der verwendeten Lösungen sowie Denaturierungs- und Hybridisierungsdauer abhängig (*Swiger et al. 1996*); außerdem von den stringenten Waschschritten.

Nach der genannten Vorbehandlung wurden zur Hybridisierung Sonden zum Nachweis des *HER-2-*Gens und des Chromosom 17-Zentromers verwendet. Dabei handelt sich um bereits Digoxigenin-markierte Sonden, die direkt angewendet werden können.

Durchführung für HER-2-CISH:

- 20 min Vordenaturierung bei 80°C auf einer Heizplatte
- Auftragen der Sonde (ca. 12 µl/OT) auf die Deckgläser, vorsichtig auf die OT auflegen (Luftblasen vermeiden bzw. ggf. entfernen)
- 12 min simultane Denaturierung von Gewebe und Sonde bei 96°C auf der Heizplatte
- OT von der Heizplatte nehmen und Deckgläser mit Fixogum versiegeln
- über 2 Nächte Hybridisierung bei 37°C in einer feuchten Kammer

Durchführung für Chromosom 17-CISH:

- 20 min Vordenaturierung bei 80°C auf der Heizplatte
- Auftragen der Sonde (0,5 μl Sonde auf 10 μl Hybridisierungspuffer (Hybrisol[®]), ca. 12 μl/OT) auf die Deckgläser, vorsichtig auf die OT auflegen (Luftblasen vermeiden bzw. ggf. entfernen)
- 12 min simultane Denaturierung von Gewebe und Sonde bei 80°C auf der Heizplatte
- OT von der Heizplatte nehmen und Deckgläser mit Fixogum versiegeln
- über 2 Nächte Hybridisierung bei 37°C in einer feuchten Kammer

2.2.4.2.3 Waschung

Im Anschluß an die Hybridisierung müssen der überschüssige ungegebundene und unspezifisch gebundene Sondenanteil entfernt werden. Hierbei sind pH und Temperatur der verwendeten Waschlösungen genau einzuhalten, um ausschließlich den überschüssigen Sondenanteil und nicht die spezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Die Destabilisierung der Wasserstoffbrückenbindungen wird dabei durch die niedrige SSC-Konzentration erreicht (*Lottspeich et al. 1998*).

Durchführung:

- Vorsichtige Entfernung des Fixogums
- 10 min 2 x SSC bei Raumtemperatur im Schüttler (Entfernen der Deckgläser)
- 5 min 0,5 x SSC bei 66°C stringente Waschung (nur 6 OT/Küvette, da sonst zu große Temperaturschwankungen)
- 3 x 3 min PBS + 0,025 Tween

Es folgt die Detektion der spezifisch gebundenen Sonde.

2.2.4.2.4 Detektion, Gegenfärbung und Konservierung

Der Nachweis spezifisch gebundener DNA-Sonden erfolgt immunhistochemisch über einen anti-Digoxigenin-Antikörper. Alle Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer bei 37 °C.

Durchführung:

- 10 min 1 H₂O₂ (10ml auf 250ml PBS)
- 2 x 1 min Aqua dest.
- 2 x 3 min PBS
- 8 min Inkubation mit Ziegen-Normal-Serum (1:10 mit PBS), anschließend abklopfen der OT
- 45 min Inkubation mit Primär-Antikörper Maus-anti-Digoxigenin (1:250 mit PBS + 1 BSA)
- 2 x 5 min PBS
- 30 min Inkubation mit Ziege-anti-Maus Biotin (1:500 mit PBS)
- 2 x 5 min PBS
- 30 min Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase (1:500 mit PBS)
- 3 x 3 min PBS
- 10 min Diaminobenzidin (DAB) (1:10 mit zugehörigem DAB-Puffer)
- 2 x 1 min Aqua dest.
- 2 min 30 Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxilin
- 3 min Bläuen (unter laufendem Leitungswasser)
- Dehydrierung in aufsteigender Alkohol-Reihe (je 2 min 2 x 80, 2 x 96, 2 x 100)
- 2 x 5 min Fixierung mit Roti-Histol
- Eindecken mit Entellan
- Aufbewahrung lichtgeschützt bei Raumtemperatur

2.2.4.2.5 Auswertung

Für die Auswertung von In-Situ-Hybridisierungs-Präparaten sind folgende Kriterien entscheidend (*Pauletti et al. 1996*):

- Zellen mit mikroskopisch sichtbar hohem DNA-Verlust werden von der Zählung ausgenommen.
- Es werden nur Kerne gezählt, deren Abgrenzung durchgehend verfolgt werden kann.
- Die Hybridisierung muß gleichmäßig erfolgt sein.
- Signale außerhalb der Kerngrenzen sowie Signale in überlappenden Kernen werden nicht gewertet.
- Nicht mehr voneinander abgrenzbare, sondern dicht gehäuft auftretende Einzelsignale werden als Cluster bezeichnet.

Die Auswertung wurde in 400-facher Vergrößerung vorgenommen. Pro Präparat wurden dabei entsprechend der genannten Kriterien 200 Zellen ausgezählt. Der Signalanzahl entsprechend erfolgte die Bewertung als "nicht amplifiziert" (1 - 5 Signale /Nukleus), "gering amplifiziert" (6 - 10 Signale/Nukleus in mehr als 50% der gezählten Zellen oder eine geringe Zahl an Clustern) und "hoch amplifiziert" (Cluster in mehr als 50% der Zellen oder mehr als 10 Signale/Nukleus) (*Tanner et al. 2000, Zhao et al. 2002*).

Um "gering amplifizierte" Tumoren von solchen mit Chromosom 17-Aneuploidie (und dadurch falsch positiv erhöhter Anzahl an Signalen) unterscheiden zu können, wurden auf konsekutiven Gewebeschnitten die Chromosom 17-Zentromer-Signale in den betreffenden Fällen ebenfalls an 200 Zellen ausgezählt.

2.2.5 Statistik

2.2.5.1 χ^2 -Test und Fisher Exact Test

Mit dem χ^2 -Test wurde berechnet, ob sich zwei Kollektive in Bezug auf eine Eigenschaft signifikant unterscheiden. Darunter fiel:

- 1. Der Vergleich zwischen Ep-CAM Expression und histopathologischen Parametern.
- 2. Der Vergleich zwischen p185_{HER2}-Expression und histologischen Partametern.

Der Fisher Exact Test wurde angewendet, wenn die zu vergleichenden Gruppen zu klein für die Verwendung des χ^2 -Test waren, d.h. eine Vergleichsgruppe weniger als fünf Mitglieder hatte. Dies war inbesondere bei dem Vergleich der einzelnen Expressionstärke-Gruppen der Fall.

2.2.5.2 Überlebensanalysen

Für die Überlebensanalysen wurden zunächst alle Variablen dichotomisiert. Bei der Tumorgröße wurden die Gruppen pT1-2 und die Gruppen pT3-4 zusammengefasst, d.h. die kleineren Tumoren wurden mit den größeren verglichen. Beim Grading wurden G1 und G2 zusammengefasst und dann mit der Gruppe G3 verglichen. Für die Risikoabschätzung des Lebensalters wurde eine Gruppe mit Patienten gebildet, die zum Operationszeitpunkt unter 65 Jahre alt waren und eine mit Patienten, welche zum Operationszeitpunkt 65 Jahre und älter waren. Die Dichotomisierung der Ep-CAM- Expression und der p185_{HER-2}-Expression werden im Ergebnisteil beschrieben.

Mit der Kaplan-Meier-Methode wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, ob ein Rezidiv bzw. der tumorbedingte Tod bis zu einem bestimmten Zeitpunkt eingetreten ist. Der Log-Rang-Test ermöglicht Gruppenvergleiche in der Überlebenszeitanalyse. Er wurde angewendet, um statistisch zu überprüfen, ob sich für entsprechend der Expressionsmuster gebildete Gruppen bzw. bezüglich der histopathologischen Parameter unterschiedliche Mortalitätsrisiken ergeben.

Die primären Endpunkte der Überlebensanalyse waren das tumorspezifische Überleben sowie das rezidivfreie Überleben. Gemessen wurde vom Datum der Operation bis zum Datum der letzten Nachbeobachtung, des tumorbedingten Todes oder des Auftretens eines Rezidivs. Daten von Patienten, die beim letzten Nachbeobachtungszeitpunkt rezidivfrei waren oder lebten, wurden am Ende dieser Studie zensiert. Um zu überprüfen, ob der Einfluss von Faktoren unabhängig von anderen Prognoseparametern ist, wurde eine multivariate Cox's Regressionsanalyse durchgeführt.

Für die Ausführung der vorgenannten statistischen Analysen wurde die Software SPSS 11.0 vewendet. Eine weitergehende statistische Untersuchung mit einem verfeinerten Modell für die multivariate Analyse wurde von Herrn Pablo Verde vom Koordinierungszentrum für Klinische Studien der Universität Düsseldorf durchgeführt. Mit dieser Analyse wurden die hier dargestellten multivariaten Analysen bestätigt. Die Vorgehensweise und die Ergebnisse der weitergehenden multivariaten Analyse wurden 2006 von der Arbeitsgruppe publiziert (*Stoecklein et al. 2006*).

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Zellkultur (Vorversuch)

Zur Etablierung einer cryokonservierten Positivkontrolle für den zur klinischen Analyse der p185_{HER-2}-Expressionsstärke bisher standardisiert nur mit in Paraffin eingebetteten Positivkontrollen durchführbaren HercepTest[™] wurden die Zellreihen SK-BR-3 und MDA-MB-231 in TissueTec[®] eingebettet und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Die analog der Patientenproben hergestellten Schnittpräparate wurden nach standardisierter immunhistochemischer Färbung den Kriterien des HercepTest[™] entsprechend ausgewertet.

Die Zellen der Reihe MDA-MB-231 wiesen keine Färbung oder Membranfärbung in weniger als 10% der Tumorzellen und damit einen Score von o auf, womit die Expressionsstärke mit den in Paraffin eingebettenen Positivkontrollen derselben Zellininie des Dako-Kits übereinstimmte (Abb.1 und 2). Die Zellinie SK-BR-3 zeigte eine starke, komplette Membranfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen (Score 3+). Auch für diese Zellen zeigte sich damit eine Übereinstimmung mit der Expressionsstärke der im HercepTest[™] als Positivkontrollen verwendeten Zellinie (Abb. 3 und 4).

Es ist folglich möglich, den HercepTest[™] für cryokonservierte Patientenproben zur Untersuchung des p185_{HER-2}-Expressionsstatus anzuwenden. Die durch den Vorversuch gewonnenen Schnittpräparate der cryokonservierten Zellen werden als Positivkontrolle für die immunhistochemische Färbung der Patientenproben eingesetzt.

ABBILDUNG 1 UND 2: MDA-MB-231 - EIGENE ZELLKULTUR (CRYO) - DAKO-KIT (PARAFFIN)





ABBILDUNG 3 UND 4: SKBR-3 - EIGENE ZELLKULTUR (CRYO) - DAKO-KIT (PARAFFIN)

3.2 Ergebnisse der Immunhistochemie

Für diese Arbeit wurden Gewebeproben von 70 operierten Ösophaguskarzinompatienten mit immunhistochemischen Methoden untersucht. Die aufgearbeiteten Präparate wurden jeweils ohne Kenntnis des Krankheitsverlaufs mikroskopisch ausgewertet. Als Kriterien dienten der prozentuale Anteil der gefärbten Zellmembranen sowie die Färbeintenstität. Die Auswertung der Ep-CAM- bzw. p185_{HER-2}-Expression erfolgte entsprechend den vorbeschriebenen Kriterien des HercepTest[™]. Die Expressionsstärke und für Ep-CAM auch das Expressionsmuster (homogene vs. heterogene Färbung) sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Pat Nr.	Alter u. Geschle	cht	TNM-Stadium		G	Ep-CAM- Expression	Ep-CAM- Muster	p185 _{HER-2} - Expression	
1	53	М	3	0	0	2	3+	Homogen	0
2	63	М	3	1	0	3	3+	Homogen	0
3	43	F	1	0	0	2	1+	Homogen	0
4	61	F	3	1	1	3	0	Homogen	0
5	64	F	1	0	0	2	1+	Heterogen	1+
6	71	F	3	0	0	2	3+	Homogen	0
7	55	М	2	1	0	2	2+	Heterogen	0
8	61	М	3	0	0	2	1+	Homogen	1+
9	55	М	3	1	0	3	1+	Homogen	0

TABELLE 2: EP-CAM- und $\text{P185}_{\text{HER-2}}\text{-}\text{Expression}$ im untersuchten Kollektiv

