

Aus der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie der Klinik und  
Poliklinik für Chirurgie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf

Prof. Dr. med. J. R. Izbicki

**UNTERSUCHUNG ZUR MODULATION DER FAS REZEPTOR- (APO-1,  
CD95) UND FAS LIGAND (APO-1L)-EXPRESSION BEIM  
ÖSOPHAGUSKARZINOM:  
INZIDENZ UND PROGNOTISCHE RELEVANZ**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg  
vorgelegt von

Stefan Sudmann  
aus Hamburg

Hamburg  
2002

## **Inhaltsverzeichnis**

<b><i>Inhaltsverzeichnis</i></b> .....	<b><i>i</i></b>
<b><i>Abbildungsverzeichnis</i></b> .....	<b><i>iii</i></b>
<b><i>Tabellenverzeichnis</i></b> .....	<b><i>iii</i></b>
<b><i>Allgemeines Abkürzungsverzeichnis</i></b> .....	<b><i>v</i></b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Einführung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Das Ösophaguskarzinom</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Letale Zellschädigung</b> .....	<b>7</b>
1.3.1 Programmierter Zelltod .....	7
1.3.1.1 Regulierung der Apoptose .....	8
1.3.1.2 Funktionelle Bedeutung der Apoptose .....	9
1.3.2 Akzidentieller Zelltod .....	9
1.3.3 Nekrose.....	10
<b>1.4 Das Fas System</b> .....	<b>11</b>
1.4.1 Fas Rezeptor.....	12
1.4.2 Fas Ligand .....	15
1.4.3 Reaktionskaskade Fas /FasL.....	18
<b>2 Patienten und Methoden</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 Patienten</b> .....	<b>21</b>
2.1.1 Charakterisierung der Patienten .....	21
2.1.1.1 Adenokarzinome.....	22
2.1.1.2 Plattenepithelkarzinome .....	23
2.1.2 Nachbeobachtung.....	24
<b>2.2 Aufarbeitung des Gewebes</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3 Immunhistochemische Färbungen</b> .....	<b>25</b>
2.3.1 Darstellung der Fas-/FasL-Expression .....	25
2.3.1.1 ABC-Methode .....	26
2.3.1.2 Primärantikörper .....	26
2.3.1.3 Durchführung .....	27
2.3.2 Detektion von isolierten Tumorzellen in Lymphknoten .....	29
2.3.2.1 APAAP-Methode.....	29
2.3.2.2 Primärantikörper .....	29
2.3.2.3 Durchführung .....	31
<b>2.4 Auswertung</b> .....	<b>32</b>
2.4.1 Fas und Fas Ligand .....	33
2.4.2 Isolierte Tumorzellen in Lymphknoten .....	34
<b>2.5 Statistische Analysen</b> .....	<b>35</b>
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1 Ergebnisse der Antigenexpression</b> .....	<b>36</b>
3.1.1 Fas Rezeptor.....	36
3.1.2 Fas Ligand .....	37
3.1.3 Koexpression von Fas Rezeptor und Fas Ligand.....	38
3.1.4 Isolierte Tumorzellen in Lymphknoten .....	39

---

<b>3.2 Zusammenhang zwischen Antigenexpression und histopathologischen Parametern.....</b>	<b>40</b>
3.2.1 Fas Rezeptor.....	40
3.2.2 Fas Ligand .....	41
<b>3.3 Koexpression von Fas Rezeptor und Fas Ligand .....</b>	<b>43</b>
<b>3.4 Korrelation von ITZ in LK mit histopathologischen Parametern .....</b>	<b>43</b>
<b>3.5 Korrelation zwischen immunhistochemischem Lymphknotenstatus und der Fas/FasL-Expression der Primärtumoren.....</b>	<b>44</b>
<b>3.6 Ergebnisse der Nachbeobachtung .....</b>	<b>46</b>
<b>3.7 Korrelation der Nachbeobachtungsdaten mit etablierten Prognoseparametern.....</b>	<b>47</b>
<b>3.8 Prognostischer Einfluss von Fas, FasL und ITZ in Lymphknoten .....</b>	<b>49</b>
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>52</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>58</b>
<b>6 Anhang .....</b>	<b>60</b>
6.1 Tabellen.....	60
6.2 Spezielles Abkürzungsverzeichnis.....	61
6.3 Färbeprotokolle.....	62
6.3.1 ABC.....	62
6.3.2 APAAP .....	64
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>66</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>83</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>84</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>85</b>
<b>Publikationen .....</b>	<b>86</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	<i>Pathway des Programmierten und Akzidentiellen Zelltods</i> .....	11
Abbildung 1.2	<i>Abbildung des Fas Rezeptors</i> .....	13
Abbildung 1.3	<i>Das Fas System</i> .....	20
Abbildung 2.1	<i>Isolierte Ber-EP4 positiven Tumorzelle in einem Lymphknoten</i> 35	
Abbildung 3.1	<i>Down-regulierte Fas-Expression auf Adenokarzinomzellen</i> .....	37
Abbildung 3.2	<i>Expression von Fas Ligand auf Adenokarzinomzellen</i> .....	38
Abbildung 3.3	<i>Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom UICC Stadium</i> ... 47	
Abbildung 3.4	<i>Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom UICC Stadium</i> .....	48
Abbildung 3.5	<i>Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad</i> .. 49	
Abbildung 3.6	<i>Rezidivfreies Überleben für Fas (Kaplan-Meier Analyse)</i> .....	50
Abbildung 3.7	<i>Lokalrezidivfreies Überleben für Fas und Fas Ligand (n=55)</i> ... 51	

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	<i>Programmierter und Akzidentieller Zelltod [46, 61]</i> .....	10
Tabelle 1.2	<i>Fas Rezeptor positive Gewebe (Übersicht)</i> .....	14
Tabelle 1.3	<i>Fas Down-Regulation bei malignen Tumoren (Übersicht)</i> .....	15
Tabelle 1.4	<i>FasL-Expression auf unterschiedlichen Geweben (Übersicht)</i> .....	16
Tabelle 1.5	<i>Fas Ligand Expression bei verschiedenen Tumoren (Übersicht)</i> .. 17	
Tabelle 2.1	<i>Charakteristika der Ösophaguskarzinome</i> .....	23
Tabelle 2.2	<i>Primärantikörper</i> .....	27
Tabelle 2.3	<i>Skala zur Beurteilung der Expression von Fas Rezeptor</i> .....	33
Tabelle 2.4	<i>Skala zur Beurteilung der Expression von Fas Ligand</i> .....	34
Tabelle 3.1	<i>Fas Expression</i> .....	36
Tabelle 3.2	<i>Fas Ligand Expression</i> .....	37
Tabelle 3.3	<i>Koexpression von Fas Rezeptor und Fas Ligand</i> .....	39
Tabelle 3.4	<i>Inzidenz von Isolierten Tumorzellen (ITZ) in Lymphknoten</i> .....	39
Tabelle 3.5	<i>Fas Rezeptor-Expression und klinischpathologische Parameter</i> .. 40	
Tabelle 3.6	<i>Fas Ligand-Expression und histopathologische Parameter</i> .....	42
Tabelle 3.7	<i>ITZ<sup>1</sup> in Lymphknoten und histopathologische Parameter</i> .....	44

---

Tabelle 3.8	<i>Koexpression der Apoptosemoleküle im Vergleich zu ITZ<sup>1</sup> in LK</i>	45
Tabelle 3.9	<i>Patienten und Nachbeobachtungszeit</i>	46
Tabelle 3.10	<i>Einfluss der Apoptosemoleküle und ITZ<sup>1</sup> auf die Rezidivrate</i>	50
Tabelle 6.1	<i>TNM/pTNM-Klassifikation des Ösophaguskarzinoms [124]</i>	60
Tabelle 6.2	<i>Stadiengruppierung des Ösophaguskarzinoms [124]</i>	60
Tabelle 6.3	<i>Abkürzungen</i>	61

## Allgemeines Abkürzungsverzeichnis

ACE	Adenocarcinoma of the esophagus
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
CD	Cluster of differentiation
g	Gramm
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HLA	Human leucocyte antigen
ITZ	Isolierte Tumorzelle
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LK	Lymphknoten
p(M)	Pathohistologisch verifizierter Fernmetastasierungs-Status
MHC	Major histocompatibility complex
m	Meter
min	Minute(n)
μ	Mikro
ml	Milliliter
(p)N	Pathohistologisch verifizierter Lymphknotenstatus
NaCl	Natriumchlorid
SCCE	Squamous cell carcinoma of the esophagus
(p)T	Pathohistologisch verifizierter Primärtumorstatus hinsichtlich der Infiltrationstiefe
TBS	Tris buffered saline
vs.	versus

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Die Prognose von Patienten mit resektablen Ösophaguskarzinomen ist nahezu unverändert schlecht. Trotz verbesserter bildgebender Diagnoseverfahren, verfeinerter operativer Techniken und multimodaler Therapiekonzepte liegt die globale 5-Jahres-Überlebensrate bei lediglich 4-35,3% [6, 7, 24].

Es gibt mehrere Ursachen, die als mögliche Erklärung für diese Tatsache in Frage kommen. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung besteht aufgrund des späten Auftretens von Krankheitssymptomen meist ein bereits fortgeschrittenes Tumorstadium [81, 82]. Darüber hinaus Prädisponiert der Ösophagus aufgrund seiner anatomischen Beschaffenheit für eine frühzeitige lymphogene Aussaat und Infiltration von Nachbarorganen [91, 92].

Während ihrer Entstehung, Disseminierung und Migration in Sekundärorgane sind Tumorzellen der Abwehr des körpereigenen Immunsystems ausgesetzt. Studien zu diesem Thema konnten zeigen, dass sich Tumorzellen durch Modulationen immunregulatorischer Moleküle den Angriffen des körpereigenen Immunsystems entziehen können [6, 26, 77].

Eine besondere Rolle scheint in diesem Zusammenhang der Fibroblast-associated receptor (Fas, Apo-1, CD 95) und sein Ligand (Fas Ligand, FasL) zu spielen. Es handelt sich hierbei um zwei integrale Membranproteine, die der Familie der Tumornekrose-/Nervenwachstumsfaktoren zugerechnet werden [8]. Der Fas Rezeptor wird von einer Vielzahl adulter Normalgewebe exprimiert [57, 68]. Nach dessen Aktivierung durch seinen natürlichen Liganden (FasL), der sich vornehmlich auf immunprivilegierten und immunkompetenten Zellen nachweisen lässt, kommt es über eine intrazelluläre Proteinkettenreaktion zu einer Kondensation der Zellmembran ohne Verlust der Zellintegrität, die in die Aufteilung in membrangebundene Zellkörperchen mündet. Man spricht bei diesem Vorgang von Programmierterem Zelltod oder Apoptose [73, 126]. Die Apoptose ist beispielsweise ein wichtiger physiologischer Mechanismus bei der Eliminierung virusinfizierter oder neoplastisch transformierter Zellen durch zytotoxische T-Zellen [35, 52, 113]. Es gibt Hinweise darauf, dass Tumorzellen sich durch Herunterregulierung (*down-Regulation*) dieses Rezeptors auf diese

Weise der endogenen Immunabwehr entziehen können („escape from immune surveillance“) [30]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen in der Lage sind, den Fas Liganden auf ihrer Oberfläche hochzuregulieren (*up-Regulation*) und so ihrerseits Apoptose in Fas Rezeptor exprimierenden Abwehrzellen induzieren zu können („counter-attack“) [78].