Ergebnisse

Pat Nr.	Alter u. Geschlecht		TNM	-Stad	ium	G	Ep-CAM- Expression	Ep-CAM- Muster	p185 _{HER-2} - Expression
10	47	F	3	0	0	2	2+	Heterogen	0
11	61	F	1	0	0	2	2+	Heterogen	0
12	63	F	3	1	1	2	3+	Heterogen	0
13	52	М	2	0	0	2	1+	Heterogen	0
14	59	М	3	1	0	2	1+	Homogen	0
15	66	М	3	1	0	2	1+	Homogen	0
16	47	М	3	1	0	2	3+	Homogen	0
17	68	М	3	1	1	3	3+	Heterogen	2+
18	51	М	3	1	0	2	3+	Homogen	0
19	75	М	1	1	0	2	3+	Homogen	0
20	60	М	3	0	0	2	0	Homogen	0
21	71	F	2	0	0	3	1+	Homogen	1+
22	67	М	3	0	0	2	2+	Homogen	0
23	62	М	3	1	0	2	3+	Heterogen	0
24	56	М	3	1	0	3	3+	Heterogen	0
25	67	М	3	0	0	2	0	Homogen	2+
26	59	F	1	0	0	2	3+	Heterogen	0
27	66	М	3	1	0	2	1+	Homogen	2+
28	67	F	2	0	0	2	0	Homogen	0
29	61	М	2	1	0	3	0	Homogen	3+
30	61	М	3	1	0	3	3+	Homogen	0
31	63	М	2	0	0	2	3+	Heterogen	2+
32	46	М	2	1	0	2	3+	Homogen	0
33	69	F	3	1	0	2	3+	Homogen	2+
34	73	F	1	1	0	3	0	Homogen	0
35	56	М	1	0	0	2	1+	Heterogen	0
36	66	М	1	0	0	2	0	Homogen	2+
37	55	М	3	1	0	2	3+	Heterogen	0
38	74	F	2	0	0	2	3+	Heterogen	0
39	59	М	3	1	0	3	3+	Heterogen	0
40	46	М	3	0	0	2	2+	Heterogen	0
41	65	F	3	1	0	3	1+	Homogen	0
42	43	М	1	0	0	2	3+	Heterogen	2+ ^h
43	59	М	3	1	0	3	3+	Heterogen	3+
44	68	М	3	1	0	2	0	Homogen	0
45	65	М	3	1	0	3	3+	Homogen	0
46	36	М	3	1	0	3	3+	Heterogen	2+
47	72	F	3	0	0	2	1+	Homogen	0
48	58	М	4	1	1	2	1+	Heterogen	0

Ergebnisse

Pat Nr	Alter u.		TNM	-Stad	ium	G	Ep-CAM-	Ep-CAM- Muster	p185 _{HER-2} -
			_			_	Expression		Expression
49	58	M	2	0	0	2	3+	Homogen	0
50	59	F	3	0	0	2	1+	Heterogen	0
51	71	F	3	1	0	2	0	Homogen	0
52	68	М	1	0	0	2	0	Homogen	0
53	70	М	3	1	0	3	3+	Homogen	0
54	71	М	1	1	0	3	2+	Heterogen	0
55	52	М	3	0	0	3	3+	Homogen	0
56	56	М	3	1	0	1	0	Heterogen	0
57	60	М	3	1	0	2	1+	Homogen	0
58	73	М	4	1	1	3	1+	Heterogen	0
59	59	М	1	0	0	2	3+	Heterogen	0
60	65	М	3	0	0	3	1+	Homogen	3+
61	62	F	3	1	0	2	3+	Heterogen	0
62	67	М	3	1	0	2	0	Homogen	0
63	70	М	3	1	0	3	0	Homogen	0
64	59	М	2	0	0	2	2+	Homogen	0
65	69	F	2	0	0	3	0	Homogen	0
66	63	М	3	0	0	2	3+	Homogen	0
67	71	М	1	0	0	2	3+	Heterogen	0
68	61	М	1	0	0	2	0	Homogen	0
69	51	F	1	Nb	0	3	2+	Heterogen	0
70	73	М	3	1	0	3	1+	Homogen	0

^h: Tumor sehr heterogen gefärbt – Nb: nicht bekannt

3.2.1 Ep-CAM-Expression in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen

Alle untersuchten normalen Plattenepithelien zeigten keine Expression von Ep-CAM. Ein solches Fehlen der Ep-CAM-Expression konnte auch bei 15 der 70 untersuchten Plattenepithelkarzinome beobachtet werden. Eine Neo-Expression von Ep-CAM zeigte sich bei 55 Tumoren (79%), wobei drei Expressionsstärken unterschieden werden konnten. Es fanden sich 18 Tumore mit 1+-Expression (26%), 8 Tumore mit 2+- Expression (11%) und 29 Tumore wiesen eine sehr starke Membranfärbung auf (3+, 41%). Auffallend war dabei die Heterogenität der Ep-CAM-Expression, die von der Expressionsstärke unabhängig war (p = 0,134). Auch fanden sich keine Unterschiede im Verteilungsmuster der Ep-CAM-Expression in der Invasionsfront im Vergleich zum Tumorzentrum.

Ergebnisse



ABBILDUNG 5: PAT. NR. 59 - EP-CAM-EXPRESSION: 3+ (20-F. VERGRÖßERUNG)

In der folgenden Tabelle findet sich eine Zusammenfassung der Expression in Bezug auf die histopathologischen Parameter. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Ep-CAM-Expression und pT- oder pN-Stadium sowie Grading ließ sich dabei nicht nachweisen.

		E		p-Wert				
	(n)	0	1+	2+	3+			
pT-Kategorie								
pT1	15	4 (6)	3 (4)	3 (4)	5 (7)	0,581		
pT2	11	3 (4)	2 (3)	2 (3)	4 (6)			
pT3	42	8 (11)	11 (16)	3 (4)	20 (29)			
pT4	2	0	2 (3)	0	0			
pN-Kategorie				T		1		
pN0	33	7 (10)	9 (13)	6 (9)	11 (16)	0,467		
pN1	37	8 (11)	9 (13)	2 (2)	18 (26)			
Differenzierungsgrad								
G1ª/G2	47	10 (14)	12 (17)	6 (9)	19 (27)	0,653		
G3	23	5 (7)	6 (9)	2 (3)	10 (14)			

TABELLE 3: EP-CAM-EXPRESSION UN	id histopathologische Parameter
---------------------------------	---------------------------------

^a G1: nur ein Tumor

3.2.2 p185_{HER-2}-Expression in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen

In der Mehrzahl der Fälle (59 Patienten, 84,3%) ließ sich keine p185_{HER-2}-Expression nachweisen. Es wiesen 56 Patienten (80%) keine (Score 0) und 3 Patienten (4,3%) nur eine schwache, inkomplette Membranfärbung (Score 1+) auf. Eine starke, komplette Membranfärbung bei mehr als 10% der Tumorzellen (Score 3+) wurde bei 3 Patienten (4,3%) beobachtet, in 8 Fällen (11,4%) war die Membranfärbung schwächer ausgeprägt (2+). Bis auf einen Tumor zeigten alle Proben homogene

Färbemuster, die eine eindeutige Klassifizierung ermöglichten. Bei einer Probe (Nr. 42) fand sich eine stark heterogene Membranfärbung (Abb. 7), welche der Kategorie 2+ zugeordnet wurde, da die teils sehr intensive Membranfärbung nicht mehr als 10% der Zellen betraf. Eine bestimmte Polarität der Färbung fand sich bei den untersuchten Proben nicht. Es fanden sich keine Unterschiede der Expression im Bereich der Tumorinvasionsfront im Vergleich mit Abschnitten aus dem Tumorzentrum.



Abbildung 6: Pat. Nr. 60 – p185_{her-2}-Expression 3+ (20-f. Vergrößerung)

Abbildung 7: Pat. Nr. 42 – p185_{Her-2}-Expression 2+ (40-f. Vergrößerung)



Die p185_{HER-2}-Expression korrelierte nicht statistisch signifikant mit dem pTNM-Stadium oder dem Grading. Eine Übersicht der Expression bezüglich der histopathologischen Parameter findet sich in der folgenden Tabelle.

Ergebnisse

		p185 _{HER-2} -Expr		p-Wert		
	(n)	0	1+	2+	3+	
pT-Kategorie	•	-	•	-	-	•
pT1	15	12 (17)	1 (1)	2 (3)	0	0,949
pT2	11	8 (11)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	
pT3	42	34 (53)	1 (1)	5 (7)	2 (3)	-
pT4	2	2 (3)	0	0	0	
pN-Kategorie	•	-	•	-	-	•
pN0	33	25 (36)	3 (4)	4 (6)	1 (1)	0,779
pN1	37	31 (44)	0	4 (6)	2 (3)	
Differenzierungsgrad						
G1ª/G2	47	39 (56)	2(3)	6 (9)	0	0,144
G3	23	17 (24)	1 (1)	2 (3)	3 (4)	

TABELLE 4: P185 _{HER-2}	-Expression u	nd histopathologische Parameter

a G1: nur ein Tumor

3.3 **Prognostischer Einfluß**

Für die Überlebenszeitanalyse waren von 53 der 70 Patienten klinische Nachbeobachtungs-Daten mit einer medianen Nachbeobachtungszeit von 15 Monaten (2 bis 95 Monate) verfügbar.

3.3.1 Prognostischer Einfluß der Ep-CAM- und p185_{HER-2}-Expression

Die Überlebenszeitanalyse zeigte, daß eine generelle Ep-CAM-Expression (Score 1+ bis 3+) nicht mit der Prognose der Patienten korrelierte. Das mediane rezidivfreie Überleben betrug 16 Monate für als 1+ bis 3+klassifizierte Tumoren und 43 Monate für die Tumoren, die keine Ep-CAM-Expression gezeigt hatten (Log-Rang-Test p = 0,5993); auch bezüglich des Gesamtüberlebens fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied (17 Monate vs. 24 Monate, Log-Rang-Test p = 0,3491). Für die 29 Fälle, in denen sich eine starke Ep-CAM-Expression (Score 3+) nachweisen ließ, konnte allerdings sowohl ein signifikant kürzeres rezidivfreies (Ep-CAM-3+: 9 Monate vs. Ep-CAM-0 – 2+: 43 Monate, Log-Rang-Test p = 0,0001) als auch ein verkürztes tumorassoziiertes Gesamtüberleben (Ep-CAM-3+: 11 Monate vs. Ep-CAM-0 – 2+: > 24 Monate, Log-Rang-Test p = 0,0003, Abb. 5) beobachtet werden. In der multivariaten Analyse unter Einschluß von Ep-CAM-Expression (Ep-CAM-3+ vs. Ep-CAM-0 - 2+), Geschlecht, Alter, pT- und pN-Stadium sowie Grading wurde der unabhängige Einfluß einer starken Ep-CAM-Expression für das rezidivfreie und tumorbezogene Überleben nachgewiesen.



Die p185_{HER-2}-Überexpression war im Gegensatz dazu nicht prognostisch signifikant. Das mittlere Überleben betrug 9 Monate für Patienten mit p185_{HER-2}-Überexpression und 20 Monate für nicht überexprimierende Tumoren (Log-Rang-Test p = 0,43). Eine Zusammenfassung der Überlebenszeitanalysen findet sich im Anhang (Tab. 9).

3.3.2 Prognostischer Einfluß der Koexpression von Ep-CAM und p185_{HER-2}

Um zu ermitteln, ob eine p18_{5HER-2}-Koexpression bei Ep-CAM-überexprimierenden Patienten einen zusätzlichen prognostischen Effekt haben könnte, wurde das Kollektiv der Expression entsprechend in drei Gruppen unterteilt: a) Tumoren mit Koexpression von Ep-CAM (3+) und p18_{5HER-2} (2+/3+), b) Tumoren mit Ep-CAM (3+)- oder p18_{5HER-2} (2+/3+)-Überexpression und c) Tumoren mit Ep-CAM (0-2+)- oder p18_{5HER-2} (0-1+)-Expression. Die Analyse der Überlebensdaten zeigte ein signifikant kürzeres mittleres Gesamtüberleben (7 Monate) in der Gruppe der Ep-CAM-p18_{5HER-2}-koexprimierenden Tumoren (n = 4). Das mittlere Gesamtüberleben der anderen beiden Gruppen betrug 15 Monate (Ep-CAM- oder p18_{5HER-2}-Expression) bzw. 28 Monaten (weder Ep-CAM- noch p18_{5HER-2}-Expression) (p < 0,0001).

ABBILDUNG 8: ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT DER EP-CAM-EXPRESSION



ABBILDUNG 9: ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VERSCHIEDENER EXPRESSIONSMUSTER

3.3.3 Prognostischer Einfluß histopathologischer Parameter

In dem untersuchten Kollektiv war die pN-Kategorie prognostisch signifikant. Nodal-positive Patienten zeigten ein medianes Gesamtüberleben von 13 Monaten im Vergleich zu 75 Monaten für Patienten ohne regionale Lympknotenmetasten (Log-Rang-Test p = 0,0170). Bezüglich der pT-Kategorie bestand ein Trend zu kürzerem Gesamtüberleben für fortgeschrittenere Stadien (pT1-2: 28 Monate vs. pT3-4: 16 Monate), statistisch signifikant war dieser Unterschied allerdings nicht (Log-Rang-Test p = 0,1178). Das Grading der untersuchten Tumoren war prognostisch nicht signifikant.

3.4 Ergebnisse der Chromogenen-In-Situ-Hybridisierung (CISH)

Um zu überprüfen, ob die immunhistochemisch festgestellte p185_{HER-2}-Überexpression auf eine Amplifikation des *HER-2*-Gens zurückzuführen ist, wurde für das entsprechende Patientenkollektiv als Zusatzuntersuchung eine Chromogene-in-Situ-Hybridisierung durchgeführt. In einem der elf Fälle gelang trotz mehrfacher Wiederholung keine zufriedenstellende *HER-2*-Hybridisierung. Die Ergebnisse der übrigen zehn Patienten sowie von fünf ebenfalls untersuchten, p185_{HER-2}-negativen Kontrollpatienten sind in Tabelle 5 dargestellt.

Nach den Kriterien von Zhao et al. (2002) sind zwei der drei als 3+ klassifizierten Tumoren aufgrund des hohen Anteils sog. Cluster als hoch-amplifiziert zu werten (Abb. 10 und 11). Von den der Kategorie 2+ zugeordneten Tumoren zeigte nur einer (Nr. 42) eine clusterförmige Genamplifikation in einem sehr begrenzten, aus etwa 150 Zellen bestehenden Areal (Abb. 12); der übrige Tumor zeigte keine Amplifikation. In den übrigen Tumoren ließ sich keine Amplifikation nachweisen, dies gilt auch für die Kontrollproben der p185_{HER-2}-negativen (Score 0 und 1+) Patienten. Ergebnisse

TABELLE 5:	I ABELLE 5: ERGEBNISSE DER CHROMOGENEN IN-SITU-HYBRIDISIERUNG						
Pat. Nr.	HercepTest™	HER-2 (CISH)	Chrom. 17 (CISH)				
5	1	2,9	2,1				
14	0	1,8	2,1				
17	2	4	2,5				
25	2	3,7	2,1				
27	2	2,2	2,6				
29	3	65,5% Cluster	2,9				
31	2	2,5	2,0				
33	2	-	2,8				
36	2	3,5	2,6				
42	2	2,8 ^c	3,2				
43	3	2,7	3,2				
46	2	3,2	2,4				
54	0	2,9	2,3				
58	0	1,7	2,0				
60	3	85,5% Cluster	2,9				
67	0	3,0	2,4				

TABELLE 5: ERGEBNISSE DER CHROMOGENEN IN-SITU-HYBRIDISIERUNG

^c außerdem ein Areal (ca. 150 Zellen) mit ausschließlich Clustern

Abbildung 10 und 11: Pat. Nr. 29 – p185_{her-2}-IHC und *Her-2*-CISH (40-f. Vergrößerung)





Abbildung 12: Pat. Nr. 42 – HER-2-CISH (100-f. Vergrößerung)

4 Diskussion

Ösophaguskarzinome haben generell eine schlechte Prognose. Für operable Plattenepithelkarzinome des Ösophagus existiert bislang keine wirksame adjuvante Therapie, wobei zur Minderung des Rezidivrisikos insbesondere die Unterdrückung des metastastischen Auswachsens disseminierter Tumorzellen entscheidend ist. Neben konventioneller zytostatischer Therapie ist eine Kombination derselben mit Antikörpern plausibel, um auch mitotisch nicht aktive Zellen angreifen zu können. Zwei zu Beginn dieser Arbeit sehr gut untersuchte immuntherapeutische Zielstrukturen einer Antikörper-gestützten Therapie stellen p185_{HER-2} und Ep-CAM dar. Umfangreichere Expressionsanalysen an Platteneptihelkarzinomen des Ösophagus lagen bislang nicht vor.

Aufgabe der Arbeit war daher die Untersuchung dieser möglichen Zielstrukturen. Mit immunhistochemischen Methoden wurde dazu die Expression von p185_{HER-2} und Ep-CAM an 70 Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus untersucht. Für 53 Patienten waren klinische Daten vorhanden, mit denen die Studienergebnisse statistisch korreliert werden konnten, um zu überprüfen, ob die Expression der Proteine für das Kollektiv einen prognostischen Wert hat.

4.1 Ep-CAM als immunologische Zielstruktur

4.1.1 Auswertung analog der Kriterien des HercepTest[™]

Zum Beginn der Arbeit gab es nur eine Studie *(Latza et al. 1990)*, die bei vier untersuchten Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus eine Ep-CAM-Expression nachwies. Standardisierte Auswertungskriterien existierten nicht, so daß die Kriterien des HercepTest[™] verwendet wurden, um die Stärke der Ep-CAM-Expression klassifizieren zu können. Er wurde bei der vorliegenden Studie angewandt, da es sich sowohl bei Ep-CAM als auch bei p185_{HER-2} um membranständige Proteine handelt, der Test standardisiert durchführbar ist und eine Zulassung zur Identifizierung von Patienten für eine Antikörperbehandlung (im Falle einer p185_{HER-2}-Überexpression) vorliegt (s. auch Kap. 2.2.3.2.2).

4.1.2 Eigene Ergebnisse im Literaturkontext

Im gesunden Plattenepithel des Ösophagus wird Ep-CAM nicht exprimiert (*Martin et al. 1999, Quak et al. 1990*). Vor Untersuchung der vorhandenen Plattenepithelkarzinome wurden hier 10 Präparate gesunder Ösophagusmukosa getestet: eine Ep-CAM-Expression ließ sich erwartungsgemäß nicht nachweisen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Ösophaguskarzinome zeigten in 11 % eine schwache (Score 2+) und in 41% eine starke (Score 3+) de novo-Ep-CAM-Expression. Letztgenannte zeigten statistisch ein signifikant verkürztes rezidivfreies und Gesamtüberleben. Die multivariate Analyse bestätigte Ep-CAM als unabhängigen prognostischen Faktor. Eine Korrelation mit dem TNM-Stadium oder dem Grading ließ sich für das untersuchte Kollektiv nicht nachweisen.

Nachgewiesen wurde die Ep-CAM-Expression bisher für einige gesunde, überwiegend glanduläre Gewebe (bspw. Kolonmukosa) und für die Mehrzahl der epithelialen Tumoren (insbesondere colorektale und gastrale Adeno-, Bronchial-, Mamma-, Cervix-, Ovarial- und Harnblasenkarzinome) (*Balzar et al. 1999, Piyathilake et al. 2000, Quack et al. 1990, Xie et al. 2005*).

Die Ergebnisse hinsichtlich des prädiktiven Wertes der Ep-CAM-Expression sind mit den Arbeiten von Gastl und Mitarbeitern (2000, 2002) vereinbar, welche in einer Studie mit 205 Mammakarzinompatientinnen für Ep-CAM-überexprimierende Tumoren eine schlechtere Prognose nachwiesen. Spizzo (2004) zeigte darüberhinaus eine signifikante Korrelation zwischen Ep-CAM-Überexpression und vermindertem Ansprechen auf adjuvante zytostatische und/oder hormonelle Therapie. Die Arbeitsgruppe um Tandon (1990) wies ebenfalls eine Erhöhung des Rezidivrisikos und der Mortalität für Ep-CAM-überexprimierende Mammakarzinome nach. Auch für das Gallenblasenkarzinom konnte die in diesem Fall de novo-Ep-CAM-Expression als unabhängiger prognostischer Marker für das Gesamtüberleben identifiziert werden (Varga *et al. 2004).* Piyathilake und Mitarbeiter (2000) zeigten für das Plattenepithelkarzinom der Lunge eine Korrelation der Ep-CAM-Expression mit dem TNM-Stadium und der Differenzierung, in der Überlebenszeitanalyse konnten in dieser Studie allerdings keine Unterschiede festgestellt werden. Für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome und Ösophaguskarzinome konnte darüberhinaus für den Nachweis als Mikrometastasen zu wertender Ep-CAM-positiver Einzelzellen in histologisch als nodal negativ klassifizierten Lymphknoten eine schlechtere Prognose gezeigt werden (*Hosch et al. 2001, Passlick et al.* 1994).

4.1.3 Ep-CAM-Expression und Tumorverhalten

4.1.3.1 Tumorbiologie

Zell-Zell-Verbindungen sind entscheidend an der Gewebeorganisation zum einen, zum anderen aber auch am Wachstum der einzelnen Zellen, bspw. durch Kontakt-vermittelte Inhibition der Proliferation, beteiligt. Diese Adhäsionsverbindungen werden klassischerweise durch zur Gruppe der Cadherine gehörende Membranproteine (in Epithelgeweben über E-Cadherin) vermittelt, die über β -Catenin oder Plakoglobin (γ -Catenin) an α -Catenin binden, welches wiederum direkt oder über α -Actinin an Actin (und damit fest an das Zytoskelett) bindet (*ausführliche Übersicht bei Nagafuchi 2001*).

Zellkulturexperimente zeigten, daß epitheliale Zellen, deren E-Cadherin-Funktion gestört ist oder *in vitro* inhibiert wurde, einen dedifferenzierten Phänotyp und eine erhöhte Migrationsfähigkeit erwarben. Die häufig beobachtete "Down-Regulation" des E-Cadherins in verschiedenen Tumorentitäten (*Birchmeier und Behrens 1994*) einerseits, die Funktionslosigkeit des in anderen Karzinomen scheinbar korrekt exprimierten Proteins andererseits (*Weidner et al. 1990*), der Nachweis E-Cadherin-negativer Lympknotenmetastasen bei positivem Primarius und nicht zuletzt der Nachweis, daß die *in vitro* bestehende Invasionsfähigkeit E-Cadherin-negativer Zellen durch Transfektion von E-Cadherin cDNA aufgehoben werden konnte, führten zur Interpretation des Membranproteins im Sinne eines "Invasions-Unterdrücker-Moleküls" (*Behrens 1994*).

Die Bedeutung des epithelialen Zell-Adhäsionsmoleküls, welches wie nachfolgend noch ausgeführt werden wird, die genannten Adhäsionsverbindungen modifiziert, wurde in den letzten Jahren intensiv beforscht: nach derzeitigem Kenntnisstand stellt Ep-CAM den Gegenspieler des epithelialen Cadherins dar.

Litvinov und Mitarbeiter wiesen in verschiedenen Zellkulturversuchen Unterschiede in Ep-CAM- und E-Cadherin-vermittelten Adhäsionen nach. So bildeten Ep-CAM-positive Zellen kleinere Aggregate und benötigten für diese Bindung längere Zeiträume (in Suspension: 120 Minuten Ep-CAM vs. 30 Minuten E-Cadherin, dabei Aggregration von 40% der Ep-CAM-positiven Zellen vs. 50-80% der E-Cadherin-positiven Zellen). Entscheidend wurde der Ep-CAM-Einfluß sichtbar, als E-Cadherin-positive Zellen mit Ep-CAM transfiziert wurden: eine erhöhte Ep-CAM-Expression schwächte die E-Cadherin-vermittelte Bindung. Auch bezüglich des durch Zellkontakt gehemmten Zellwachstums fanden sich Unterschiede: E-Cadherin-positive Zellen zeigten eine deutliche Kontaktinhibition, wohingegen dies bei Ep-CAM-positiven Zellen nicht beobachtet werden konnte. Litvinov und Mitarbeiter vermuteten anhand ihrer Daten, daß der Einfluß der Ep-CAM-Expression nicht durch eine Herunterregulation der E-Cadherin-Expression, sondern vielmehr durch eine Schwächung der Fähigkeit stabile Zellverbindungen auszubilden, erklärt werden könnte (*Litvinov et al. 1994 und 1997*). Balzar und Mitarbeiter (*1998, 1999*) konnten schließlich zeigen, daß Ep-CAM und E-Cadherin um die gleichen Bindungsstellen am Zytoskelett konkurrieren.

De Boer (1999) beschrieb die Ep-CAM-Expression bei embryonalem (Ep-CAM-positiv), gesundem adultem (Ep-CAM-negativ) sowie neoplastischem Lebergewebe (Cholangiozelluläres Karzinom Ep-CAM-positiv, Hepatozelluläres Karzinom Ep-CAM-negativ) und zeigte für in Regeneration befindliches Gewebe, daß die Ep-CAM-positiven Vorläuferzellen das Adhäsionsmolekül nicht mehr exprimieren, sobald sie vollständig ausgereift sind. Anderson und Mitarbeiter (1999) untersuchten die Ep-CAM-Expression in Zellinien der Keimbahn und in embryonalen Stammzellen von Mäusen, wobei zu erwähnen ist, daß das Membranprotein von Mensch und Maus in 86% der Aminosäuren übereinstimmt. Sie zeigten eine Ep-CAM-Expression während der Embryo- und Fetogenese sowie bei embryonalen Stammzellen und wiesen außerdem nach, daß Spermatogonien in adulten Testes Ep-CAM exprimieren, wohingegen die reifen Spermatiden Ep-CAM-negativ sind.