Das Ziel der vorliegenden klinisch-experimentellen Arbeit war es, Modulationen in der Expression des Fas Rezeptors (Fas) und seines Liganden (FasL) bei Ösophaguskarzinomen zu untersuchen. Analysiert wurde das Expressionsmuster dieser Moleküle dabei immunhistochemisch mit der Avidin-Biotin-Komplex-Methode. Um den prognostischen Einfluss dieser Modulationen zu eruieren, wurden die experimentellen Ergebnisse darüber hinaus mit histopathologischen Parametern, dem Auftreten isolierter Tumorzellen in Lymphknoten der Patienten, sowie mit den Ergebnissen der Nachsorgeuntersuchungen korreliert.

## **1.2 Das Ösophaguskarzinom**

Das Ösophaguskarzinom ist nicht nur eine der 10 häufigsten Krebsarten weltweit [26], sondern gehört auch mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 4-35,3% [6, 7, 24] zu den Karzinomen mit der schlechtesten Prognose. Während aus Gegenden des Kaspischen Litorals, der Transkei und Nordchina von Inzidenzen von 1/1000 pro Jahr berichtet wird [31], gehört das Ösophaguskarzinom in den westlichen Industrienationen mit einer Inzidenz von 3-36,3 Tumorfällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr [10, 92] zu den 15 häufigsten Tumorentitäten [31].

Hinsichtlich seines Zelltyps wird das Ösophaguskarzinom in Plattenepithelkarzinome (SCCE = squamous cell carcinoma of the esophagus) und Adenokarzinome (ACE = adenocarcinoma of the esophagus) unterteilt.

Bis vor kurzem waren Plattenepithelkarzinome im Vergleich zu den Adenokarzinomen deutlich häufiger vertreten. In den letzten 20 Jahren nahm die Inzidenz des ACE jedoch rapide zu und macht inzwischen einen Anteil von bis zu 34 Prozent aus, wie aus unabhängigen epidemiologischen Studien aus den USA, Deutschland, Großbritannien und Dänemark hervorgeht [7, 67, 87]. Eine Analyse von Blot et al. [7] mit 9405 Patienten zeigte, dass zwischen 1976

und 1987 die Inzidenz von ACE bei männlichen Patienten in 9 verschiedenen Gebieten der USA jährlich um 4-10% und damit dramatischer als bei allen anderen Tumorentitäten zunahm, so dass sich 1987 der Anteil von Adenokarzinomen bei weißen Männern auf insgesamt 34% belief [7, 31]. Die Inzidenz für SCCE blieb in diesem Zeitraum nahezu stabil [43, 129].

Eine seltenere Form ist das kleinzellige Ösophaguskarzinom (SCEC = small cell esophageal carcinoma). Der Anteil des SCEC an allen malignen ösophagealen Tumoren beträgt in Amerika und Europa zwischen 0,4 und 3,2 % [65, 40]. Höhere Raten wurden in Japan beschrieben (7,6-15%). Es hat ein Häufungsmaximum in der sechsten und siebten Dekade mit einer Geschlechterverteilung von Männer/Frauen=1,6 [40]. Äußerst selten sind spindelzellige Plattenepithelkarzinome, die als Karzinom Sarkome imponieren können, sowie Basaloidzell-Karzinome mit einer Häufigkeit von 0,068% aller resezierten malignen Ösophagustumoren in Japan [110].

Die Häufigkeitsverteilung der Ösophaguskarzinome betrifft insgesamt mehrheitlich das männliche Geschlecht mit einer Geschlechterverteilung bei dem SCCE von Männern/Frauen = 1,7 und bei dem ACE = 3,7 mit einem Häufungsmaximum zwischen dem 35. und 65. Lebensjahr [43, 92].

Die klinischen Krankheitssymptome bei dem Ösophaguskarzinom sind häufig unspezifisch und treten in der Regel erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium auf. Als Leitsymptom ist hier die Dysphagie zu nennen. Weitere Symptome umfassen in absteigender Häufigkeit Gewichtsverlust, retrosternale Schmerzen, Kachexie und, bei Infiltration in Nachbarstrukturen, Reizhusten, Heiserkeit und peripheres Horner Syndrom [81, 82].

Hinsichtlich prädisponierender Faktoren sind das ACE und das SCCE voneinander abzugrenzen. Das ACE geht in der überwiegenden Mehrzahl aus dysplastischen Arealen eines metaplastischen Zylinderepithels, das bei 10-20% der Patienten mit gastroösophagealer Refluxkrankheit auftritt [123], hervor. Diesbezügliche Untersuchungen konnten aufzeigen, dass diese Epithelmetaplasie mit einem 40-fach erhöhten Risiko, an einem Adenokarzinom zu erkranken, einhergeht [103]. Weitere prädisponierende Faktoren könnten Rauchen und Alkoholkonsum sein, wobei diesbezüglich die Datenlage uneinheitlich ist [7, 43]. Laut Hennessy et al. [31] gilt die gastroösophageale

Refluxösophagitis als einziger gesicherter Risikofaktor für das Adenokarzinom des Ösophagus.

Die pathogenetischen Faktoren des Ösophaguskarzinoms vom plattenepithelialen Typ werden in endogene und exogene Faktoren unterteilt. Zu den endogenen Ursachen gehört die Tylosis (= familiäre palmoplantäre Keratose)], das Plummer-Vinson-Syndrom und die glutensensitive Enteropathie [63, 92]. Auch Patienten mit Achalasie haben gegenüber der Normalbevölkerung ein um 14-16% erhöhtes Risiko ein Plattenepithelkarzinom zu entwickeln [94, 106]. Zu den exogenen Risikofaktoren gehören Nikotinkonsum, Alkohol, Nitrosamine, Mineral- (Molybden-Mangel) und andere Vitaminmängel (Vitamin A,B,C) [31].

Plattenepithelkarzinome sind mit 45% der Fälle vor allem im mittleren Drittel der Speiseröhre lokalisiert, bei 40% der Patienten ist das untere und bei 15% das obere Drittel betroffen [64]. Adenokarzinome finden sich, entsprechend der Lokalisation der intestinalen Metaplasie bei chronischer Refluxösophagitis, mit 81% überwiegend im unteren Drittel des Ösophagus [7].

Molekularpathologische Ursachen für die Entstehung von Ösophaguskarzinomen scheinen vor allem inaktivierende Alterationen im p53-Tumorsuppressorgen (40-60%) zu sein. Im überwiegenden Fall sind diese Inaktivierungen durch Punktmutationen, seltener auch durch onkogen-wirksame Genprodukte humaner Papillomavirustypen bedingt und bereits in einem relativ frühen Stadium der Tumorgenese nachweisbar [25, 69].

Die Karzinome des Ösophagus breiten sich kontinuierlich oder diskontinuierlich entlang der Lymphgefäße in der Ösophaguswandung aus, was dazu führt, dass es häufig zur submukösen Streuung des Tumors kommt. Das longitudinale lymphatische Netzwerk erlaubt eine häufige Aussaat in die Lymphknoten des Halses, Thorax und Abdomen. Sobald der Tumor die Muskelschichten des Ösophagus durchbrochen hat, erreicht die Inzidenz tumorbefallener regionaler Lymphknoten bis zu 75% [89]. Da der Ösophagus keine Serosa besitzt, kann der Tumor nach Penetration der Muskelschichten ungehindert Nachbarorgane infiltrieren. Zu einer hämatogenen Fernmetastasierung vom Kava- oder Pfortadertyp kommt es in der Regel erst spät [92].

Die am häufigsten verwendete Untersuchung zur Bestimmung der Tumorausdehnung ist die Computertomographie (CT). Sie ist zur Identifikation von Fernmetastasen im Brustbereich oder Abdomen sehr gut geeignet, lässt jedoch nur eine eingeschränkte Aussage über die Eindringtiefe in der Ösophaguswand (T-Status), sowie den Lymphknotenstatus (N-Status) zu [91]. Sondenna et al. [102] und Consigliere et al. [15] zeigten, dass CT-Untersuchungen in 40% der Fälle den Tumorstatus unterschätzten und eine Detektionsrate regionärer Lymphknotenbeteiligungen von nur 55-63% aufwiesen. Die transösophageale Endosonographie ist die derzeit genaueste nicht-invasive Methode zur Feststellung des T-, sowie des N-Status. Mit dieser Untersuchungstechnik ist eine 360°-Begutachtung der Ösophagus-Schichten möglich, was eine richtige Abschätzung des T-Status in bis zu 90% der Untersuchungen ermöglicht [15, 102, 119].

Die Einstufung des Ösophaguskarzinoms erfolgt nach den Kriterien des TNM-Systems der Union Internationale Contre Cancer (UICC) (siehe Anhang Tabelle 6.1). Entsprechend der histologischen und klinischen Ergebnisse teilt man die Tumoren in fünf Stadien ein (siehe Anhang Tabelle 6.2).

Entscheidend für die Indikationsstellung zur Therapie mit primär kurativer Intention ist die Abschätzung der Wahrscheinlichkeit einer vollständigen Tumorentfernung (R0-Resektion) und das Fehlen von Fernmetastasen. Der Therapiestandard stellt hierbei nach wie vor die chirurgische Tumorentfernung dar. Hiervon abzugrenzen sind die Verfahren, die aus lediglich palliativer Indikation gewählt werden. Hierzu stehen endoskopische, chirurgische, radio- und chemotherapeutische Maßnahmen zur Verfügung, die situationsabhängig zur Anwendung kommen [20, 66].

Bei Plattenepithelkarzinomen des supra- und infrabifurkalen Ösophagus empfiehlt die Deutsche Krebsgesellschaft in Zusammenarbeit mit der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie [20] eine transthorakale En-bloc-Resektion des intrathorakalen Ösophagus mit umgebendem Fett- und Bindegewebe einschließlich des Ductus thoracicus nach möglichst rechtsseitiger Thorakotomie und Laparotomie. Die mediastinale und abdominelle Lymphadenektomie (2-Feld-Dissektion) ist ein fester Bestandteil dieser Operation. Die abdominelle Lymphadenektomie umfasst die proximale

Resektion der kleinen Kurvatur des Magens und die Entfernung der coeliacalen und suprapankreatischen Lymphknoten. Distale Adenokarzinome können sowohl abdomino-thorakal als auch transhiatal reseziert werden. Hier ist die Lymphadenektomie im hinteren Mediastinum notwendig, die ebenfalls transhiatal erfolgen kann. Die abdominelle Lymphadenektomie entspricht dem Vorgehen bei intrathorakalen Plattenepithelkarzinomen. Adenokarzinome im Bereich des mittleren oder oberen Ösophagus erfordern ein Vorgehen wie bei intrathorakalen Plattenepithelkarzinomen. Die gastrointestinale Kontinuität wird in der Regel durch die Bildung eines Neoösophagus, welcher aus der großen Kurvatur des Magens rekonstruiert wird, oder einer Koloninterposition wiederhergestellt [20, 89].

Aufgrund der schlechten Prognose und der frühen lymphogenen Metastasierung des Ösophaguskarzinoms wurden in den letzten Jahren vermehrt Studien über multimodale Behandlungsstrategien durchgeführt. Diese Therapieformen umfassen zusätzlich zur chirurgischen Resektion weitere systemische Maßnahmen, wie die adjuvante oder neoadjuvante Radiotherapie, Chemotherapie oder kombinierte Radiochemotherapie. So wiesen bei einer Studie von Urba et al. [118] Patienten mit neoadjuvanter Radiochemotherapie eine 3-Jahres Überlebensrate von 32% im Vergleich zu 15% bei alleiniger chirurgischer Therapie auf. Bei Walsh et al. [120], die ausschließlich Adenokarzinome betrachteten, war sogar eine 3-Jahres Überlebensrate von 32% im Vergleich zu 6% bei ausschließlich chirurgischer Intervention zu verzeichnen. Trotz dieser ermutigenden Ergebnisse sollten multimodale Therapieverfahren auf Anraten der Deutschen Krebsgesellschaft zur Zeit nur innerhalb klinischer Studien bei Patienten ohne wesentliche Risikofaktoren eingesetzt werden [20].

In Abhängigkeit vom Tumorstadium weisen Patienten im UICC-Stadium I nach kurativ intendierter chirurgischen Therapie mit kompletter Tumorentfernung eine 5-Jahres-Überlebensrate von 50-80 % auf, wohingegen Patienten mit einem Tumor im UICC-Stadium IV fünf Jahre nicht überleben [89]. In Bezug auf den Zelltyp des Primärtumors weisen die meisten Studien keine Unterschiede im stadien-spezifischen Überleben zwischen Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen auf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die

Anzahl befallener Lymphknoten einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben hat. So wiesen Patienten mit 4 oder mehr befallenen Lymphknoten ein kürzeres postoperatives Überleben auf, als Patienten mit weniger als 4 positiven Lymphknoten [89].

### **1.3 Letale Zellschädigung**

Im Rahmen des physiologischen Zellumsatzes, aber auch durch unphysiologische Faktoren in Form von endogenen oder exogenen Noxen, kommt es zum Untergang von Zellen und Geweben. Man unterscheidet in diesem Zusammenhang den programmierten Zelltod (= Apoptose) von dem durch unphysiologische Noxen ausgelösten akzidentiellen Zelltod [92]. Das resultierende tote Gewebe imponiert als Nekrose. Die Terminologie des Begriffes Nekrose wird in der Literatur nicht einheitlich verwendet. Der häufig als Synonym für den akzidentiellen Zelltod benutzte Begriff bezieht sich aber laut Manjo et al. [61] auch auf sekundäre Veränderung des programmierten Zelltodes (siehe Abb 1.1). Die Nekrose ist somit als Überbegriff für die Summe aller morphologischen Veränderungen nach erfolgtem Zell- oder Gewebstod im lebenden Organismus zu sehen.

#### *1.3.1 Programmierter Zelltod*

Der auch als Apoptose bezeichnete zielgerichtete Tod einzelner Zellen beruht auf einem endogenen Selbstzerstörungsprogramm. Es kann durch zelleigene Triggerung, wie bei der numerischen Atrophie im Rahmen der Alterung von Geweben, durch eine Art innere genetische Uhr („Tod nach Fahrplan“) ausgelöst werden [61]. Ein weiterer Mechanismus besteht in der Aktivierung durch exogene Faktoren, wie Zytokinen oder Zytotoxische T-Lymphozyten [79, 92]. Dieser zielgerichtete Zelluntergang wurde 1971 von Kerr erstmalig beschrieben. Das histologische Bild des schrumpfenden Zellvolumens führte zu der ursprünglichen Bezeichnung „Schrumpfnekrose“ [46]. Die Apoptose ist durch eine Reihe morphologischer und biochemischer Kriterien charakterisiert (siehe Tabelle 1.1). Anfangs kommt es zu einer Kondensation des Chromatins (Karyopyknose) und dem Aufbrechen des Kerns (Karyorrhesis) [74, 122, 126]. Die Zelle bildet im Verlauf Ausstülpungen von Membrananteilen („budding“ –

Knospungsphänomen), die oft pyknotische nukleäre Fragmente besitzen. Diese Fortsätze brechen auf und bilden kleine membranumschlossene Vesikel, die als Apoptosekörperchen bezeichnet werden [47, 126]. Diese wiederum werden durch Makrophagen oder Nachbarzellen phagozytiert. Durch diesen effizienten Mechanismus kommt es bei der Apoptose – anders als bei der Nekrose - zu keiner reaktiven Begleitentzündung. Die Mitochondrien oder anderen Zellorganellen weisen keine oder nur wenig Schwellung auf [126].

Biochemisch gesehen kommt es über die Aktivierung von Endonukleasen zur Aufspaltung der DNA in Fragmente, die aus etwa je 185 Basenpaaren bestehen und auf die spezifische Spaltung zwischen Nucleosomen zurückzuführen ist [125].

#### *1.3.1.1 Regulierung der Apoptose*

Die Apoptose wird durch die Aktivierung apoptoseassoziiierter Rezeptoren wie den fibroblast associated receptor (Fas, APO-1, CD95) oder den Tumornekrosefaktor Rezeptor (TNFR) auf der Zelloberfläche eingeleitet. Die Aktivierung wird durch die Bindung von spezifischen Proteinen wie TNF- $\alpha$  oder Fas Ligand (FasL) an den entsprechenden Rezeptoren eingeleitet. Das auslösende extrazelluläre Signal wird zur intrazellulären Apoptose-Maschinerie transduziert, die wiederum eine Reihe von „Zelltod-Proteasen“ (=Caspasen) aktiviert und dadurch eine Reaktionskaskade in Gang setzt, die zur Spaltung lebenswichtiger Zellproteine führt und letztendlich den Tod der Zelle zur Folge hat [126].

Die Empfänglichkeit der Zellen für Apoptoseinduktion kann durch die Expression von pro- und antiapoptotischen Proteinen reguliert werden. Ruhende B-Zellen exprimieren beispielsweise wenig Fas Rezeptoren auf ihrer Oberfläche [11]. Kommt es jedoch zu einer Verbindung von CD40 [104] durch die Interaktion mit CD154 (CD40L) tragenden aktivierten T-Lymphozyten, kommt es zu einer Hochregulation von Fas auf den B-Zellen und damit einer Zunahme der Empfänglichkeit hinsichtlich Fas-vermittelter Apoptose [96].

Durch die transkriptionale Regulation verschiedener Gene kann es jedoch auch zu einer Hemmung der rezeptorvermittelten Apoptose kommen. Beispiele hierfür sind FLIP (FADD-inhibitory protein) [37], Toso [32] und die bcl Familienmitglieder [1]. Die Überexpression der Gene, die für bcl-2 oder bcl-x<sub>L</sub>

kodieren, schützen beispielsweise B-Zellen vor Fas-vermittelter Apoptose [97]. In anderen Zelltypen können TRAF 1 und 2 (TNF receptor-associated factors) und IAP (inhibitor of apoptosis) Apoptoseinduktion durch Fas und TNF inhibieren [121].

#### *1.3.1.2 Funktionelle Bedeutung der Apoptose*

Die Apoptose ist wichtig für den physiologischen Prozess, bei dem ungewollte oder nutzlose Zellen während der Gewebeentwicklung oder des zellulären Gleichgewichts eliminiert werden [123]. So kommt es während der Embryogenese, endokrin-bedingter Gewebeatrophie und normalem Gewebeumsatz zum apoptotischen Untergang einzelner Zellen [73, 74, 79, 126]. Die Entwicklung multizellulärer Organismen wird also nicht nur durch Proliferation und Differenzierung von Zellen reguliert, sondern auch durch den Zelltod [23, 88].

Apoptose spielt ebenfalls eine zentrale Rolle im Bereich der zellulären Immunantwort. Die Selektion spezifischer immunkompetenter Subpopulationen der B- und T-Zellreihe während der Immunantwort auf ein Pathogen geschieht mit Hilfe der Apoptose [76]. Nur die Lymphozyten, die Antigenrezeptoren mit angemessener Spezifität besitzen, werden für das Überleben selektiert. Die überwiegende Mehrheit, ca. 75% der B-Zell-Vorläufer und 95% der T-Zell-Vorläufer, gehen in Apoptose [21, 85]. Auch in der aktiven Phasen des Immunsystems kommt es über den Mechanismus des programmierten Zelltodes beispielsweise zur Eliminierung virusinfizierter oder neoplastischer Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten [14]. Letztendlich ist Apoptose auch involviert in der Termination einer Immunantwort. Am Ende einer Immunantwort werden die meisten aktivierten T-Lymphozyten durch Apoptose eliminiert [45, 101].

#### *1.3.2 Akzidentieller Zelltod*

Zu dem nicht durch Apoptose verursachten Zelltod kommt es durch die unphysiologische Einwirkung von Faktoren in Form von Noxen wie Hitze, Toxine und mechanisches Trauma (siehe auch Tabelle 1.1 und Abbildung 1.1). Eine besondere Form des akzidentiellen Zelltodes ist die des ischämischen Zelltodes, der durch Hydrops der betroffenen Zellen charakterisiert ist und

deshalb auch als Onkose bezeichnet wird [61]. Morphologisch gesehen kommt es zur Schwellung der gesamten Zelle und ihrer Organellen, die initial reversibel ist. Ursächlich hierfür ist eine erhöhte Membranpermeabilität durch das Versagen membranständiger Ionenpumpen zu sehen. Es kommt zu einem stochastischen Aufbrechen der DNA [127] mit nachfolgender Lyse der Zelle. Der Verlust der Membranintegrität der Zelle bewirkt die Freisetzung lysosomaler Enzyme, die häufig einen ausgedehnten Gewebsuntergang und eine intensive inflammatorische Reaktion hervorruft [61].

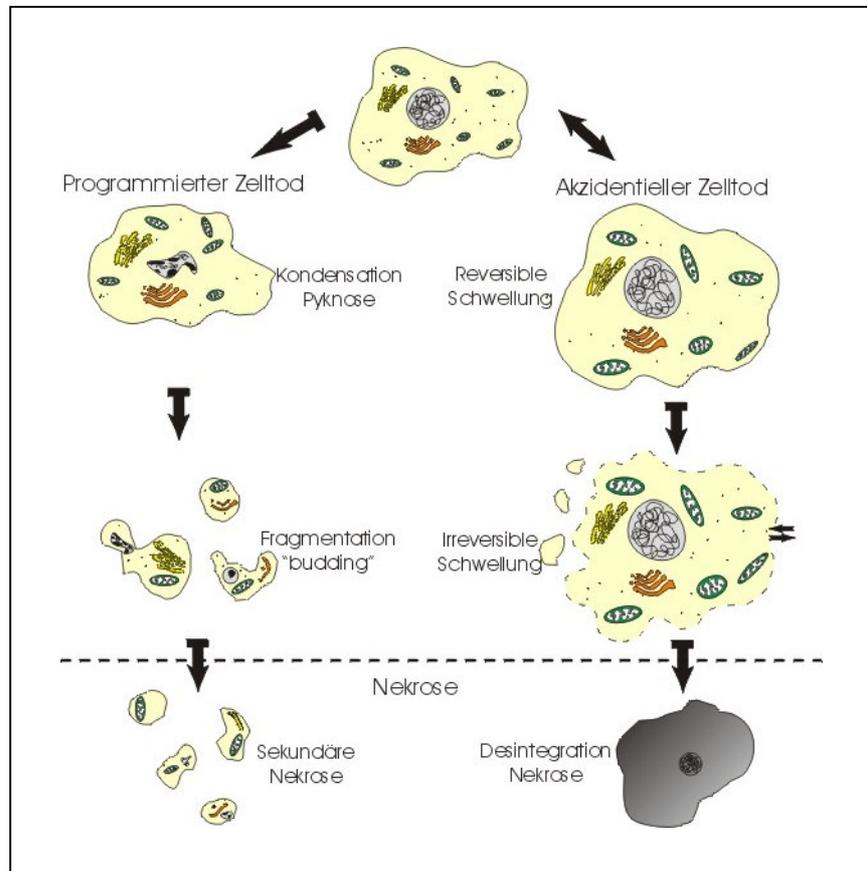
**Tabelle 1.1** *Programmierter und Akzidentieller Zelltod [46, 61]*

<b>Programmierter Zelltod</b>	<b>Akzidentieller Zelltod</b>
<b><i>Morphologische Kriterien</i></b>	<b><i>Morphologische Kriterien</i></b>
Schrumpfen der Zelle	Zellhydrops
Kondensation der Membran, kein Verlust der Integrität	Verlust der Zellmembranintegrität
Kondensation des Chromatins in uniform dichte Masse	Verklumptes Chromatin
Membranebundene Zellkörperchen („apoptotic bodies“)	Lyse der Zelle
<b><i>Biochemische Kriterien</i></b>	<b><i>Biochemische Kriterien</i></b>
Strikt regulierter Prozeß mit aktivierenden Schritten	Verlust der Regulation von Ionen Homöostase
Benötigt Energie	Energie wird nicht benötigt
Benötigt makromolekulare Synthese	Keine Protein- oder Nukleinsäuresynthese notwendig
De Novo Gen Transkription	Keine neue Gentranskription
Nichtstochastische Fragmentation der DNS	Zufällige Verdauung der DNS
<b><i>Physiologische Signifikanz</i></b>	<b><i>Physiologische Signifikanz</i></b>
Tod einzelner Zellen	Tod ganzer Zellgruppen und Geweben
Induziert durch physiologische Stimuli	Induziert durch nichtphysiologische Stimuli
Phagozytose durch Epithelzellen oder Makrophagen	Phagozytose durch Makrophagen
Keine akute Entzündungsreaktion	Signifikante Entzündungsreaktion

### 1.3.3 Nekrose

Als Nekrose bezeichnet man die lichtmikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen, die nach Zelltod auftreten. Sie beinhalten irreversible Veränderungen des Zellkerns (Karyolyse, Pyknose und Karyorhexis), sowie des Zytoplasmas (Kondensation, starke eosinophilie, Strukturverlust und Fragmentation), also alle Veränderungen, die nach programmiertem oder akzidentiellem Zelltod auftreten können (s. Abbildung 1.1).