Darüberhinaus korreliert die Ep-CAM-Expression positiv mit Markern der Proliferation (CK5, CK14 und Ki-67) sowie negativ mit Markern der (terminalen) Differenzierung (CK13 und Involucrin). In einer Untersuchung physiologisch Ep-CAM-negativer Cervix-Epithelien konnte außerdem eine Korrelation der Ep-CAM-Expression mit dem Grad der intraepithelialen Neoplasie (CIN I-III) gezeigt werden. *(Litvinov et al. 1996, Martin 1999)*.

Die genannten Erkenntnisse führten zur Interpretation von Ep-CAM im Sinne einer flexiblen Zwischenverbindung bei Wachstum und Gewebeorganisation (*Balzar et al. 1998, 1999, Winter et al. 2003*). Der direkte Einfluß der Ep-CAM-Expression auf Zellzyklus und Proliferation konnte erstmals von Münz und Mitarbeitern (2004) nachgewiesen werden. Sie zeigten in Zellkulturen, daß eine de novo-Ep-CAM-Expression in einer vermehrten Synthese des Proto-Onkogens *c-myc* resultiert. *C-myc* ist in verschiedenen Neoplasien (bspw. beim Burkitt-Lymphom und verschiedenen Karzinomen) überexprimiert und reguliert über zahlreiche Ziel-Gene und deren Produkte Zellzyklus, -wachstum und -tod sowie Diffenzierung und Invasionspotential (Übersicht bei Dang 1999). Die Arbeitsgruppe zeigte in *in vitro*-Versuchen außerdem, daß durch Hemmung der Ep-CAM-Expression die zuvor beobachteten Ep-CAM-induzierten Effekte wie Zunahme der metabolischen Aktivität und erhöhte Proliferationsrate reduziert werden konnten. Münz und

39

Mitarbeiter (2005) identifizierten darüberhinaus das epidermale Fettsäuren-bindende Protein (E-FABP), eines der wichtigsten *c-myc*-Ziel-Gene, als Ep-CAM reguliertes Protein. E-FABP spielt eine wichtige Rolle beim Transport und Metabolismus von Fettsäuren. Eine Überexpression findet sich in zahlreichen Tumoren und außerdem bei der durch eine erhöhte Proliferationsrate der Keratinozyten charakterisierten Psoriasis. Der biologische Nutzen einer E-FABP-Überexpression in rasch wachsenden Geweben dürfte zum einen durch den erhöhten Bedarf an Fettsäuren für die Bildung von Zellmembranen und zum andereren durch die Funktion von Fettsäuren und ihrer Metabolite im Rahmen von Signaltransduktionskaskaden erklärt sein.

4.1.3.2 Ep-CAM als prognostischer Marker und therapeutische Zielstruktur

Nach den in Kapitel 4.1.2 geschilderten Beobachtungen bietet die Expressionsanalyse des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls eine Möglichkeit, Patientenpopulationen mit einer schlechteren Prognose (vermindertes krankheitsfreies und Gesamtüberleben, schlechteres Ansprechen auf adjuvante Therapie) zu identifizieren. Die vorgenannten biologischen Zusammenhänge machen das Protein darüberhinaus zu einer möglichen Zielstruktur einer Antikörper-basierten Behandlung, sollte der durch Münz und Mitarbeiter *in vitro* gezeigte Effekt der Reduktion Ep-CAM-vermittelter Effekte (wie Erhöhung von Proliferationsrate und metabolischer Aktivität) durch Hemmung der Ep-CAM-Expression auch *in vivo* reproduzierbar sein.

Auch wenn für das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv keine signifikante Korrelation zwischen Ep-CAM-Expression und TNM-Stadium oder Grading nachgewiesen werden konnte, ist ein Zusammenhang des hier erstmals beschriebenen verkürzten Überlebens bei stark Ep-CAM-positiven Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus mit den erläuterten molekularbiologischen Mechanismen anzunehmen. Tamura und Mitarbeiter (1996) hatten in einer Studie mit 62 Ösophaguskarzinom-Patienten zuvor einen signifikanten Zusammenhang zwischen verminderter E-Cadherin-Expression und verkürztem Überleben beschrieben. Die Ep-CAM-Expression war in dieser Studie nicht untersucht worden. Aufgrund der in Kapitel 4.1.3.1 beschriebenen Bedeutung des epithelialen Adhäsionsmoleküls bei Wachstum und Gewebeorganisation (insbesondere auch als E-Cadherin-Antagonist) ist eine Ep-CAM-assoziierte Verschlechterung der Prognose vorstellbar.

4.1.3.3 Immuntherapie mit anti-Ep-CAM-Antikörpern

Die häufige Expression von Ep-CAM auf epithelialen Tumoren macht das Molekül zu einer attraktiven Zielstruktur einer Antikörper-basierten Therapie und führte zur Entwicklung des ersten therapeutischen Antikörpers Edrecolomab (einem murinen monoklonalen Antikörper der Subklasse IgG_{2a}). Aufgrund des positiven Effekts (reduzierte Rezidivrate und Gesamtmortalität) einer postoperativen Edrecolomab-Behandlung im Vergleich zur alleinigen Operation erfolgte 1994 die Zulassung zur adjuvanten Therapie des operierten Kolonkarzinoms UICC III (*Riethmüller et al. 1994 und 1998*). Da sich in einer randomisierten Phase III-Studie keine Überlegenheit gegenüber alleiniger postoperativer Chemotherapie zeigte (*Punt et al. 2002*), erfolgte 2000 die Marktrücknahme. In einer weiteren klinischen Studie mit an einem nodal negativen Kolonkarzinom (UICC II) operierten Patienten konnte keine Überlegenheit der adjuvanten Edrecolomab-Therapie gegenüber der alleinigen Operation gezeigt werden (*Hartung et al. 2005*).

DISKUSSION

Der potentielle Gewinn einer adjuvanten Therapie mit Edrecolomab gegenüber der konventionellen Chemotherapie wird weiterhin kontrovers diskutiert, so schlagen Spizzo und Mitarbeiter (2003) in Anbetracht des bisher nicht sicher zu beurteilenden Nutzens einer Edrecolomab-Behandlung eine retrospektive Expressionsanalyse der in den bisherigen Studien verwendeten Tumorproben vor. Bei bekannter Heterogenität solider Tumore waren die zu den Kontroversen führenden Beobachtungen womöglich in unterschiedlich ausgeprägter Ep-CAM-Überexpression der Primärtumoren und den (mit der Therapie behandelten) Mikrometastasen begründet, weshalb eine Klassifizierung der Tumoren in niedrig, mäßig und stark exprimierend sowie eine zusätzliche Untersuchung entnommener Lymphknoten sinnvoll wäre, um a) geeignetere Kandidaten für die adjuvante Therapie auszuwählen und b) den Therapieerfolg besser beurteilen zu können.

Da Antikörper im Gegensatz zu Chemotherapeutika auch gegen mitotisch nicht aktive disseminierte Tumorzellen wirken und somit die einzige Möglichkeit darstellen, diese zu eliminieren (*Alliot 2003*), wird der Einsatz von Anti-Ep-CAM-Antikörpern (auch als "Chemoimmmun-Kombination" (*Pantel 2001*)) weiter intensiv beforscht. Eine Minimierung des Rezidivrisikos durch die Beseitigung disseminierter Tumorzellen scheint bei allen Ep-CAM-exprimierenden Tumoren sinnvoll. Für das hier untersuchte Kollektiv gilt das insofern noch verstärkt, als daß für ein sehr ähnliches Kollektiv von Hosch und Mitarbeitern (*2000*) in 59 von 71 als pNo klassifizierten Fällen Ep-CAM-positive Mikrometastasen in den untersuchten Lymphknoten nachgewiesen werden konnten.

Um die beschriebene unerwünschte Arzneimittelnebenwirkung anaphylaktoider Reaktionen (*Adkins et al. 1998*) zu minimieren und unter der (nach derzeitigem Kenntnisstand (*Gruber et al. 2000, Punt et al. 2002*) widerlegten) Vorstellung, die Wirkung des murinen Antikörpers könnte durch die Bildung von gegen das Mausimmunglobulin gerichteten Antikörpern abgeschwächt werden, wurden verschiedene humanisierte Antikörper entwickelt, die im Tierversuch Edrecolomab gleichwertig waren (*Ammons et al. 2003, Huls et al. 1999, Naundorf et al. 2002*) und aufgrund einer verlängerten Halbwertszeit beim Menschen einen noch größeren Effekt erwarten lassen. Zuletzt beschrieben Schlereth und Mitarbeiter (*2005*) im Mausmodell den sehr hohen T-Zell-vermittelten Effekt des konstruierten bispezifischen Ep-CAM/CD3-Antikörpers.

4.2 p185_{HER-2} als immunologische Zielstruktur

4.2.1 Der HercepTest[™] auf cryokonserviertem Material

Da die für diese Arbeit verwendeten Patientenproben in erster Linie cryokonserviert vorlagen, mußte vor Beginn des eigentlichen Versuchs der Nachweis erfolgen, daß der für in Paraffin eingebettete Proben zugelassene HercepTest[™] auch für kryokonserviertes Material verwendet werden kann. Es konnte gezeigt werden, daß die Zellinien SK-BR-3 und MDA-MB-231 nach Einbettung in TissueTec® und anschließender Cryokonservierung im standardisiert durchgeführten HercepTest[™] das gleiche immunhistochemische Färbeverhalten zeigten wie die dem Test zur Positivkontrolle beigefügten Kontroll-Objektträger mit den gleichen, allerdings in Paraffin eingebetteten Zellinien. Demnach ist es möglich, den HercepTest[™] auch für cryokonservierte Patientenproben zur Untersuchung des p185_{HER-2}-Expressionsmusters anzuwenden und für die Auswertung denselben Score anzuwenden.

4.2.2. Eigene Ergebnisse im Literaturkontext

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in 16% der untersuchten Tumoren eine p185_{HER-2}-Überexpression, bei 4% konnte eine Genamplifikation nachgewiesen werden. Die Expression korrelierte nicht mit histopathologischen Parametern. Die p185_{HER-2}-Expression beim plattenepithelialen Ösophaguskarzinom wurde in den letzten Jahren von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. Der Anteil der p185_{HER-2}- überexprimierenden Tumoren wird in der Literatur zwischen 0% und 56% angegeben, so daß das Ergebnis der vorliegenden Arbeit im Bereich anderer neuerer Studienergebnisse liegt.

Für das hier untersuchte Kollektiv konnte wie bei den Arbeitsgruppen von Akamatsu (2003), Hardwick (1997), Lam (1998) sowie Wang (1999) keine Korrelation mit einem schlechteren Überleben gezeigt werden; einzig Mimura und Mitarbeiter (2005) beschrieben die p185_{HER-2}-Expression als prognostischen Faktor. Eine Übersicht über den derzeitigen Stand gibt die Tabelle 6.

Autor	Fallzahl	p185 _{HER-2} -Expression	Prognostischer Wert
Alizzation Martial 2002	24	F.C.0/	Schlechteres Ansprechen auf Radiochemotherapie;
Akamatsu M et al., 2003	34	56%	kein prognostischer Wert für das Überleben
de Castro J et al., 1997	30	10%	Schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie
Chang K et al., 1992	12	25%	Nicht untersucht
Hardwick RH et al., 1997	78	26%	Kein prognostischer Wert
Lam KY et al., 1998	104	10%	Nicht untersucht
Mimura K et al., 2005	66	14%	Signifikant schlechteres Überleben
Suo Z et al., 1995	51	0%	
Suwanagool P et al., 1993	14	0%	
Wang LS et al., 1999	117	28%	Kein prognostischer Wert

TABELLE 6: Immunhistochemischer Nachweis der p $185_{\text{Her-2}}$ -Expression beim Plattenepithel-karzinom des Ösophagus

Der Mechanismus der p18_{5HER-2}-Überexpression beim ösophagealen Plattenepithelkarzinom war zum Beginn der Arbeit noch nicht erforscht. Um eine Genamplifikation als mögliche Ursache der p18_{5HER-2}-Überexpression zu untersuchen, wurde die In-Situ-Hybridisierung mit einer *HER-2*-spezifischen Probe durchgeführt. Wie beim Mammakarzinom (*Pauletti et al. 1996, Slamon et al. 1989*) scheint die Überexpression auch beim Ösophaguskarzinom Folge einer *HER-2*-Genamplifikation zu sein: im untersuchten Kollektiv zeigten zwei der drei stark (3+) überexprimierenden Tumoren eine clusterförmige Amplifikation. In der Gruppe der schwach (2+) exprimierenden Karzinome wies nur ein Tumor eine (ebenfalls clusterförmige) Amplifikation auf, die auf einen etwa 150 Zellen umfassenden Bereich begrenzt war; immunhistochemisch imponierte das betreffende Präparat sehr heterogen.