**Abbildung 1.1** Pathway des Programmierten und Akzidentiellen Zelltods



#### 1.4 Das Fas System

Das Fas System spielt eine wichtige Rolle als initialer Aktivator der Apoptose (3, 202). Es besteht aus dem fibroblast associated receptor (Fas, CD95, APO-1), der nach seiner Aktivierung durch seinen natürlichen Liganden (Fas Ligand, FasL) eine Kaskade proteolytischer Moleküle in Gang setzt, die letztendlich den Tod der Zelle zur Folge hat [8].

Die Fas-vermittelte Apoptose besitzt eine Reihe von immunologischen Aufgaben. Sie ist involviert in Funktionen wie die Reifung und Selektion von B- und T-Zellen, Kontrolle der T-Zell Expansion während einer Immunantwort und der Beendigung von Immunantworten durch Herunterregulation der Zellzahl von Immunzellen [18, 51].

Das Fas System ist außerdem einer der Schlüsselmechanismen bei der T-Zell vermittelten Zytotoxizität [42, 126] und damit auch für den aktiven Teil des Immunsystems von entscheidender Bedeutung. So spielt es beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Eliminierung virusinfizierter oder neoplastischer Fas-Rezeptor positiver Zellen durch Fas-Ligand positive zytotoxische T-Lymphozyten [35, 52, 113].

Eine weitere wichtige Funktion des Fas Systems ist die Bildung eines Immunprivilegs einiger Gewebe [27, 28]. Durch die Fas-Ligand Expression ist es diesen Geweben möglich, infiltrierende Fas-Rezeptor positive Lymphozyten abzuwehren. So wurde beispielsweise beobachtet, dass Lymphozyten, die in Hodengewebe und Gewebe der vorderen Augenkammer infiltrierten durch die Fas-Ligand Expression der genannten Gewebe in Apoptose gingen [4, 27]. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Gegenattacke oder dem „Counterattack“-Modell [78].

Diesem Mechanismus scheinen sich auch zahlreiche maligne Tumorentitäten zu bedienen, die sich zum einen durch die Herunterregulierung des Fas Rezeptors auf deren Zelloberflächen der natürlichen Immunabwehr entziehen können und zum anderen durch die Hochregulierung des Fas Liganden sogar aktiv tumorinfiltrierende Lymphozyten in die Apoptose führen können [5].

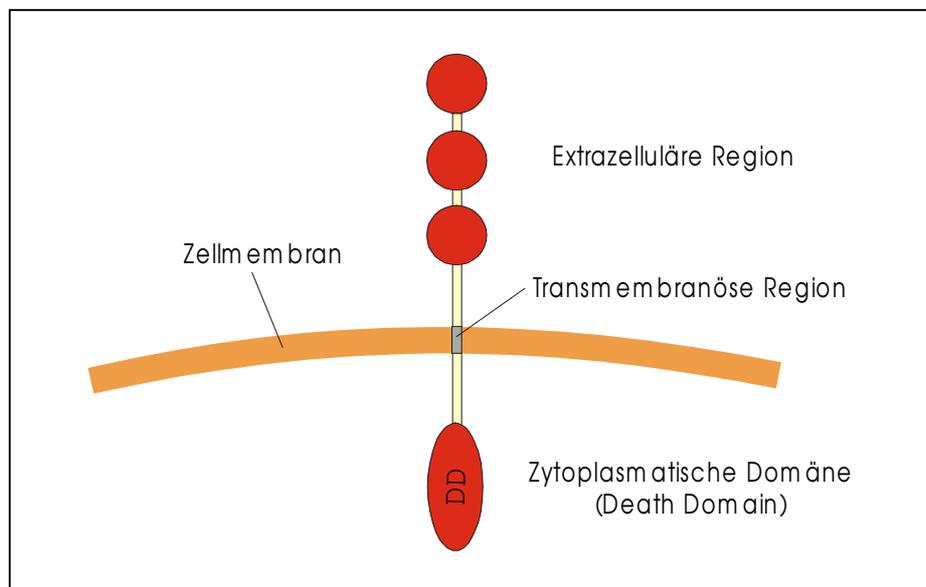
#### *1.4.1 Fas Rezeptor*

Bei dem Fas Rezeptor (Fas, APO-1, CD95) handelt sich um ein integrales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 45-52 kDa [36, 52, 68], das aufgrund seiner sequenziellen Ähnlichkeit der extrazellulären Region der Familie der Tumornekrosefaktor Rezeptoren (TNFR) und Nervenwachstumsfaktor Rezeptoren (NGFR) zugerechnet wird [38, 74, 79, 122]. Zu dieser Familie gehören neben den beiden TNF Rezeptoren TNF-R1, TNF-R2 [38, 74] und dem Nerve growth factor receptor NGFR [41], das B-Zell Aktivierungsantigen CD40 [104], das T-Zell Antigen OX40 [62], das Shope fibromavirus T2 Protein [117], CD27 [54], und CD30 [74]. Der Fas Rezeptor setzt sich aus insgesamt 319 Aminosäuren (AS) zusammen. Auf die extrazelluläre Region, die Fas Ligand binden und somit die Apoptose einleitet kann, entfallen 157 AS, die 3 cysteinreichen Subdomänen [38, 79] bilden (siehe

Abbildung 1.2). Weitere 17 AS bilden die einfache transmembranöse Region [38], die das Apoptose-Signal transduziert und neben der extrazellulären Signalsequenz am NH<sub>2</sub> Terminus den Fas Rezeptor als Cystein-reiches Typ I Membranprotein charakterisiert [38, 74]. Die restlichen 145 AS entfallen auf die zytoplasmatische Domäne [38, 79], deren AS-Sequenz eine signifikante Übereinstimmung mit der von TNFR-1 und CD40 aufweist [38]. Diese intrazelluläre Domäne ist notwendig für die Transduktion des apoptotischen Signals und wird deshalb auch als Todesdomäne (DD, Death Domain) bezeichnet [74]. Während die extrazelluläre Region reich an Cysteinresten ist (18 Reste in 53 AS), besteht die zytoplasmatische Domäne hauptsächlich aus geladenen AS (24 basische und 19 saure AS in 143 AS) [38].

Zusammengefaßt hat der Fas Rezeptor eine Übereinstimmung in der AS-Sequenz mit den anderen Mitgliedern der NGFR/TNFR-Familie von 24-30% [38]. Kodiert wird der Fas Rezeptor auf einer Subregion des chromosomalen Bandes 10q23 [59].

**Abbildung 1.2** *Abbildung des Fas Rezeptors*



Der Fas Rezeptor lässt sich sowohl auf vielen epithelialen humanen Geweben wie Colonmukosa, Ösophagus-Schleimhaut, Epidermis, Leber oder Plazenta [36, 44, 56, 68, 105], als auch auf immunkompetenten Zellen wie aktivierten T- und B-Lymphozyten [115] nachweisen (Übersicht siehe Tabelle 1.2).

**Tabelle 1.2** *Fas Rezeptor positive Gewebe (Übersicht)*

<b>Gewebe</b>	<b>Referenz</b>	<b>Fas Rezeptorexpression (%)</b>
<b>Epitheliale Gewebe</b>		
Epidermis	Lee et al. [56]	10/10 (100)
Normale Colonmukosa	Möller et al. [68]	87/87 (100)
Ösophagus-Schleimhaut	Hughes et al. [36]	10/10 (100)
Plazenta	Kauma et al. [44]	5/5 (100)
Leber	Strand et al. [105]	5/5 (100)
<b>Immunkompetente Zellen</b>		
T-Zellen (ruhend)	Trauth et al. [115]	k.a. (3)
T-Zellen (aktiviert)	Trauth et al. [115]	k.a. (89)
B-Zellen (ruhend)	Trauth et al. [115]	k.a. (0)
B-Zellen (aktiviert)	Trauth et al. [115]	k.a. (91)

k.a. = keine Angaben

Studien, die die Fas Rezeptor-Expression bei malignen epithelialen Tumoren untersuchten, konnten zeigen, dass die Fas Rezeptor-Expression in einem hohen Prozentsatz herunterreguliert ist. So zeigten Strand et al. eine *down*-Regulation bei 100% der 22 untersuchten Hepatozellulären Karzinome (HCC) (siehe Tabelle 1.3). Ähnliche Ergebnisse zeigten Shibakita et al. [99] beim Ösophaguskarzinom mit 72 von 106 (67,9%) *down*-regulierten Tumoren, Gratas et al. [26] mit 15 von 19 Tumoren (79,0%) und Hughes et al. [36] mit 25 von 36 Tumoren (69,5%). Beim Lungenkarzinom zeigten Koomägi et al. [50] bei 75 von 164 Tumoren (45,7%) eine *down*-Regulation, beim Colonkarzinom waren es sogar 87,2% (225/258) [68] (siehe Tabelle 1.3).

**Tabelle 1.3** *Fas down-Regulation bei malignen Tumoren (Übersicht)*

<b>Tumorentität</b>	<b>Referenz</b>	<b>Fas down-Regulation (%)</b>
HCC	Strand et al. [105]	22/22 (100) <sup>1</sup>
Ösophaguskarzinom	Shibakita et al. [99]	72/106 (67,9) <sup>2</sup>
	Gratas et al. [26]	15/19 (79,0) <sup>3</sup>
	Hughes et al. [36]	25/36 (69,5) <sup>4</sup>
Lungenkarzinom	Koomägi et al. [50]	75/164 (45,7) <sup>5</sup>
Colonkarzinom	Möller et al. [68]	225/258 (87,2) <sup>6</sup>

<sup>1</sup> < 75% Fas Expression

<sup>2</sup> Schwache Fas Expr., moderate Expr. bis 2/3 positive Tu-Z oder starke Expr. mit weniger als 1/3 d Tu-Z

<sup>3</sup> <5% der Tumorzellen Fas positiv, nur Plattepithelkarzinome

<sup>4</sup> nur Adenokarzinome

<sup>5</sup> schwach und >50%, moderat und >25%

<sup>6</sup> reduzierte Expression oder kompletter Verlust

#### 1.4.2 Fas Ligand

Der Fas Ligand (FasL) ist ein 281 Aminosäuren großes integrales Membranprotein [84]. Das Fehlen einer Signalsequenz am NH<sub>2</sub>-Terminus [74] und die Anwesenheit einer internen hydrophoben Domäne deuten darauf hin, dass es sich hierbei um ein Typ II Membranprotein mit einer errechneten Masse von 31-40 kDa handelt [108, 111].