Diese Ergebnisse ähneln der Studie von Mimura und Mitarbeitern (2005), die bei allen 3+-exprimierenden, homogen gefärbten Tumoren (3/66 Fällen) eine clusterförmige Amplifikation fanden. Von den sechs der der Kategorie 2+ zugewiesenen Karzinomen zeigten nur drei eine Amplifikation und wiederum zwei von diesen eine heterogene p185_{HER-2}-Expression. Auch die Arbeitsgruppen um Ikeda (1996) und Shiga (1993) untersuchten die *HER-2*-Genamplifikation in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus, Expressionsanalysen finden sich in diesen Arbeiten allerdings nicht. Eine Übersicht über die genannten Studien gibt Tabelle 7.

Autor	Fallzahl	Methode	HER-2- Genamplifikation	Prognostischer Wert
lkeda Y et al., 1996	54	Slot-Blot	9%	(Korrelation mit pN-Stadium)
Mimura K et al., 2005	66	FISH	11%	Signifikant schlechteres Überleben
Shiga K et al., 1993	58	Southern Blot	3%	Nicht untersucht

TABELLE 7: UNTERSUCHUNG DER HER-2-GENAMPLIFIKATION BEIM PLATTENEPITHELKARZINOM DES ÖSOPHAGUS

Für die schwach exprimierenden Tumore muß ein anderer zur Überexpression führender Mechanismus als die Genamplifikation diskutiert werden. Zhao und Mitarbeiter *(1996)* vermuteten eine zu starke Sensitivität des im HercepTest[™] verwendeten Antikörpers, die zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte. Für die in der vorliegenden Arbeit etablierte Negativkontrolle der als bekannt p18_{5HER-2}-negativen (Score o) Zellinie MDA-MB-231 konnte ein (falsch-) positives Färbeverhalten nicht nachgewiesen werden. Zu erwähnen ist allerdings, daß die drei im HercepTest[™]-Kit enthaltenen Kontrollen bekannte Scores von 0, 1+ und 3+ aufweisen, eine etablierte 2+-Kontrolle existiert bisher nicht. Abgesehen von möglichen methodischen Fehlerquellen konnte auch für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (*Nakamura et al. 2003*) und für das Zervixkarzinom (*Ngan et al. 2001*) kein klarer Zusammenhang zwischen Expression und Amplifikation nachgewiesen werden. Denkbar sind transkriptionelle oder posttranskriptionelle Regulationsmechanismen (*Hynes et al. 1994, Slamon et al. 1989*). Auch eine häufiger bei schwach als bei stark exprimierenden Tumoren beobachtete Chromosom 17-Polysomie könnte einen Erklärungsansatz bieten (*Mimura et al. 2005, Zhao et al. 1996*).

4.3 Koexpression von Ep-CAM und p185_{HER-2}

In der vorliegenden Arbeit konnte eine aus vier Patienten bestehende Subgruppe mit Ep-CAM- und p185_{HER-2}- koexprimierenden Tumoren identifiziert werden, die sich durch ein deutlich kürzeres Gesamtüberleben (Median 7 Monate) auszeichnete, verglichen mit der Gruppe, die nur eines der beiden Moleküle (15 Monate) oder keines (28 Monate) exprimierte. Spizzo und Mitarbeiter *(2002)* beobachteten für ein Kollektiv von 205 Mammakarzinompatientinnen einen ähnlichen Zusammenhang. In dieser Studie hatten jedoch sowohl Ep-CAM- als auch p185_{HER-2}-Expression allein einen negativen Einfluß auf das Gesamtüberleben; für die Gruppe der koexprimierenden Tumoren konnte darüberhinaus ein additiver Effekt im Sinne eines noch schlechteren Überlebens nachgewiesen werden. Der Verdacht, die Koexpression kennzeichne besonders aggressive Tumoren, liegt daher nahe.

Krebszellen besitzen charakteristische Eigenschaften wie die Fähigkeit, Signale, die normalerweise das Wachstum inhibieren, zu umgehen und autonom zu proliferieren, das Vermögen, in umgebendes Gewebe einzudringen sowie Metastasen in dem Primärtumor fernen Geweben zu setzen und schließlich durch Neovaskularisation die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen sicherzustellen *(Hanahan und Weinberg 2000)*. Der maßgebliche Einfluß des humanen epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors p185_{HER-2} auf alle eben genannten Prozesse wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht.

Holbro und Mitarbeiter (2003) zeigten, daß p185_{HER-2}/HER-3-Heterodimere p185_{HER-2}- überexprimierender Mammakarzinomzellen als onkogene Einheit wirken und über eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI-3K)-Kaskade die Zellen zur ungehinderten Proliferation befähigen. Ein weiterer Effekt des durch die Wachstumsfaktorrezeptoren aktivierten PI-3K-Signalweges ist das Überleben der Zelle, da die PI-3K direkt verschiedene apoptotische Prozesse kontrolliert. Zhou und Mitarbeiter (2000) konnten zeigen, daß p185_{HER-2}-überexprimierende Zellreihen resistent gegenüber TNF-α-induzierter Apoptose sind.

Eine wesentliche Rolle bezüglich des Erwerbs von Migrations- und Invasionsfähigkeit von Krebszellen spielt die Mitogen aktivierte Protein-Kinase (MAPK)-Kaskade. Spencer und Mitarbeiter (2000) belegten die entscheidende Rolle von p185_{HER-2} bei der MAPK-Kinase-vermittelten Invasionsinduktion.

Maity und Mitarbeiter (2000) wiesen in einer Glioblastomzellreihe nach, daß die Aktivierung der beiden genannten Signalwege (PI-3K- und MAPK-Kaskade) darüberhinaus die Produktion proangiogenetischer Faktoren, insbesondere des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), bewirkt. Dieser Mechanismus war in der genannten Studie unabhängig von der Hypoxie-induzierten Kaskade. Versuche mit dem p18_{5HER-2}-Antikörper Trastuzumab zeigten im Vergleich zu einem Kontrollantikörper eine signifikante Reduktion proangiogenetischer Faktoren (bpsw. VEGF, TNF- α , Angiopoetin-1 und Plasminogenaktivator-Inhibitor-1), eine Erhöhung des anti-angiogenetisch wirkenden Thrombospondin-1 sowie eine Verkleinerung der Blutgefäße und der Tumorgröße (*Izumi et al. 2002*).

Die hier beschriebenen, maligne Zellen kennzeichnenden Merkmale sind entsprechend der vorgenannten Arbeiten in der Gesamtschau der an der Karzinogenese beteiligten Mechanismen zumindest anteilig als p185_{HER-2}-induzierte Veränderungen zu interpretieren.

Wie bereits erwähnt konnte in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Korrelation der p185_{HER-2}-Expression mit Markern der Invasions- oder Metastasierungsfähigkeit (TNM-Stadium, Grading) gezeigt werden; der in der Überlebenszeitanalyse beobachtete negative Effekt einer Koexpression von Ep-CAM und p185_{HER-2} ist dennoch mit den geschilderten molekularbiologischen Zusammenhängen vereinbar.

Abgesehen vom Einfluß des p185_{HER-2} auf die genannten Signaltransduktionswege gibt es Hinweise auf eine direkte Interaktion des Rezeptors mit E-Cadherin *(Ochiai et al. 1994)*. De Castro und Mitarbeiter *(1997)* fanden im untersuchten Kollektiv von 30 Ösophaguskarzinomen in 86% der Fälle eine Reduktion der E-Cadherin-Expression auf weniger als die Hälfte, 10% der untersuchten Tumoren zeigten eine p185_{HER-2}-Überexpression (eine statistische Korrelation der beiden Parameter war in der Studie nicht vorgenommen worden). Der auch in der präsentierten Arbeit in Bezug auf die Aggressivität der Ep-CAM- und p185_{HER-2}-koexprimierenden Tumoren nachgewiesene additive Effekt könnte daher auch auf dem Einfluß auf einen – noch zu beforschenden – gemeinsamen Signalweg von Ep-CAM und p185_{HER-2} beruhen *(Spizzo et al. 2002)*.

44

4.4 Ausblick

Die Überlebensraten des Ösophaguskarzinoms gehören zu den schlechtesten aller Krebserkrankungen. Eine intensive Modifizierung der Therapieregime hat in den letzten Jahrzehnten zwar zu einer deutlichen Verbesserung der mittleren 5-Jahres-Überlebensraten von weniger als 5% auf etwa 30% geführt und stadienabhängig (UICC I) werden sogar Raten von bis zu 90% berichtet. Nichtsdestotrotz scheinen chirurgische Therapiemaßnahmen das Limit erreicht zu haben (*Lerut et al. 2001*), daher werden multimodale Regime intensiv beforscht.

In der Zukunft könnten präzisere Diagnosen und Staginguntersuchungen bei der Definition der potentiell kurativ zu behandelnden Patienten einerseits und der Abwägung therapeutischer Strategien anderseits helfen. Dazu sind weitere (über das UICC-Stadium hinausgehende) prognostische Faktoren und ein noch besseres Verständnis der Tumorbiologie von entscheidender Bedeutung *(ebd.)*.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Ep-CAM-Expression als unabhängigen prognostischen Faktor und mögliche therapeutische Zielstruktur. Theoretisch ist damit eine Risikostratifizierung auch unter Mitbeurteilung der mit einem signifikant kürzeren Überleben einhergehenden Ep-CAM-p185_{HER-2}-Koexpression möglich. Dies müßte allerdings an größeren Kollektiven bestätigt werden. Darüberhinaus sollte der – theoretisch äußerst vielversprechende – Effekt einer Immuntherapie bspw. mit dem bereits existierenden anti-Ep-CAM-Antikörper Edrecolomab oder humanisierten Nachfolgern in klinischen Studien untersucht werden. Im Rahmen individueller Therapiekonzepte ist auch eine Kombinationstherapie mit dem anti-p185_{HER-2}-Antikörper Trastuzumab vorstellbar, wenn der Primärtumor beide Zielstrukturen exprimiert.

5 Anhang

5.1 Materialien, Puffer, Lösungen, Geräte und Softwar

5.1.1 Materialien

AB-Serum (Biotest, Dreieich) Ethanol 70 -ig, 95 -ig, 100 ig (Roth, Karlsruhe) Aquatex® (Merck, Darmstadt) BerEP4 (Dako, Hamburg) BSA (Roche, Mannheim) Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) Entellan[®] (Merck, Darmstadt) Eosin (Sigma, Deisenhofen) DAKO Kit No. K5204 (mit Peroxidase-Blockierungsreagenz, Rabbit Anti-Human-Ak, Negativ-Kontroll-Ak, Visualisierungs-Reagenz, DAB-gepuffertem Substrat, DAB-Chromogen, Epitop Retrieveal-Lösung, Waschpuffer) (Dako, Hamburg) DAB (Set aus Chromogen und Puffer) (Sigma, USA) DAKO Fettstift (Dako, Hamburg) DAKO X0907 Ziegen-Normal-Serum (Dako, Hamburg) DAKO Z0259 Kaninchen-anti-Maus-IgG (Dako, Hamburg) Fixogum (Marabu, Tamm) FKS (Invitrogen, Karlsruhe) Gentamycin (Biochrom KG, Berlin) Gill's Hämatoxilin (Sigma, Deisenhofen) L-Glutamin (Sigma, Deisenhofen) Hämatoxylin-Eosin-Lösung (Sigma, Deisenhofen) H₂O₂ (Sigma, Deisenhofen) Hybrisol® (Oncor, Gaithersburg, USA) Insulin (Sigma, Deisenhofen) Leibovitz's L-15-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) Levamisole (Sigma, Deisenhofen) Mayer's Hämatoxilin (Sigma, Deisenhofen) MDA-MB-231 (ATCC® American Type Culture Collection, Manassas, USA) Maus-anti-Digoxigenin (Roche, Mannheim) McCoy's Medium (Invitrogen, Karlsruhe) Methanol (Merck, Darmstadt) MOPC 21 (Sigma, Deisenhofen) Naphtol-bi-Phosphat (Merck, Darmstadt) Natriumchlorid (Merck, Darmstadt) Natriumcitrat (Merck, Darmstadt) Natriumnitrit (Merck, Darmstadt) Natriumthiocyanat (Sigma, Deisenhofen) Neufuchsin (Merck, Darmstadt) PBS (Sigma, Deisenhofen) Penicillin (Biochrom KG, Berlin) Pepsin (Sigma, Deisenhofen) Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)

Roti-Histol (Roth, Karlsruhe) RPMI 1640 (ohne L-Glutamin) Invitrogen, Karlsruhe SK-BR-3 (ATCC® American Type Culture Collection, Manassas, USA) Spot-Light® Chromosome 17 Centromeric Probe (Zymed, San Francisco, USA) Streptavidin-Peroxidase (Jackson Immunosearch Laboratories Inc., Baltimore, USA) Streptomycin (Biochrom, Berlin) Superfrost Plus® OT (Menzel Gläser, Braunschweig) TissueTec® (Vogel, Gießen) Transferrin (Sigma, Deisenhofen) Tris (Sigma, Deisenhofen) Trypsin/EDTA (Sigma, Deisenhofen) Tween (Sigma, Deisenhofen) Xylol (Roth, Karlsruhe) Ziege-anti-Maus-Biotin (Sigma, Deisenhofen)

5.1.2 Puffer und Lösungen

APAAP-Substrat:

Für eine Küvette: 300µl Neufuchsin-Gebrauchslösung ("Lösung 4" (aus 5 g Neufuchsin + 100 ml 2N HCl) in "Lösung 3" (300 mg Natriumnitrit + 7,5 ml A.dest) geben, 1 min reagieren lassen. Anschließend zusammen mit "Lösung 2" (25 mg Naphtol-bi-Phosphat + 0,75 ml Dimethylformamid) in die "Lösung 1" (60 mg Levamisole + 150 ml Tris-Puffer) geben, schütteln, filtrieren und lichtgeschützt aufbewahren.