Die Untersuchung der Aminosäuresequenz zeigte, dass FasL ebenfalls der Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) zugerechnet werden kann [73, 108, 111]. So bestand eine Übereinstimmung der AS-Sequenz zwischen FasL und TNF- $\alpha$  von 27,8 % und TNF- $\beta$  von 28,7 % [108].

Das für FasL kodierende Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert (1q23.3) [111, 112].

Ursprünglich nahm man an, dass Fas Ligand nur auf aktivierten T-Lymphozyten [7, 108, 111], B-Lymphozyten [29] und natürlichen Killerzellen [22] exprimiert wird und somit auf den leukozytären Stammbaum des Immunsystems beschränkt sei [26]. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass sich Fas Ligand auch in immunprivilegierten Geweben, wie den Sertoli-Zellen des Hodens [4], unterschiedlichsten Geweben im Auge, wie der Cornea, Iris,

Ziliarkörper und Retina [27], dem Zyto- und Synzytiotrophoblast im schwangerem Uterus [3] und dem Stratum granulosum und spinosum der Haut [56] nachweisen lässt (siehe auch Tabelle 1.4).

T-Lymphozyten, die beispielsweise die vordere Augenkammer als Antwort auf eine Herpes Simplex-Infektion infiltrierten, gingen in die Apoptose und richteten keinen Gewebeschaden an [27]. Infektionen bei *gld*-Mäusen, die aufgrund eines genetischen Defektes immundefizient sind (*gld*, generalized lymphoproliferative disease) und denen ein funktioneller Fas Ligand fehlt [111], resultierten in Entzündung und Invasion in Augengewebe ohne Apoptose seitens der Entzündungszellen. Außerdem wurden in einem weiteren Versuch Fas Rezeptor positive Tumorzellen in Augengewebe von gesunden Mäusen implantiert. Hier zeigte sich eine Zerstörung der implantierten Zellen. Bei der Implantation von Tumorzellen in die Augenkammer bei *gld*-Mäusen blieben die Tumorzellen intakt [27].

In weiteren Versuchen wurden Fas Ligand positive Testis-Transplantate von Mäusen unter die Nierenkapsel einer Maus allogene transplantiert und überlebten. Transplantate von *gld*-Mäusen wurden hingegen abgestoßen [4]. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass die Fas Ligand Expression des Hodengewebes für das Immunprivileg verantwortlich ist [73].

**Tabelle 1.4** *FasL-Expression auf unterschiedlichen Geweben (Übersicht)*

<b>Gewebe</b>	<b>Referenz</b>	<b>FasL-Expression</b>
Auge	Griffith et al. [27]	Pos.: Cornea, Iris, Ziliarkörper, Retina
Epidermis	Lee et al. [56] Hahne et al. [30]	Pos. : insbesondere Stratum granulosum und Str. spinosum Neg.: Melanozyten
Plazenta	Bamberger et al. [3]	Pos.: Zyto- und Synzytiotrophoblast
Testis	Bellgrau et al. [4]	Pos.: Sertolizellen des Hodens
T-Zellen (aktiviert)	Suda et al. [108]	Pos.
B-Zellen (aktiviert)	Hahne et al. [29]	Pos.

Pos. = positiv

Neg. = negativ

Auch bei zahlreichen malignen Tumoren, deren Normalgewebe teilweise keine Fas Ligand-Expression aufweisen, konnte eine Expression von Fas Ligand nachgewiesen werden (siehe Tabelle 1.5). Man spricht in der Literatur daher von der Hochregulierung oder „*up*-Regulation“ des Fas Liganden.

So wiesen Koomägi et al. [50] bei 110 von 167 (65,9%) und Niehans et al. [75] bei 23 von 28 untersuchten Lungenkarzinomen (82,1%) eine Fas Ligand-Expression nach. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen Studien zum Ösophaguskarzinom mit 18 von 19 Tumoren (94,7%) mit positiver Fas Ligand-Expression [26] sowie zum Hepatozellulären Karzinom (HCC) mit 3 von 7 (42,9%) Fas Ligand positiven Tumoren [105]. Bei Untersuchungen zum Pankreaskarzinom (n=6) [116] und dem Malignen Melanom (n=7) [30] zeigten 100% der Tumoren eine *up*-Regulation von Fas Ligand auf ihrer Zelloberfläche (siehe Tabelle 1.5).

**Tabelle 1.5** *Fas Ligand Expression bei verschiedenen Tumoren (Übersicht)*

<b>Tumorentität</b>	<b>Referenz</b>	<b>Fas Ligand Expression (%)</b>
Lungenkarzinom	Koomägi et al. [50]	110/167 (65,9) <sup>1</sup>
	Niehans et al. [75]	23/28 (82,1) <sup>2</sup>
Ösophaguskarzinom	Gratas et al. [26]	18/19 (94,7) <sup>3</sup>
Pankreaskarzinom	Ungefroren et al. [116]	6/6 (100%) <sup>4</sup>
HCC	Strand et al. [105]	3/7 (42,9%)
Malignes Melanom	Hahne et al. [30]	7/7 (100%)

<sup>1</sup> >50% der Tumorzellen mit schwacher Expression, >25% mit moderater Expression

<sup>2</sup> Schwache bis mäßige Expression in mehr als 10% der neoplastischen Zellen

<sup>3</sup> >50% der Tumorzellen FasL positiv, nur Plattenepithelkarzinome

<sup>4</sup> Zytoplasma von Adenokarzinomzellen

Über den Mechanismus der Fas Ligand *up*-Regulation können Fas Ligand positive Tumorzellen Fas Rezeptor exprimierende lymphoide Zellen in die Apoptose führen [75] und sich so vor deren Immunattacken schützen. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von dem „Counterattack“-Modell [78]. Hahne et al. [30] beobachteten beispielsweise, dass T-Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Fas Ligand positiven Melanomzellen in die Apoptose gingen,

während T-Zellen, die sich nicht in der Nähe des Tumors befanden, lebensfähig waren. Es wurde daher postuliert, dass die Fas Ligand positiven Tumorzellen für die Induktion von Apoptose bei tumorinfiltrierenden T-Zellen (TIL) sind.

#### 1.4.3 Reaktionskaskade Fas /FasL

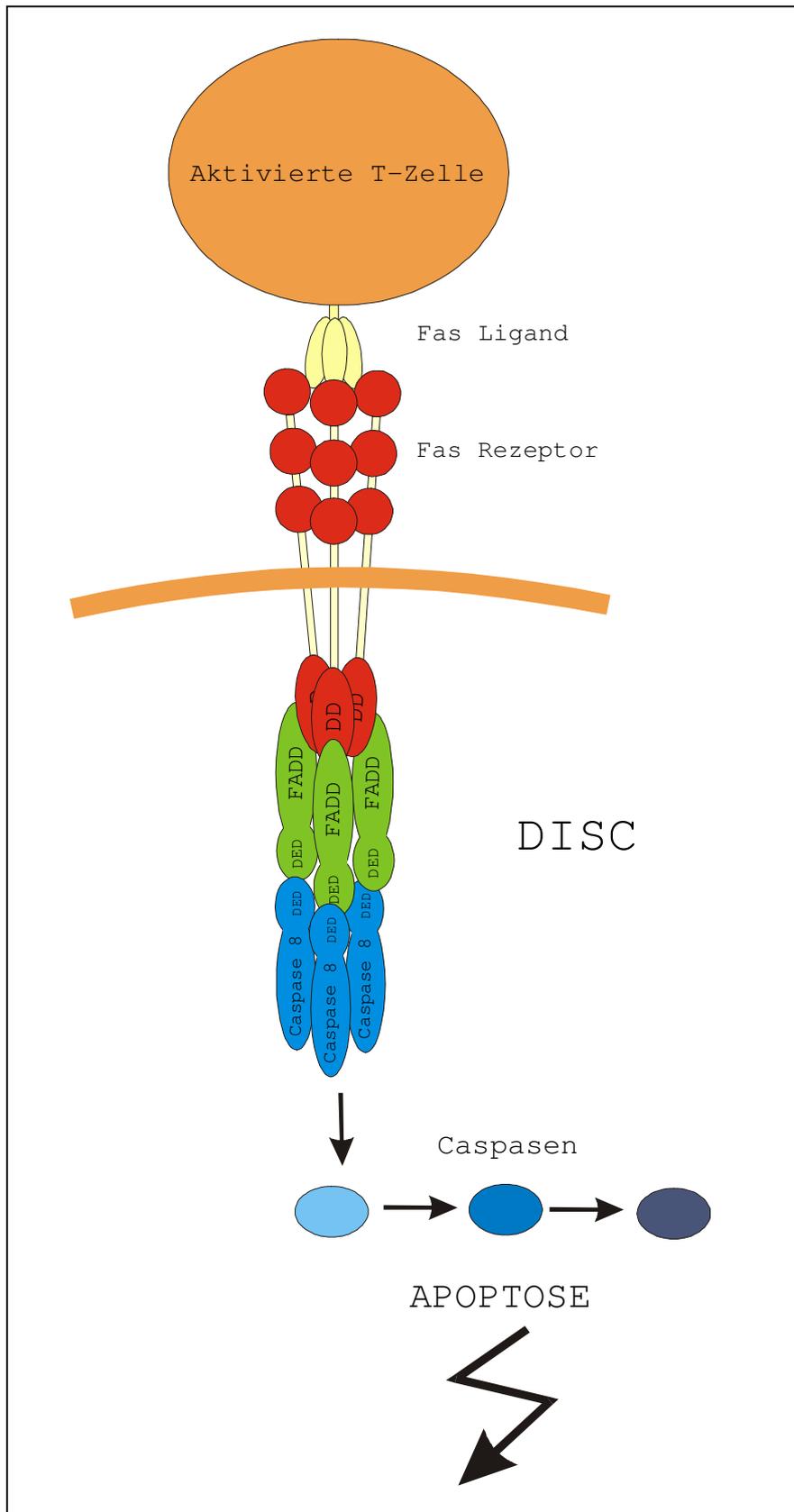
Die Aktivierung des Fas Rezeptors wird entweder durch die Bindung mit einem spezifischen Antikörper gegen Fas oder seinem natürlichen Fas Liganden, der von verschiedenen Zellen exprimiert wird ausgelöst [19, 107]. Es folgt die Weiterleitung des apoptotischen Signals über die intrazelluläre Todesdomäne (DD, Death Domain) des Fas Rezeptors und somit die Auslösung der Zelltodkaskade. Der Effektor-Arm dieser Kaskade wird von einer Familie von Cysteinproteasen gebildet, die Substrate bevorzugt an Aspartatresten spalten und als Caspasen bezeichnet werden [2]. Caspasen bestehen normalerweise aus Einzelstrang-Polypeptidzymogenen und setzen sich aus einer N-terminalen Prodomäne und je einer großen und kleinen katalytischen Untereinheit zusammen. Durch eine proteolytische Spaltung an internen Aspartatresten wird die Aktivierung des zwei-Ketten Enzyms erreicht [145]. Auf diesem Wege können sich Caspasen gegenseitig aktivieren, analog zur Zymogenaktivierung bei der Gerinnungskaskade [8]. Diese direkte nicht-transkriptionale Verbindung zwischen der Aktivierung eines Zytokinrezeptors durch seinen natürlichen Liganden und die Effektorproteasen könnte die hohe Geschwindigkeit des Fas-induzierten Zelltodes erklären [126]. Es wird von einer Dauer von 5 Stunden vom Zeitpunkt der Aktivierung bis zum Zelltod berichtet [74].

Durch die Aktivierung des Fas Rezeptors kommt zur Formation eines Signalkomplexes, dem sogenannten Fas death-inducing signaling complex (DISC) [48, 101]. Dieser setzt sich aus einem Set von Signalmolekülen zusammen, die als cytotoxicity-dependent APO-1-associated proteins (CAP1-4) bezeichnet werden [48]. Der Bildung des DISC folgt die Freisetzung eines aktiven Enzyms, welches letztendlich über eine proteolytische Reaktionskaskade zum Tod der Zelle führt. Der Aufbau des Signalkomplexes geht in einer hierarchisch strukturierten Ordnung vor sich (siehe auch Abbildung 1.3).

Durch die Fas Ligand induzierte Rezeptortrimerisierung, kommt es zur Aggregation der intrazellulären Death Domain (DD, Todesdomäne) des Fas Rezeptors und zur Rekrutierung des Adapterproteins FADD [71, 95] (Fas associated death domain [9, 12, 71], CAP-1/-2 [9, 12], MORT-1 [8, 9, 12]). Die direkte physikalische Assoziation des C-terminalen Endes der DD des Fas Rezeptors mit der entsprechenden C-terminalen Todesdomäne von FADD löst eine Konformationsänderung im N-terminalen Segment von FADD aus [9, 12], das auch als DED (N-terminal death effector domain) bezeichnet wird [13, 71]. Die Konformationsänderung in der DED von FADD ermöglicht wiederum deren Bindung an die korrespondierende DED von Caspase 8 (FLICE [71], MACH-1/MACH- $\alpha$  [8]). Das als CAP-4 (CAP = cytotoxicity-dependent APO-1-associated protein) [48] bezeichnete inaktive Einzelstrang-Polypeptid-Zymogen von Caspase 8 (FLICE, FADD-like ICE [71], MACH [8]) spaltet sich durch seine eigene intrinsische enzymatische Aktivität [70] in eine Prodomäne (CAP-3), die am DISC gebunden bleibt, und ein aktives heterodimeres Enzym, das aus großen und kleinen katalytischen Untereinheiten besteht (p20/p10) [71]. Dieses Enzym löst sich vom DISC und verstärkt so das apoptotische Signal entweder durch direkte Spaltung weiterer Caspasen, wie Caspase-3, -6 und -7 [71, 114] oder indirekt durch die Spaltung von Bid, einem Mitglied BH3-haltiger Proteine [58] und der Induktion von Cytochrom c Freisetzung aus Mitochondrien [128], was wiederum die Formation des apoptosomen Komplexes induziert. Sobald Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt wird, aktiviert es, zusammen mit den anderen beiden zytosolischen Proteinfaktoren Apaf-1 und Procaspase-9, Caspase 3.

Diese Mechanismen sind verantwortlich für die morphologischen Veränderungen, die bei der Apoptose beobachtet werden können.

Abbildung 1.3 Das Fas System



## 2 Patienten und Methoden

### 2.1 Patienten

Die Durchführung der vorliegenden Studie wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt.

Von 70 Patienten mit Ösophaguskarzinom, die sich im Zeitraum von April 1992 bis Juli 1999 im Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg, einer operativen Therapie ihrer Tumorerkrankung unterzogen, konnte Tumormaterial für die vorliegende Untersuchung asserviert werden. Bei allen Patienten wurde eine *en bloc* Ösophagektomie mit mediastinaler und abdomineller Lymphadenektomie durchgeführt. Zusätzlich wurden Proben aus 483 vom Operateur als nicht suspekt eingestuftem Lymphknoten asserviert. Das Resektat wurde in der Abteilung für Pathologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg, (Leitender Direktor: Prof. Dr. U. Helmchen) aufgearbeitet und histopathologisch beurteilt. Hier wurden die Tumoren bezüglich des Stadiums und des Differenzierungsgrades gemäß der Richtlinien der 5. Auflage der TNM-Klassifikation der „Union International Contre Cancer (UICC)“ klassifiziert [124].

Patienten mit Fernmetastasen außerhalb der lokoregionären Lymphknoten (Stadium IVb nach UICC) wurden aus der Nachbeobachtungs-Studie ausgeschlossen. Patienten, bei denen keine vollständig tumorfreien Resektionränder erzielt werden konnten (R1/R2-Resektion) oder die innerhalb von 4 Wochen nach der Operation verstarben, wurden ebenfalls von der Berechnung des rezidivfreien Intervalls und der Gesamtüberlebenszeit ausgeschlossen. Diese Kriterien trafen insgesamt auf 15 der 70 Patienten zu. Keiner der Patienten erhielt eine neoadjuvante oder adjuvante Radio- und/oder Chemotherapie.

#### 2.1.1 Charakterisierung der Patienten

Zum Zeitpunkt der Operation betrug das Alter der insgesamt 70 Patienten mit Ösophaguskarzinom zwischen 36 und 80 Jahre (Median = 58,8 Jahre). 54 Patienten (77,1%) waren Männer und 16 Patienten (22,9%) waren Frauen.

Bei 61 Patienten (87,1%) gelang eine Entfernung des Karzinoms mit tumorfreien Resektionsrändern (R0), bei 9 Patienten (12,9%) konnte der Tumor nicht im Gesunden entfernt werden (R1).

39 von 70 der Tumoren (55,7%) wurden histopathologisch dem Plattenepitheltyp und 31 (44,3%) dem Adenokarzinomtyp zugeordnet. Die Karzinome waren in 41 Fällen (58,6%) mäßiggradig (G2) und in 29 Fällen (41,4%) gering (G3) differenziert. Die postoperative histopathologische Untersuchung hinsichtlich der Infiltrationstiefe ergab bei 6 Tumoren (8,6%) ein pT1-Stadium, bei 25 (35,7%) ein Stadium pT2 und in der Mehrzahl mit 39 von 70 Tumoren (55,7%) eine Infiltrationstiefe im Stadium pT3. Bei 44 Patienten (62,9%) konnten histopathologisch Tumorzellabsiedlungen in den regionären Lymphknoten detektiert werden (N1), bei 26 der Patienten (37,1%) waren die Lymphknoten tumorfrei (N0). Sechs der 70 Patienten (8,6%) hatten bereits Metastasen in den zervikalen oder zöliakalen Lymphknoten (Mlymph).

Zusammenfassend umfasste die postoperative Stadieneinteilung 5 (7,1%) Stadium I-, 21 (30,0%) Stadium IIa, 14 (20,0%) Stadium IIb-, 24 (34,3%) Stadium III und 6 (8,6%) Stadium IVa-Tumoren (siehe Tabelle 2.1).

#### *2.1.1.1 Adenokarzinome*

Die Gruppe der Adenokarzinome (n=31) bestand aus 25 Männern und 6 Frauen. In 24 Fällen (72,7%) gelang eine R0-Resektion, in 7 Fällen (27,3%) konnte lediglich R1 reseziert werden. Das Primärstadium der Patienten umfasste einen Stadium I-Tumor (3,2%), fünf Stadium IIa-Tumoren (16,1%), sowie 10 Stadium IIb-Tumoren (32,3%). Die Mehrzahl der Patienten (48,4%) hatte Tumoren, die sich bereits im Stadium III oder IVa befanden. Überwiegend (61,3%) handelte es sich um schlecht differenzierte Tumoren, 38,7% (n=12) waren mäßig differenziert und keiner dieser Tumoren war gut differenziert.

Der Hauptteil der Adenokarzinome war im unteren Drittel lokalisiert (90,3%), bei zwei der Patienten befand sich der Tumor im mittleren Drittel (6,5%) und ein Patient (3,2%) hatte ein Adenokarzinom im oberen Drittel des Ösophagus (siehe Tabelle 2.1).

**Tabelle 2.1** Charakteristika der Ösophaguskarzinome

<b>Charakteristika</b>	<b>SCCE<sup>1</sup></b> <b>Anzahl (%)</b> <i>n=39</i>	<b>ACE<sup>2</sup></b> <b>Anzahl (%)</b> <i>n=31</i>	<b>Gesamt</b> <b>Anzahl (%)</b> <i>n=70</i>
<b>Altersmedian</b>	59 ± 8,89 Jahre	56 ± 11,88 Jahre	58,5 ± 10,24 Jahre
<b>Geschlecht</b>			
Männlich	29 (74,4)	25 (80,6)	54 (77,1)
Weiblich	10 (25,6)	6 (19,4)	16 (22,9)
<b>Resektionsstatus</b>			
R0	37 (94,9)	24 (77,4)	61 (87,1)
R1	2 (5,1)	7 (22,6)	9 (12,9)
<b>Lokalisation</b>			
Oberes Drittel	9 (23,1)	1 (3,2)	10 (14,3)
Mittleres Drittel	22 (56,4)	2 (6,5)	24 (34,3)
Untere Drittel	8 (20,5)	28 (90,3)	36 (51,4)
<b>Primärtumorstadium</b>			
pT1	5 (12,8)	1 (3,2)	6 (8,6)
pT2	9 (23,1)	16 (51,6)	25 (35,7)
pT3	25 (64,1)	14 (45,2)	39 (55,7)
<b>Lymphknotenstadium</b>			
pN0	20 (51,3)	6 (19,4)	26 (37,1)
pN1	19 (48,7)	25 (80,6)	44 (62,9)
<b>Lymphknoten-Fernmetastasen</b>			
pM(lymph)0	37 (94,9)	27 (87,1)	64 (91,4)
pM(lymph)1	2 (5,1)	4 (12,9)	6 (8,6)
<b>UICC Stadium</b>			
I	4 (10,3)	1 (3,2)	5 (7,1)
Ila	16 (41,0)	5 (16,1)	21 (30,0)
IIb	4 (10,3)	10 (32,3)	14 (20,0)
III	13 (33,3)	11 (35,5)	24 (34,3)
IVa	2 (5,1)	4 (12,9)	6 (8,6)
<b>Differenzierungsgrad</b>			
G1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
G2	29 (74,4)	12 (38,7)	41 (58,6)
G3	10 (25,6)	19 (61,3)	29 (41,4)

<sup>1</sup> SCCE = squamous cell carcinoma of the esophagus = Ösophagus-Plattenepithelkarzinome<sup>2</sup> ACE = adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia = Ösophagus-Adenokarzinome

### 2.1.1.2 Plattenepithelkarzinome

Bei 39 Patienten (55,7%) aus dieser Studie wurde ein Plattenepithelkarzinom diagnostiziert. Es handelte sich dabei um 29 Männer und 10 Frauen im Alter von 36 bis 73 Jahren (Altersmedian 59 Jahre).

In 37 Fällen (94,9%) gelang eine R0-Resektion, in 2 Fällen (5,1%) konnte lediglich R1-reseziert werden.

Das am häufigsten diagnostizierte Primärstadium bei den Plattenepithelkarzinomen war mit 41,0% das Stadium IIa. Vier Patienten hatten Stadium I-Tumoren (10,3%), 4 Stadium IIb-Tumoren (10,3%), 13 Stadium III-Tumoren (33,5%) und 2 Stadium IVa-Tumoren (5,1%).

Keiner dieser Tumoren war gut differenziert, 74,4% waren mäßig differenziert und 10 von 70 (25,6%) waren schlecht differenzierte Tumoren.

Die Mehrheit der Plattenepithelkarzinome war im mittleren Drittel lokalisiert (56,4%), bei 9 der Patienten befand sich der Tumor im oberen Drittel (23,1%) und 8 Patienten (20,5%) hatten ein Plattenepithelkarzinom im unteren Drittel des Ösophagus (siehe Tabelle 2.1).

### *2.1.2 Nachbeobachtung*

Patienten, die innerhalb der ersten 30 Tage nach der Operation verstarben, oder bei denen keine tumorfreien Resektionsränder erzielt werden konnten, wurden aus der Erhebung der Nachbeobachtungsdaten ausgeschlossen. Damit verblieben 55 Patienten, die für die postoperative Nachbeobachtung zur Verfügung standen.