Citrat-Puffer: 11 Gebrauchslösung: 2,94 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat; pH-Einstellung auf 6

Tris-Puffer: 1l Gebrauchslösung: 6 g Tris, 8,5 g NaCl, ca. 40 ml 2N HCl; pH-Einstellung auf 8,2

20xSSC: 3M NaCl, 0,3M Na₃Citrat; pH-Einstellung auf 7,0

5.1.3 Geräte und Software

Brutschrank (Heraeus 6000) Cryotom (Leica Jung Frigocut 2800E) Mikrotom (Leica RM 2025) Phasenkontrastmikroskop (Leica) SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA)

5.2 Tabellen

TABELLE 8: PATIENTENKOLLEKTIV

PatNr.	Alter	Geschlecht	рТ	рN	м	G	Tod durch Tumor	Tod durch andere Ursache [*]	Follow- Up ^{**}
1	53	М	3	0	0	2	Ja	Nein	75
2	63	М	3	1	0	3	Ja	Nein	20
3	43	F	1	0	0	2	Nein	Nein	95
4	61	F	3	1	1	3	Ja	Nein	8
5	64	F	1	0	0	2	Nein	Nein	90
6	71	F	3	0	0	2	Nein	Ja	2
7	55	М	2	1	0	2	Nein	Nein	67
8	61	М	3	0	0	2	Nein	Nein	88
9	55	М	3	1	0	3	Ja	Nein	9
10	47	F	3	0	0	2	Ja	Nein	23
11	61	F	1	0	0	2	Nein	Nein	86
12	63	F	3	1	1	2	Nb	Nb	9
13	52	М	2	0	0	2	Ja	Nein	24
14	59	М	3	1	0	2	Nein	Nein	17
15	66	М	3	1	0	2	Ja	Nein	3
16	47	М	3	1	0	2	Ja	Nein	13
17	68	М	3	1	1	3	Ja	Nein	5
18	51	М	3	1	0	2	Ja	Nein	15
19	75	М	1	1	0	2	Ja	Nein	15
20	60	М	3	0	0	2	Nein	Nein	1
21	71	F	2	0	0	3	Ja	Nein	11
22	67	М	3	0	0	2	Nein	Nein	70
23	62	М	3	1	0	2	Ja	Nein	11
24	56	М	3	1	0	3	Ja	Nein	6
25	67	М	3	0	0	2	Nein	Ja	1
26	59	F	0	0	0	2	Nein	Nein	48
27	66	М	3	1	0	2	Nb	Nb	4
28	67	F	2	0	0	2	Nein	Ja	1
29	61	М	2	1	0	3	Ja	Nein	24
30	61	М	3	1	0	3	Ja	Nein	13
31	63	М	2	0	0	2	Ja	Nein	8
32	46	М	2	1	0	2	Ja	Nein	8
33	69	F	3	1	0	2	Nb	Nb	Nb
34	73	F	1	1	0	3	Nein	Nein	34
PatNr.	Alter	Geschlecht	рТ	рN	М	G	Tod durch Tumor	Tod durch andere Ursache [*]	Follow- Up ^{**}

Anhang

-									
35	56	М	1	0	0	2	Nein	Nein	28
36	66	М	1	0	0	2	Nein	Nein	48
37	55	М	3	1	0	2	Nein	Ja	1
38	74	F	2	0	0	2	Nein	Ja	8
39	59	М	3	1	0	3	Nein	Ja	1
40	46	М	3	0	0	2	Ja	Nein	6
41	65	F	3	1	0	3	Nein	Nein	5
42	43	М	1	0	0	2	Ja	Nein	9
43	59	М	3	1	0	3	Ja	Nein	7
44	68	М	3	1	0	2	Nein	Ja	0
45	65	М	3	1	0	3	Ja	Nein	6
46	36	М	3	1	0	3	Ja	Nein	4
47	72	F	3	0	0	2	Nein	Nein	1
48	58	М	4	1	1	2	Nein	Ja	5
49	58	М	2	0	0	2	Nein	Ja	1
50	59	F	3	0	0	2	Nein	Ja	13
51	71	F	3	1	0	2	Ja	Nein	2
52	68	М	1	0	0	2	Ja	Nein	16
53	70	М	3	1	0	3	Ja	Nein	16
54	71	М	1	1	0	3	Nein	Nein	16
55	52	М	3	0	0	3	Ja	Nein	13
56	56	М	3	1	0	1	Nein	Nein	34
57	60	М	3	1	0	2	N.b.	N.b.	4
58	73	М	4	1	1	3	Nein	Ja	1
59	59	М	1	0	0	2	Nein	Nein	31
60	65	М	3	0	0	3	Nein	Nein	29
61	62	F	3	1	0	2	Ja	Nein	0
62	67	М	3	1	0	2	Nein	Nein	23
63	70	М	3	1	0	3	Nein	Nein	18
64	59	М	2	0	0	2	Nein	Nein	22
65	69	F	2	0	0	3	Nein	Ja	0
66	63	М	3	0	0	2	Ja	Nein	17
67	71	М	1	0	0	2	Ja	Nein	8
68	61	М	1	0	0	2	Ja	Nein	13
69	51	F	1	Nb	0	3	Nein	Nein	10
70	73	М	3	1	0	3	Nein	Nein	15

*: auch perioperativ - **: in Monaten - Nb: nicht bekannt

TABELLE 9: MULTIVARIATE ÜBE	ERLEBENSZEITANALYSEN
TABELLE 9: MULTIVARIATE UBE	ERLEBENSZEITANALYSEN

Variable	Relatives Todesrisiko (CI 95%)	p-Wert
Rezidivfreies Überleben		
Alter		0,614
≤ 65 J. vs. > 65 J.		
Tumorgröße		0,217
pT1-2 vs. pT3-4		
Lymphknotenmetastasen	2,481 (1,100 - 5,594)	0,031
pN1 vs. pN0		
Tumordifferenzierung		0,364
G1/2 vs. G3		
Ep-CAM-Expression	4,465 (1,997 - 9,983)	< 0,001
0-2+ vs. 3+		
Tumorabhängiges Überleben		
Alter		0,707
≤ 65 J. vs. > 65 J.		
Tumorgröße		0,124
pT1-2 vs. pT3-4		
Lymphknotenmetastasen	2,468 (1,902 - 5,657)	0,019
pN1 vs. pN0		
Tumordifferenzierung		0,350
G1/2 vs. G3		
Ep-CAM-Expression	3,790 (1,714 - 8,381)	< 0,001
0-2+ vs. 3+		

5.3 Abkürzungsverzeichnis

- Ag Antigen
- Ak Antikörper
- APAAP Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase-Technik
- BSA Bovines Serumalbumin
- CI Konfindenzintervall
- CIN cervikale intraepitheliale Neoplasie
- CISH Chromogene In-situ-Hybridisierung
- CK Cytokeratin
- c-myc zelluläres menschliches Myelocytomatose Epitop
- EGF epidermal growth factor
- EGFR epidermal growth factor receptor
- E-FABP epidermales Fettsäuren-bindendes Protein

Ep-CAM epitheliales Zelladhäsionsmolekül

- FISH Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung
- FKS Fetales Kälberserum
- HE Hämatoxylin-Eosin
- IHC Immunhistochemie
- ISH In-situ-Hybridisierung
- Ki-67 Kiel-67 (Proliferationsmarker)
- MAPK Mitogen aktivierte Protein-Kinase
- PBS "Phosphate buffered saline" (Phosphatgepufferte Natriumchloridlösung)

	PF.	A	Paraformaldehyd	
	PI-	3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase	
	ΤK	R	Tyrosin-Kinase-Rezeptor	
	OT		Objektträger	
	SSC		"Saline Sodium Citrate" (Natriumchlorid-Citrat-Puffer)	
	ΤN	F	Tumornekrosefaktor	
	VE	GF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor	
	UIC	CC	Union International Contre Cancer	
54	Tal	heller	werzeichnis	
5.4	i ui	Jener		
Tabelle	1:	Krite	rien des HercepTest™	20
Tabelle	2:	Ep-C	AM- und p185 _{HER-2} -Expression im untersuchten Kollektiv	27
Tabelle	3:	Ep-C	AM-Expression und histopathologische Parameter	30
Tabelle	4:	p185	HER-2-Expression und histopathologische Parameter	32
Tabelle	5:	Erge	bnisse der Chromogenen In-Situ-Hybridisierung	35
Tabelle	6:	Imm	unhistochemischer Nachweis der p185 _{HER-2} -Expression beim	
		Platt	enepithelkarzinom des Ösophagus	42
Tabelle	7:	Unte	rsuchung der HER-2-Genamplifikation beim Plattenepithelkarzinom	
		des Ö	Òsophagus	43
Tabelle	8:	Patie	entenkollektiv	48

Tabelle 0.	Ιαμειμεικομεκών	40
Tabelle 9:	Multivariate Überlebenszeitanalysen	50

5.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 und 2:	MDA-MB-231 – eigene Zellkultur (cryo) – Dako-Kit (Paraffin)	26
Abbildung 3 und 4:	SKBR-3 – eigene Zellkultur (cryo) – Dako-Kit (Paraffin)	26
Abbildung 5:	Pat. Nr. 59 – Ep-CAM-Expression: 3+ (20-f. Vergrößerung)	30
Abbildung 6:	Pat. Nr. 60 – p185 _{HER-2} -Expression 3+ (20-f. Vergrößerung)	31
Abbildung 7:	Pat. Nr. 42 – p185 _{HER-2} -Expression 2+ (40-f. Vergrößerung)	31
Abbildung 8:	Überleben in Abhängigkeit der Ep-CAM-Expression	33
Abbildung 9:	Überleben in Abhängigkeit verschiedener Expressionsmuster	34
Abbildung 10 und 11:	Pat. Nr. 29 – p185 _{HER-2} -IHC und <i>HER-2</i> -CISH (40-f. Vergrößerung)	35
Abbildung 12:	Pat. Nr. 42 – <i>HER-2-</i> CISH (100-f. Vergrößerung)	36

6 Literaturverzeichnis

Adkins JC, Spencer CM. Edrecolomab (monoclonal antibody 17-1A). Drugs. 1998;56(4):619-626.

- Ahsan H, Neugut AI, Gammon MD. Association of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus with tobacco-related and other malignancies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1997;6(10):779-782.
- Akamatsu M, Matsumoto T, Oka K, Yamasaki S, Sonoue H, Kajiyama Y, Tsurumaru M, Sasai K. c-erbB-2 oncoprotein expression related to chemoradioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003;57(5):1323-1327.
- Alliot C. Edrecolomab in the adjuvant treatment of colorectal carcinoma. Lancet. 2003;361(9351):82.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2004). Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends. 4. überarbeitete, aktualisierte Auflage, Saarbrücken 2004.
- Ammons WS, Bauer RJ, Horwitz AH, Chen ZJ, Bautista E, Ruan HH, Abramova M, Scott KR, Dedrick RL. In vitro and in vivo pharmacology and pharmacokinetics of a human engineered monoclonal antibody to epithelial cell adhesion molecule. Neoplasia. 2003;5(2):146-154.
- Arnould L, Denoux Y, MacGrogan G, Penault-Llorca F, Fiche M, Treilleux I, Mathieu MC, Vincent-Salomon A, Vilain MO, Couturier J. Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. Br J Cancer. 2003;88(10):1587-1591.
- Balzar M, Bakker HA, Briaire-de-Bruijn IH, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. Mol Cell Biol. 1998;18(8):4833-4843.
- Balzar M, Prins FA, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM. Exp Cell Res. 1999;246(1):108-121.
- 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.
- Bareiß D, Stabenow R, Muller R, Eisinger B, Stegmaier C, Daubler P, Zeitz M, Scherubl H. Aktuelle Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms und des Kardiakarzinoms in Deutschland. Dtsch Med Wochenschr. 2002;127(25-26):1367-1374.
- Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IC, Norton L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neuoverexpressing metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 1996;14(3):737-744.
- Behrens J. Cadherins as determinants of tissue morphology and suppressors of invasion. Acta Anat (Basel). 1994;149(3):165-169.
- Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. Biochim Biophys Acta. 1994;1198(1):11-26.
- Boenisch MS (Hrsg.). Handbuch Immunchemische Färbemethoden (2003). 3. Auflage, DakoCytomation.
- de Boer, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. J Pathol. 1999;188(2):201-206.
- Bollschweiler E, Holscher AH. Aktuelle Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms in Deutschland. Onkologie. 2001;24(2):180-184.
- Brezicka T. Expression of epithelial-cell adhesion molecule (Ep-CAM) in small cell lung cancer as defined by monoclonal antibodies 17-1A and BerEP4. Acta Oncol. 2005;44(7):723-727.
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185_{HER-2} antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 4285-4289.

- de Castro J, Gonzaez Baron M, J Feliu, C Gamallo, A Ordonez, E Espinosa, P Zamoraw. Predictive value of p53, E-cadherin and erb-B2 in patients with squamous cell esophageal carcinoma (Meeting abstract). ASCO 1997 Meeting abstract.
- Chang K, Pastan I, Willingham MC. Frequent expression of the tumor antigen CAK1 in squamous-cell carcinomas. Int J Cancer. 1992;51(4):548-554.
- Ciocca DR, Fujimura FK, Tandon AK, Clark GM, Mark C, Lee-Chen GJ, Pounds GW, Vendely P, Owens MA, Pandian MR, et al. Correlation of HER-2/neu amplification with expression and with other prognostic factors in 1103 breast cancers. J Natl Cancer Inst. 1992;84(16):1279-1282.
- Cohen JA, Weiner DB, More KF, Kokai Y, Williams WV, Maguire HC Jr, LiVolsi VA, Greene MI. Expression pattern of the neu (NGL) gene-encoded growth factor receptor protein (p185neu) in normal and transformed epithelial tissues of the digestive tract. Oncogene. 1989;4(1):81-88.
- Cordell JL, Falini B, Erber WN et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J. Histochem.Cytochem. 1984; 32(2): 219–229.
- Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science. 1985;230(4730):1132-1139.
- Dang CV. C-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. Mol Cell Biol 1999;19(1):1-11.
- van Diest PJ, van Dam P, Henzen-Logmans SC, Berns E, van der Burg ME, Green J, Vergote I. A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Gynaecological Cancer Cooperative Group. J Clin Pathol. 1997;50(10):801-804.
- Dowsett M, Cooke T, Ellis I, Gullick WJ, Gusterson B, Mallon E, Walker R. Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? Eur J Can 2000; 36: 170-176.
- Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. N Engl J Med. 2003;349(23):2241-2252.
- Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proceedings of the National Academy of Science USA 1969; 63: 378-383.
- Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dunser M, Mikuz G. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. Lancet. 2000;356(9246):1981-1982.
- Göttlinger HG, Funke I, Johnson JP, Gokel JM, Riethmuller G. The epithelial cell surface antigen 17-1A, a target for antibody-mediated tumor therapy: its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies. Int J Cancer. 1986;38(1):47-53.
- Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signalling. The EMBO Journal 1997; 16: 1647-1655.
- Greer SE, Goodney PP, Sutton JE, Birkmeyer JD. Neoadjuvant chemoradiotherapy for esophageal carcinoma: a meta-analysis. Surgery. 2005;137(2):172-177.
- Gruber R, van Haarlem LJ, Warnaar SO, Holz E, Riethmuller G. The human antimouse immunoglobulin response and the anti-idiotypic network have no influence on clinical outcome in patients with minimal residual colorectal cancer treated with monoclonal antibody CO17-1A. Cancer Res. 2000;60(7):1921-1926.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70.
- Hardwick RH, Barham CP, Ozua P, Newcomb PV, Savage P, Powell R, Rahamin J, Alderson D. Immunohistochemical detection of p53 and c-erbB-2 in oesophageal carcinoma; no correlation with prognosis. Eur J Surg Oncol. 1997;23(1):30-35.

- Hartung G, Hofheinz RD, Dencausse Y, Sturm J, Kopp-Schneider A, Dietrich G, Fackler-Schwalbe I, Bornbusch D, Gonnermann M, Wojatschek C, Lindemann W, Eschenburg H, Jost K, Edler L, Hochhaus A, Queisser W. Adjuvant therapy with edrecolomab versus observation in stage II colon cancer: a multicenter randomized phase III study. Onkologie. 2005;28(6-7):347-350.
- Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF 3rd, Hynes NE. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(15):8933-8938.
- Hosch SB, Stoecklein NH, Pichlmeier U, Rehders A, Scheunemann P, Niendorf A, Knoefel WT, Izbicki JR. Esophageal cancer: the mode of lymphatic tumor cell spread and its prognostic significance. J Clin Oncol. 2001;19(7):1970-1975.
- Hosch S, Kraus J, Scheunemann P, Izbicki JR, Schneider C, Schumacher U, Witter K, Speicher MR, Pantel K. Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. Cancer Res. 2000;60(24):6836-6840.
- Huls GA, Heijnen IA, Cuomo ME, Koningsberger JC, Wiegman L, Boel E, van der Vuurst de Vries AR, Loyson SA, Helfrich W, van Berge Henegouwen GP, van Meijer M, de Kruif J, Logtenberg T. A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phagedisplayed antibody fragments. Nat Biotechnol 1999;17(3):276-281
- Hynes NE, Stern DF. The Biology of erbB-2/neu HER-2 and its role in cancer. Biochim Biophys Acta. 1994;1198(2-3):165-184.
- Hynes RO, Lander AD. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. Cell. 1992;68(2):303-322.
- Ikeda Y, Ozawa S, Ando N, Kitagawa Y, Ueda M, Kitajima M. Meanings of c-erbB and int-2 amplification in superficial esophageal squamous cell carcinomas. Ann Thorac Surg. 1996 Sep;62(3):835-838.
- Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. Nature. 2002;416(6878):279-280.
- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. CA Cancer J Clin. 2005;55(1):10-30.
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature. 1969; 223: 582-587.
- Joos S, Fink TM, Rätsch A, Lichter P. Mapping and chromosome analysis: the potential of fluorescence in situ hybridization. Journal of Biotechnology. 1994;35:135-153.
- Kassenärztliche Bundesvereinigung. Deutsches Ärzteblatt. 2002;44:A2966-2967.
- Kirchner EM, Gerhards R, Voigtmann R. Sequential immunochemotherapy and edrecolomab in the adjuvant therapy of breast cancer: reduction of 17-1A-positive disseminated tumour cells. Ann Oncol. 2002;13(7):1044-1048.
- Koshy M, Esiashvilli N, Landry JC, Thomas CR, Matthews RH. Multiple Management Modalities in Esophageal Cancer: Combined Modality Management Approaches. Oncologist 2004;9(2):147-159.
- Kok TC, van der Gaast A, Splinter TA. 13-cis-retinoic acid and alpha-interferon in advanced squamous cell cancer of the oesophagus. Eur J Cancer. 1997;33(1):165-166.
- Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(23):9193-9197.
- Lam KY, Tin L, Ma L. C-erbB-2 protein expression in oesophageal squamous epithelium from oesophageal squamous cell carcinomas, with special reference to histological grade of carcinoma and preinvasive lesions. Eur J Surg Oncol. 1998;24(5):431-435.
- Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H, Stein H. Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial. J Clin Pathol. 1990;43(3):213-219.

- Lerut T, Coosemans W, Decker G, De Leyn P, Nafteux P, Van Raemdonck D. Cancer of the esophagus and gastro-esophageal junction: potentially curative therapies. Surg Oncol. 200;10(3):113-122.
- Lindl T (Hrsg.): Zell- und Gewebekultur (2002). 5. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Linnenbach AJ, Seng BA, Wu S, Robbins S, Scollon M, Pyrc JJ, Druck T, Huebner K. Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. Mol Cell Biol. 1993;13(3):1507–1515.
- Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. J Cell Biol. 1994;125(2):437-446.
- 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. Am J Pathol. 1996;148(3):865-875.
- Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Prins F, Fleuren GJ, Warnaar SO. Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. J Cell Biol. 1997;139(5):1337-1348.
- Madrid MA, Lo RW. Chromogenic in situ hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/neu status. Breast Cancer Res. 2004;6(5):R593-600.
- Malthaner RA, Wong RWS, Rumble RB, Zuraw L. Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: a systemic review and meta-analysis. BMC Med. 2004;2(1):35.
- Martin IG, Cutts SG, Birbeck K, Gray S, Quirke P. Expression of the 17-1A antigen in gastric and gastrooesophageal junction adenocarcinomas: a potential immunotherapeutic target? J Clin Pathol. 1999;52(9):701-704.
- Messmann H. Squamous cell cancer of the oesophagus. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2001;15(2):249-265.
- Mimura K, Kono K, Hanawa M, Mitsui F, Sugai H, Miyagawa N, Ooi A, Fujii H. Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer. 2005;92(7):1253-1260.
- Münz M, Zeidler R, Gires O. The tumour-associated antigen EpCAM upregulates the fatty acid binding protein E-FABP. Cancer Lett. 2005;225(1):151-157.
- 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):5748-5458.
- Nakamura H, Saji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, Kato H. Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer. Int J Cancer. 2003;103(1):61-66.
- Nagafuchi A. Molecular architecture of adherens junctions. Curr Opin Cell Biol. 2001;13(5):600-603.
- Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Venturo I, Slamon DJ, Fendly BM, Ullrich A. Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. Int J Cancer. 1990;45(3):457-461.
- Naundorf S, Preithner S, Mayer P, Lippold S, Wolf A, Hanakam F, Fichtner I, Kufer P, Raum T, Riethmuller 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.
- Ngan HY, Cheung AN, Liu SS, Cheng DK, Ng TY, Wong LC. Abnormal expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 in squamous cell carcinoma of the cervix: correlation with human papillomavirus and prognosis. Tumour Biol. 2001;22(3):176-183.
- Ochiai A, Akimoto S, Kanai Y, Shibata T, Oyama T, Hirohashi S. c-erbB-2 gene product associates with catenins in human cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 1994;205(1):73-78.

- 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 Res. 2004;64(16):5818-5824.
- Pantel K. In: Kneba M, Dreger P, Pantel K (Hrsg.): Antikörpertherapie in der Hämatologie und Onkologie (2001). 1. Auflage, Uni-Med Verlag Bremen, London, Boston.
- Patel M, Ferry K, Franceschi D, Kaklamanos I, Livingstone A, Ardalan B. Esophageal carcinoma: current controversial topics. Cancer Invest. 2004;22(6):897-912.
- Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. Oncogene. 1996;13(1):63-72.
- Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA, Slamon DJ. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neuoverexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. J Clin Oncol. 1998;16(8):2659-2671.
- 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, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschoff J, Suto T, Greatorex 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. N Engl J Med. 2005;353(16):1659-1672.
- Piyathilake CJ, Frost AR, Weiss H, Manne U, Heimburger DC, Grizzle WE. The expression of Ep-CAM (17-1A) in squamous cell cancers of the lung. Hum Pathol. 2000;31(4):482-487.
- Plowman GD, Culouscou JM, Whitney G et al. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:1746-1750.
- Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. Genomics 1989;4(3): 362-366.
- Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. Cancer Res. 1994 May 15;54(10):2771-2777. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. Oncogene. 1990;5(7):953-962.
- 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, sMacGregor S. Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study. Lancet. 2002;360(9334):671-677.
- Quak JJ, Van Dongen G, Brakkee JG, Hayashida DJ, Balm AJ, Snow GB, Meijer CJ. Production of a monoclonal antibody (K 931) to a squamous cell carcinoma associated antigen identified as the 17-1A antigen. Hybridoma. 1990;9(4):377-387.
- Ribeiro U Jr, Posner MC, Safatle-Ribeiro AV, Reynolds JC. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oesophagus. Br J Surg. 1996;83(9):1174-1185.
- Riethmüller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmayr R, et al. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. Lancet. 1994;343(8907):1177-1183.

Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Funke I, Pichlmaier H, Hirche H, Buggisch P, Witte J, Pichlmayr R. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. J Clin Oncol. 1998;16(5):1788-1794.