In halbjährlichen Abständen wurden die Hausärzte der Patienten schriftlich kontaktiert. Mit Hilfe eines Fragebogens wurden Daten über Lokalisation und Zeitpunkt von möglichen Lokalrezidiven und Fernmetastasen, sowie Todeszeitpunkt und Todesursache bei verstorbenen Patienten erhoben. Soweit Patienten stationär nachgesorgt oder erneut stationär aufgenommen wurden, standen zusätzliche Daten über die Allgemeinchirurgischen Poliklinik zur Verfügung.

## **2.2 Aufarbeitung des Gewebes**

Im Anschluß an die chirurgische Tumor-*en-bloc*-Resektion wurde das Präparat eröffnet und eine repräsentative Tumor-Gewebeprobe entnommen. Anschließend wurde die Probe in Tissue Tek (Miles Inc., Sakura, 4583) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Im Rahmen der Lymphadenektomie wurden Lymphknoten systematisch gesammelt, geteilt und sowohl für die histopathologische, als auch für die immunhistochemische Analyse asserviert. Im Bereich des thorakalen Ösophagus wurden die mediastinalen tumornahen Lymphknoten und sowohl die oralwärts des Tumors gelegen, als auch die aboral des Tumors gelegenen mediastinalen Lymphknoten entnommen. Im abdominalen Feld wurden die an der Arteria hepatica communis und am Truncus coeliacus gelegenen Lymphknoten entnommen. Alle Lymphknoten wurden vom Operateur nach dem von Casson et al. [54] modifizierten Schema der "American Thoracic Society" anatomischen Regionen zugeordnet und entsprechend nummeriert. Dabei wurden als unauffällig eingestufte Lymphknoten in jeweils zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde für die histopathologische Routineuntersuchung in Paraffin eingebettet, der andere Teil des jeweiligen Lymphknotens wurden nach der Entnahme ebenfalls in Tissue Tek (Miles Inc., Sakura, 4583) eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle entnommenen Gewebeproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C im einem Tiefkühlschrank gelagert.

Für die immunhistochemische Färbung wurden von jedem Primärtumor 10 serielle Schnitte mit einer Dicke zwischen 4 und 7µm im Kryostaten (Microm, Germany, Code HM 505 E) angefertigt und auf beschichtete Adhäsionsobjektträger (Marienfeld, Histobond, 901236) aufgebracht. Zusätzlich wurden von allen konventionell histopathologisch als „tumorfrei“ befundene Lymphknoten ebenfalls jeweils 2 Schnittpräparate aus drei verschiedenen Ebenen angefertigt.

## **2.3 Immunhistochemische Färbungen**

### *2.3.1 Darstellung der Fas-/FasL-Expression*

Für die Darstellung des Fas Rezeptors und des Fas Liganden bei Ösophaguskarzinomen wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC) verwendet.

#### 2.3.1.1 ABC-Methode

Der zelluläre Antigennachweis für die immunhistochemische Darstellung mit Hilfe der Avidin-Biotin-Methode gehört aufgrund der hohen Affinität des Avidins zum Biotin unter den Immunperoxidase-Färbemethoden zu einem der Verfahren mit größter Empfindlichkeit [34]. Es basiert auf der Fähigkeit des Avidins 4 Moleküle des Biotins physikalisch zu binden. Der Primärantikörper, der spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet ist, wird durch einen Biotin konjugierten Sekundärantikörper gebunden. Anschließend wird ein Avidin-Biotin-Komplex zugesetzt, der sich aus einem Avidin-Molekül und drei daran gebundenen Peroxidase-konjugierten Biotin-Molekülen zusammensetzt. Die vierte freie Stelle des Avidinmoleküls ermöglicht die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase katalysiert die Umsetzung des in einem Folgeschritt zugefügten Chromogens Diaminobenzidin in eine intensive Braunfärbung und macht so das gesuchte Antigen indirekt sichtbar.

#### 2.3.1.2 Primärantikörper

Der Nachweis des Fas Rezeptors (Fas) wurde mit Hilfe eines monoklonalen Maus Anti-Fas Antikörpers DX2 (Pharmingen, U.S.A., 33451A) geführt (siehe Tabelle 2.2). Im Rahmen von Verdünnungsreihen wurde für diesen Antikörper 1µg/ml (Verdünnung 1:500) als Konzentration mit den besten Färbeergebnissen ermittelt. Der Pufferlösung (PBS, pH 7,4) zur Verdünnung der Antikörper wurde 1g/100ml Rinderserumalbumin (BSA, Dako A/S, Dänemark) zugesetzt (1% BSA/PBS, pH 7,4), um durch die erhöhte Proteinkonzentration die unspezifische Hintergrundreaktivität zu reduzieren.

Die Expression des Fas Ligand (FasL) wurde mit dem polyklonalen Kaninchen Antikörper Q 20 (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A., sc-956), 1:200 (1µg/ml) ebenfalls in 1% BSA/PBS verdünnt, dargestellt. Färbungen mit den monoklonalen Maus Anti-Fas Ligand Primärantikörpern G 247-4 (Pharmingen, U.S.A., 65431A), sowie 33 (Transduction Laboratories, U.S.A., F 37720) führten zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen (siehe Tabelle 2.2).

Zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse dienten Positivkontrollen, die bei jeder Färbung mit angefertigt wurden. Als Fas Positivkontrolle wurden Schnittpräparate von gesunder Colon-Schleimhaut und histopathologisch

metastasenfreien Lymphknoten verwendet. Um falsch-negative Ergebnisse bei der Fas Ligand Färbung auszuschließen, wurden bei jeder Färbung Gewebeschnitte eines malignen Melanoms als Positivkontrolle mit verarbeitet. Zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse aufgrund einer unspezifischen Antikörperbindung wurden Folgeschnitte der entsprechenden Tumorpräparate einer Isotypkontrolle unterzogen. Hierzu wurden die Schnittpräparate anstelle des Primärantikörpers mit den entsprechenden Non-Immunsereen benetzt. Diese Seren entstammen der selben Spezies wie der Primärantikörper und enthielten außer dem spezifischen Primärantikörper sämtliche Immunglobulinkomponenten. Als Isotypkontrolle für die Fas Rezeptorfärbung wurden Maus-Immunglobuline (IgG<sub>1</sub>) (MOPC-21, Sigma, M-9269) verwendet. Bei der Fas Ligandfärbung wurden die Schnittpräparate mit Kaninchen IgG (Sigma, Technical Grade, U.S.A., I8140) inkubiert. Zusätzlich wurde je ein konsekutiver Gewebeschnitt mit einer Lösung von Fas Ligand Antikörper (Q-20) und dessen entsprechenden Blocking Peptide (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A, sc-956 P) im Verhältnis 1:10 als zusätzliche Negativkontrolle inkubiert. Dieses Blocking Peptide bindet mit hoher Affinität an Fas Ligand und blockiert so die spezifische Bindung des anti-FasL-Antikörpers.

**Tabelle 2.2** *Primärantikörper*

<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Ig-Subtyp</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Referenzen</b>
DX2	Pharmingen	Fas Rezeptor	IgG <sub>1</sub> , κ	1:500	[36, 116]
Q20	Santa Cruz	Fas Ligand	IgG	1:200	[26]
G247-4	Pharmingen	Fas Ligand	IgG <sub>1</sub>	k.E.	[28, 111]
33	Transduction	Fas Ligand	IgG <sub>1</sub>	k.E.	[113]

k.E. = keine verwertbaren Ergebnisse

### 2.3.1.3 Durchführung

Nach dem Auftauen wurden die Kryoschnitte zunächst für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet, bei 4°C in 100% Aceton fixiert und

zweimalig für je 5 Minuten in Pufferlösung (PBS, pH 7,4) – wie auch bei allen folgenden Schritten bei Raumtemperatur - rehydriert. Um die unspezifische Hintergrundfärbung so minimal wie möglich zu halten, wurden eine Reihe von Block- und Hemmschritten der eigentlichen Färbeprozedur vorausgeschickt:

- 1.) Blocken der endogenen Peroxidasereaktivität: Einbringen der Schnittpräparate in ein Bad aus 1% Wasserstoffperoxid in PBS für 10 Minuten
- 2.) Hemmen unspezifischer Avidin/Biotin Bindung: Inkubation der Schnitte mit Avidin- und Biotin-Lösung (Vector Laboratories, USA, Avidin-biotin blocking kit, SP-2001) für je 15 Minuten
- 3.) Vermeidung unspezifischer Antikörperanlagerung an elektrisch geladene Stellen von Kollagen und sonstigen Bindegewebes: Auftragen eines neutralen 0,1% Non-Immun-Pferdeserums (aus Vectastain Elite ABC KIT, PK-6200) für 20 Minuten

Als nächster Schritt folgte das Abklopfen des überschüssigen Serums, so dass eine dünne Schicht auf dem Gewebe verblieb. Anschließend wurden die oben aufgeführten Antikörper, respektive deren entsprechenden Isotypkontrollen, auf die Schnittpräparate aufgetragen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte unter Benutzung des Vectastain Universal Elite ABC KIT (Vector Laboratories, U.S.A, PK-6200) die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 30 Minuten, sowie dem Avidin-Biotin-Komplex, ebenfalls für 30 Minuten. Die auf dem Avidin-Biotin-Komplex gebundene Peroxidase wurde darauffolgend mit einer 3,3'-Diaminobenzidin Lösung als Chromogen (Vector Laboratories, SK-4100), die für 5 Minuten aufgetragen wurde, sichtbar gemacht.

Als Gegenfärbung wurden die Schnittpräparate für 5 Minuten in Mayer's Hämatoxilin Lösung (Sigma, U.S.A, MHS-32) getaucht und anschließenden für weitere 7 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut.

Als letzter Schritt folgte das Eindeckeln der Schnittpräparate mit Glycingelatine (Dako A/S, Dänemark, Glycergel, C 0563) (siehe auch 6.3.1 Färbeprotokoll ABC im Anhang).

### 2.3.2 Detektion von isolierten Tumorzellen in Lymphknoten

Für den Nachweis isolierter Tumorzellen in Lymphknoten wurde der antiepitheliale monoklonale Antikörper Ber-Ep-4 (Dako A/S, Dänemark, M0804) gewählt und mit Hilfe der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase-Komplex-Methode (APAAP) zur Darstellung gebracht.

#### 2.3.2.1 APAAP-Methode

Die Enzym-Immunkomplex Methoden, zu denen die APAAP-Methode gehört, zählen ebenfalls zu den empfindlichsten immunhistochemischen Nachweismethoden überhaupt, da hier die natürliche Affinität von Antikörpern gegenüber ihrem Antigen zur Komplexbildung genutzt wird und somit, im Gegensatz zu der Avidin-Biotin-Methode, auf das chemische Verfahren der Konjugation verzichtet werden kann. Aufgrund der mehrfach vorhandenen Bindungsmöglichkeiten von Brücken und Tertiärantikörper liegt bei dieser Methode eine erheblich höhere Enzymdichte vor, als bei anderen immunhistochemischen Methoden, so dass hier ein besonders intensives Färbesignal entsteht [16]. Ein weiteres Kriterium für die Auswahl der APAAP-Methode ist die Farbreaktion unter Verwendung des Enzyms alkalische Phosphatase. Im Lymphknoten ist dieses Enzym nur in sehr geringen Mengen vorhanden und lässt sich leicht mit Levamisol (Sigma, U.S.A, L 9756) blockieren. So können unspezifische Anfärbungen durch endogene alkalische Phosphatase vermieden werden. Der APAAP-Komplex (der Tertiär-Antikörper der APAAP-Methode), besteht aus dem Enzym alkalische Phosphatase und einem monoklonalen „anti-alkalische Phosphatase“ Antikörper der Maus. Dieser Mausantikörper hat eine zweite Bindungsstelle, die spezifisch gegen ein Epitop auf Kaninchenantikörpern gerichtet ist, so dass eine Antikörperkette entsteht an deren Ende der Enzym-Immunkomplex steht.