Risk JM, Whittaker J, Fryer A et al. Tylosis oesphageal cancer mapped. Nature Genetics 1994;8:319-321.

Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. Cancer Invest. 2001;19(5):554-568.

Rubin I, Yarden Y. The basic biology of HER2. Ann Oncol. 2001;12 Suppl 1:S3-8.

- Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, Ullrich A, Coussens L. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. Science. 1985;229(4717):976-978.
- Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumor antigen. Nature. 1984;312(5994):513-516.
- Scherthan H, Cremer T. Methodology of non isotopic in situ hybridization in paraffin embedded tissue sections. In: Adolph KW (Hrsg.). Methods in molecular genetics (1994). Vol. 5, Academic Press, San Diego.
- Schlereth B, Fichtner I, Lorenczewski G, Kleindienst P, Brischwein K, da Silva A, Kufer P, Lutterbuese R, Junghahn I, Kasimir-Bauer S, Wimberger P, Kimmig R, Baeuerle PA. Eradication of tumors from a human colon cancer cell line and from ovarian cancer metastases in immunodeficient mice by a single-chain Ep-CAM-/CD3-bispecific antibody construct. Cancer Res. 2005;65(7):2882-2889.
- Shiga K, Shiga C, Sasano H, Miyazaki S, Yamamoto T, Yamamoto M, Hayashi N, Nishihira T, Mori S. Expression of c-erbB-2 in human esophageal carcinoma cells: overexpression correlated with gene amplification or with GATA-3 transcription factor expression. Anticancer Res. 1993;13(5A):1293-1301.
- Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. Nature. 1981;290(5803):261-264.
- Siewert JR, Stein HJ, Feith M, Bruecher BL, Bartels H, Fink U. Histologic tumor type is an independent prognostic parameter in esophageal cancer: lessons from more than 1,000 consecutive resections at a single center in the Western world. Ann Surg. 2001;234(3):360-367.
- Simon B, Podolsky DK, Moldenhauer G, Isselbacher KJ, Gattoni-Celli S, Brand SJ. Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87(7):2755-2759.
- Sjogren S, Inganas M, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. J Clin Oncol. 1998;16(2):462-469.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987;235(4785):177-182.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science. 1989;244(4905):707-712.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med. 2001;344(11):783-792.
- Spencer KS, Graus-Porta D, Leng J, Hynes NE, Klemke RL. ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. J Biol Chem 1998;273:28238-28246.

- Spizzo G, Obrist P, Ensinger C, Theurl I, Dunser M, Ramoni A, Gunsilius E, Eibl G, Mikuz G, Gastl G. Prognostic significance of Ep-CAM and Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer. Int J Cancer. 2002;98(6):883-888.
- Spizzo G, Obrist P, Went P, Dirnhofer S, Gastl G. Edrecolomab in the adjuvant treatment of colorectal carcinoma. Lancet. 2003;361(9351):83.
- Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Simon R, Spichtin H, Maurer R, Metzger U, von Castelberg B, Bart R, Stopatschinskaya S, Kochli 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 Res Treat. 2004;86(3):207-213.
- Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Moch H, Baeuerle PA, Mueller-Holzner E, Marth C, Gastl G, Zeimet AG. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. Gynecol Oncol. 2006;103(2):483-488.
- Stahl M, Wilke H. Ösophaguskarzinom. In: Seeber S, Schütte J (Hrsg.), Therapiekonzepte Onkologie (2003). 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- 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;6:165-172.
- Suo Z, Su W, Holm R, Nesland JM. Lack of expression of c-erbB-2 oncoprotein in human esophageal squamous cell carcinomas. Anticancer Res. 1995;15(6B):2797-2798.
- Suwanagool P, Parichatikanond P, Maeda S. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in primary human tumors: an immunohistochemistry study. Asian Pac J Allergy Immunol. 1993;11(2):119-122.
- Swiger RR, Tucker JD. Fluorescence in situ hybridisation: a brief review. Environmental and molecular mutagenesis 1996;27:245-254.
- Tamura S, Shiozaki H, Miyata M, Kadowaki T, Inoue M, Matsui S, Iwazawa T, Takayama T, Takeichi M, Monden M. Decreased E-cadherin expression is associated with haematogenous recurrence and poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. Br J Surg. 1996;83(11):1608-1614.
- Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, McGuire WL. Association of the 323/A3 surface glycoprotein with tumor characteristics and behavior in human breast cancer. Cancer Res. 1990;50(11):3317-3321.
- Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, Isola J. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. Am J Pathol. 2000;157(5):1467-1472.
- Urschel JD, Vasan H, Blewett CJ. A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemotherapy and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer. Am J Surg. 2002;183(3):274-279.
- Urschel JD, Hasan V. A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemoradiation and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer. Am J Surg. 2003;185(6):538-543.
- Varga M, Obrist P, Schneeberger S, Muhlmann G, Felgel-Farnholz C, Fong D, Zitt M, Brunhuber T, Schafer G, Gastl G, Spizzo G. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. Clin Cancer Res. 2004;10(9):3131-3136.
- Vaughan TL, Davis S, Kristal A, Thomas DB. Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1995;4(2):85-92.

- Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S, Gullick WJ. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. Lancet. 1987;2(8550):69-72.
- Wang LS, Chow KC, Chi KH, Liu CC, Li WY, Chiu JH, Huang MH. Prognosis of esophageal squamous cell carcinoma: analysis of clinicopathological and biological factors.Am J Gastroenterol. 1999;94(7):1933-1940.
- Weidner HM, Behrens J, Vandekerckhove J, Birchmeier W. Scatter factor: molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells. J Cell Biol. 1990;111(5 Pt 1):2097-108.
- Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F (Hrsg). UICC: TNM-Klassifikation maligner Tumoren (2002). 6. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Xie X, Wang CY, Cao YX, Wang W, Zhuang R, Chen LH, Dang NN, Fang L, Jin BQ. Expression pattern of epithelial cell adhesion molecule on normal and malignant colon tissues. World J Gastroenterol. 2005;11(3):344-347.
- Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y, Shi Z. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. Mod Pathol. 2002;15(6):657-665.
- Zhou BP, Hu MC, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY, Hung MC. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. J Biol Chem. 2000;275(11):8027-8031.
- Zimmermann F, Meining A, Lordick F, Sarbia M, Brücher B. Ösophagus-Plattenepithelkarzinom. In: Ösophaguskarzinom. In: Tumorzentrum München (Hrsg.), Gastrointestinale Tumoren, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge (2006). 7. Auflage, W. Zuckerschwendt Verlag München, Wien, New York.

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel danke ich für die Unterstützung meiner Promotion an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und das entgegengebrachte Vertrauen sowie für seine Bereitschaft, sich für diese Dissertation als Doktorvater zur Verfügung zu stellen.

Für die Überlassung des Themas, die ideenreiche Unterstützung, die Gelegenheit des selbständigen Arbeitens, das abschließende Korrekturlesen und insbesondere auch die privaten Gespräche möchte ich meinem Betreuer Dr. med. Nikolas H. Stoecklein aufrichtig danken.

Herm Pablo Verde vom Koordinierungszentrum für Klinische Studien (KKS) der Universität Düsseldorf danke ich für die Untersützung bei der statistischen Auswertung. Herm Priv. Doz. Dr. med. Andreas Erbersdobler vom Institut für Pathologie der Universität Hamburg danke ich für die Hilfe bei der Auswertung und Nachbegutachtung der Schnittpräparate.

Ein besonder Dank gilt Andreas Lübke, der durch seine Ausdauer bei der Beantwortung methodischer Fragen, durch praktische und theoretische Anregungen und nicht zuletzt durch die vielen kurzweiligen Diskussionen innerhalb und außerhalb des Labors maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Für die gute Zusammenarbeit im Labor und die praktischen Hilfestellungen möchte ich mich bei Franziska Stern, Petra Schröder und Petra Merkert bedanken.

Meiner Freundin Dr. med. Anne K. Berger danke ich für die vielen Gespräche und gemeinsamen Unternehmungen während unseres Studiums und der Arbeit am NCT Heidelberg und das auch daraus gewonnene Durchhaltevermögen.

Meinen Eltern Dr. med. Reinhold und Martina Siegmund möchte ich für die geduldige Unterstützung aller meiner Ideen und Pläne und das dadurch ermöglichte Leben danken. Meinem Bruder Robert Siegmund gebührt Dank für den geschulten Blick in allen Ästhetikfragen und die Vorbildfunktion hinsichtlich Kreativität und Erfolg.

Nicht zuletzt danke ich Frank Rehberg für seinen außergewöhnlichen Beitrag zur Fertigstellung dieser Arbeit – und zu meinem Dasein.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Annika Siegmund
Anschrift	Bergheimer Straße 38 in 69115 Heidelberg
Geburtsdaten	15.01.1979 in Oldenburg (Oldb.)
	ledig
Schulbildung	
1985-1991	Grundschule und Orientierungsstufe in Oldenburg
1991-1995	Gymnasium Liebfrauenschule in Oldenburg
1995-1998	Gymnasium Insel Föhr in Wyk auf Föhr
Studium	
1998-2005	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
Frühjahr 2005	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)
	und Erteilung der Approbation
Dissertation	
seit Herbst 2001	Promotion zum Dr. med. in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und
	Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
seit Herbst 2003	Fortsetzung der Arbeit zur Promotion zum Dr. med. in der Klinik für Allgemein-,
	Viszeral- und Kinderchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter
	der Leitung von Prof. Dr. med. W. T. Knoefel und der Betreuung von Dr. med. N.
	Stoecklein
Ärztliche Tätigkeit	
07/2005 – 12/2005	Assistenzärztin in der Abteilung für Diabetologie und Endokrinologie des AK
	Barmbek in Hamburg
01/2006 - 06/2006	Assistenzärztin in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des AK Altona
	in Hamburg
seit 07/2006	Assistenzärztin am Nationalen Centrum für Tumorerkrankungen (NCT) der
	Universität Heidelberg

Veröffentlichungen

- 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;6:165-172.
- Stoecklein NH, Hosch SB, Bezler M, Stern F, Hartmann CH, Vay C, Siegmund A, Scheunemann P, Schurr P, Knoefel WT, Verde PE, Reichelt U, Erbersdobler A, Grau R, Ullrich A, Izbicki JR, Klein CA: Direct Genetic Analysis of Single Disseminated Cancer Cells for Prediction of Outcome and Therapy Selection in Esophageal Cancer. Cancer Cell 2008;13:441-453.

9 Zusammenfassung

der Dissertation zur Untersuchung möglicher immunologischer Zielstrukturen für eine adjuvante Therapie des operablen Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus

Einleitung: Ösophaguskarzinome haben generell eine schlechte Prognose und der Nutzen der derzeitig verfügbaren adjuvanten Therapien wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Aufgabe dieser Arbeit war die Expressionsanalyse zweier möglicher immunologischer Zielstrukturen für eine adjuvante Therapie des operablen Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus.

Material und Methoden: Mit immunhistochemischen Methoden wurde die Expression von Ep-CAM und p18_{5HER-2} an 70 Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus untersucht. Für 53 Patienten waren klinische FollowUp-Daten vorhanden, mit denen die Studienergebnisse statistisch korreliert werden sollten.

Ergebnisse: Ep-CAM wird von der Mehrzahl der Karzinome exprimiert, wobei eine generelle Neo-Expression nicht mit den klinisch-pathologischen Parametern korrelierte. Die in 41 der Fälle nachgewiesene starke Expression erwies sich jedoch als unabhängiger prognostischer Faktor sowohl für das rezidivfreie als auch für das Gesamtüberleben. Ep-CAM-exprimierende Tumoren scheinen sich also durch ein aggressiveres biologisches Verhalten auszuzeichnen. p185_{HER-2} wurde von 16 der untersuchten Tumoren exprimiert, davon nur in 4 der Fälle stark. Eine Korrelation mit klinischen Parametern und Prognose war nicht zu beobachten. Mittels Chromogener In-Situ-Hybridisierung konnte gezeigt werden, daß die starke Überexpression in erster Linie auf eine *HER-2*-Genamplifikation zurückzuführen ist. Dieser Mechanismus war für das Ösophaguskarzinom zuvor noch nicht beschrieben worden. Im untersuchten Kollektiv fand sich eine Subgruppe Ep-CAM-p185_{HER-2} koexprimierender Tumoren, die durch ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben gekennnzeichnet war.

Schlußfolgerung: Mit der Expressionsanalyse ist eine Risikostratifizierung der Karzinome denkbar. Zusätzlich wurde die Identifizierung potentieller Kandidaten für eine adjuvante Immuntherapie (als Monotherapie mit einem anti-Ep-CAM-Antikörper oder in Kombination mit dem anti-p185_{HER-2}-Antikörper Trastuzumab) ermöglicht.

a. Signerund

Annika Siegmund