#### 2.3.2.2 Primärantikörper

Um in Lymphknoten lokalisierte isolierte epitheliale Zellen nachzuweisen, wurde der monoklonale anti-epitheliale Antikörper Ber-EP4 (Dako A/S, Dänemark, Code-Nr. M 804) verwendet, der zu der Immunglobulinsubklasse IgG1 (kappa) gehört. Er wird durch Reinigung des Kulturüberstandes der MVF-7 Zelllinie gewonnen und eignet sich sowohl für in Paraffin eingebettetes Material, als auch für Kryoschnitte. Im Rahmen von Verdünnungsreihen wurden die

besten Ergebnisse mit einer Verdünnung von 1:400 (0,625µg/ml) erzielt, die dann entsprechend für die Färbung der Lymphknoten zur Anwendung kam. Als Positivkontrolle dienten Kryoschnitte von Kolonmukosa.

Zum Ausschluss unspezifischer Färbungen wurden mit den entsprechenden Lymphknoten eine Isotypkontrolle mit dem Mausantikörper MOPC-21 (Sigma, Code-Nr. M-9269) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein Non-Immuserum, das gegen kein spezifisches Epitop gerichtetes ist. Es gehört ebenfalls der IgG<sub>1</sub> Subklasse an und wurde in der jeweils gleichen Verdünnung wie der spezifische Primärantikörper verwendet.

Ber-EP4 reagiert zuverlässig mit allen epithelialen Geweben und Karzinomen, mit Ausnahme von Hepatozyten, Parietalzellen, epidermalen Keratinozyten und den apikalen Zellschichten von Plattenepithelien. Dieser Antikörper wurde erstmalig eingesetzt, um maligne Mesotheliome von Adenokarzinomen zu unterscheiden. Er ist gegen zwei Glykoproteine gerichtet, die auf der Oberfläche epithelialer Zellen exprimiert werden. Diese Glykoproteine haben ein Molekulargewicht von 34 kD und 39 kD [55, 98]. Die Funktion dieses Moleküls ist bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt. Vieles spricht aber dafür, dass Ber-EP4 das auch unter der Bezeichnung 17-1A oder EGP40 bekannte epithelial cell adhaesion molecule (Ep-CAM) erkennt [53]. Das ubiquitäre Vorkommen auf epithelialen Geweben und die Expression auf selbst weitgehend entdifferenzierten Karzinomen lässt es als sicheren epithelialen Marker erscheinen. Alle bisher getesteten Karzinome, mit Ausnahme des hepatozellulären Karzinoms und des Adenokarzinoms der Niere, sowie des Adenokarzinoms der Mamma, zeigten eine positive Reaktion mit Ber-EP4 [98]. Um die Spezifität von Ber-EP4 zu verdeutlichen, wurden in einer früheren Studie Lymphknoten von einer Kontrollgruppe mit 24 Patienten mit mesenchymalen Neoplasien, benignen Tumoren oder entzündlichen Veränderungen mit Ber-EP4 und der APAAP-Methode untersucht. Hierbei konnte bei keinem Patienten eine Anfärbung nachgewiesen werden [86]. Aufgrund der hohen Spezifität für epitheliale Zellen, erscheint dieser Antikörper geeignet, um Lymphknoten auf isolierte Tumorzellen von epithelialen Tumoren in dieser Studie zu untersuchen [33, 39].

### 2.3.2.3 Durchführung

Nach dem Auftauen wurden die Kryoschnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend eine Minute in Aceton anfixiert. Darauf folgte eine 5-minütige Rehydrierung in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (TBS, pH 7,4). Nach der Fixierung wurden die Schnitte für 20 Minuten mit AB-Serum, 1:10 in TBS verdünnt, inkubiert. AB-Serum ist ein antikörperfreies Serum von Spendern der Blutgruppe AB (Biotest Diagnostics 805135). Durch diesen Schritt werden unspezifische Hintergrundfärbungen, die durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Kollagen und anderen Bindegewebeelementen entstehen, vermieden.

Als nächster Schritt erfolgte die Inkubation des Primärantikörper Ber-EP4 (Dako A/S, Dänemark, Code-Nr.:M 804) bei einer Verdünnung von 1:400 (0,625µg/ml) für 45 Minuten. Nach dreimaligem Waschen in TBS für 5 Minuten, wurde der Kaninchen Anti-Maus Brückenantikörper (Dako A/S, Dänemark, Code-Nr. Z 259) mit einer Verdünnung 1:50 (64µg/ml) für 30 Minuten inkubiert. Dieser Antikörper verbindet den Primärantikörper mit dem Enzym-Immunkomplex, der ebenfalls von der Maus stammt.

Nach dreimaligem Waschen in TBS, wurde nun der APAAP-Komplex (Dako A/S, Dänemark, Code-Nr. D 651, Klon AP7/6/7) mit einer Verdünnung von 1:100 (0,9µg/ml) für 30 Minuten inkubiert. Dieser Immun-Enzym-Komplex besteht aus alkalischer Phosphatase, die aus Kälberdarm gewonnen wird und einem monoklonalen Mausantikörper der gegen alkalische Phosphatase gerichtet ist. Dieser Antikörper ist mit einem zweiten Arm auch gegen Epitope des Kaninchen Antikörpers gerichtet.

Alle Inkubationen werden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Die Entwicklung der Färbereaktion erfolgte mit Neufuchsin. Hierbei wird das Substrat Naphtholphosphat-Ester durch alkalische Phosphatase zu Phenolkomponenten und Phosphaten hydrolysiert. Die Phenole reagieren mit Diazoniumsalzen (Chromogenen) und bilden so unlösliche Azofarbstoffe. Das Chromogen Neufuchsin bildet ein intensiv rotes Reaktionsprodukt.

Für den Substratansatz einer Küvette mit 150ml Färbelösung mussten 3 verschiedene Lösungen (A,B,C) angesetzt werden. Zunächst wurden zu 150ml

0,05M Trispuffer, 1,7g NaCl und 60mg Levamisole vermischt (Lösung A). Der pH-Wert dieser Lösung wurde auf 8,24 eingestellt. Das Levamisole dient der Blockade von endogener alkalischer Phosphatase.

Für die Lösung B wurden 30mg Naphtol AS-BI-phosphat (Sigma, N 2250) in 0,75ml N,N-Dimethylformamid (Sigma, U.S.A, D 4254) gelöst.

Lösung C wurde aus 0,3ml 5% Neufuchsin (Sigma, U.S.A., N 0638; 5g in 100ml 2N HCL) und 7,5ml 4% Natriumnitrit (Sigma, U.S.A., S 2252) hergestellt. Die Substanzen der Lösung C mussten für 60 Sekunden miteinander reagieren. Anschließend wurde die Lösung B zu Lösung A gegeben, gemischt und Lösung C hinzugefügt.

Die entstandene Färbelösung wurde gefiltert, in eine Küvette mit den Objektträgern gegeben und für 30 Minuten mit den gebundenen Enzymkomplexen inkubiert. Die Färbereaktion wurde im Dunkeln durchgeführt werden, da die Färbelösung lichtempfindlich ist.

Nach der Färbung mit Neufuchsin wurden die Objektträger mit Aqua Dest. gespült und für 30 Sekunden zur Kernfärbung mit Hämatoxylin Gill gegengefärbt. Die Kernfärbung mit Hämatoxylin wurde durch 5-minütiges Waschen in leicht alkalischem Leitungswasser intensiviert.

Abschließend wurden die Schnitte mit Crystal Mount (Biømeda, Code-Nr. MØ 3) überschichtet, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und am nächsten Tag mit Permount (Fisher Scientific, Code-Nr. SP 15-500) mit Deckgläschen versehen (siehe auch 6.3.2 Färbeprotokoll APAAP im Anhang).

## **2.4 Auswertung**

Die lichtmikroskopische Auswertung der Schnittpräparate wurde von zwei unabhängigen Beobachtern ohne Kenntnis der Patientendaten vorgenommen. Die Beurteilung für die Fas Rezeptor- und Fas Ligandfärbung erfolgte sowohl semiquantitativ, als auch hinsichtlich der Färbeintensität.

Die Lymphknoten wurden auf einzelne Ber-EP4 positive Zellen hin untersucht. Kam es bei Präparaten zu abweichenden Ergebnissen, wurde noch einmal gemeinsam beurteilt und ein Konsens hergestellt.

### 2.4.1 Fas und Fas Ligand

In die Beurteilung der ABC-Färbungen mit dem Anti-Fas-Antikörper ging sowohl der prozentuale Anteil der gefärbten Tumorzellen, als auch deren Färbeintensität ein (siehe Tabelle 2.3). So wurden Schnittpräparate, bei denen der Tumoranteil nur 0 bis 10% der Zellen keine oder eine nur sehr schwache Anfärbung aufwies, als kompletter Verlust der Antigenexpression gewertet. Zeigten bis 10% der Zellen eine mäßige bis starke, 11 bis 49% eine schwache bis starke oder 50 bis 75% eine schwache Färbeintensität, so wurden diese Schnittpräparate als schwach exprimierend bewertet. Wiesen 50 bis 75% der Zellen eine starke Intensität oder 76 bis 100% der Tumorzellen eine mäßige bis starke Intensität auf, wurde dies als starke Fas-Expression gewertet.

Zusammenfassend wurde von einer Herunterregulation (*down-Regulation*) der Fas-Expression ausgegangen, wenn die Schnittpräparate mit keiner oder einer nur schwachen Expression beurteilt wurden. Bei der Bewertung einer mäßigen oder gar starken Anfärbung wurde von keiner *down-Regulation* des Fas-Antigens ausgegangen.

**Tabelle 2.3** Skala zur Beurteilung der Expression von Fas Rezeptor

<b>Positive Zellen [%]</b>	<b>Intensität</b>	<b>Bewertung</b>	
0-10	- / +	Keine Expression	} <i>Down-Regulation</i>
	++ / +++	Schwache Expression	
11-49	+ / ++ / +++	Schwache Expression	
50-75	+	Schwache Expression	
50-75	++	Mäßige Expression	
	+++	Starke Expression	
76-100	+	Mäßige Expression	
	++ / +++	Starke Expression	

- = keine Anfärbung, + = schwache Anfärbung, ++ = mäßige Anfärbung, +++ = starke Anfärbung

Die Beurteilung der Fas-Ligand Expression auf Tumorzellen des primären Ösophaguskarzinoms wurde ebenfalls hinsichtlich des prozentualen Anteils positiver Tumorzellen und der Intensität deren Anfärbung geführt.

Wiesen 50 bis 75% der Zellen eine starke oder 76 bis 100% eine mäßiggradige bis starke Färbeintensität auf, so wurden sie insgesamt als stark exprimierende Präparate bewertet (siehe Tabelle 2.4). Bei diesen Präparaten wurde einer Hochregulation (*up*-Regulation) des Fas-Ligand ausgegangen.

**Tabelle 2.4** Skala zur Beurteilung der Expression von Fas Ligand

<b>Positive Zellen [%]</b>	<b>Intensität</b>	<b>Bewertung</b>	
0-10	- / +	Keine Expression	
	++ / +++	Schwache Expression	
11-49	+	Schwache Expression	
	++ / +++	Mäßige Expression	
50-75	+ / ++	Mäßige Expression	
	+++	Starke Expression	⇒
76-100	+	Mäßige Expression	} Up-Regulation
	++ / +++	Starke Expression	

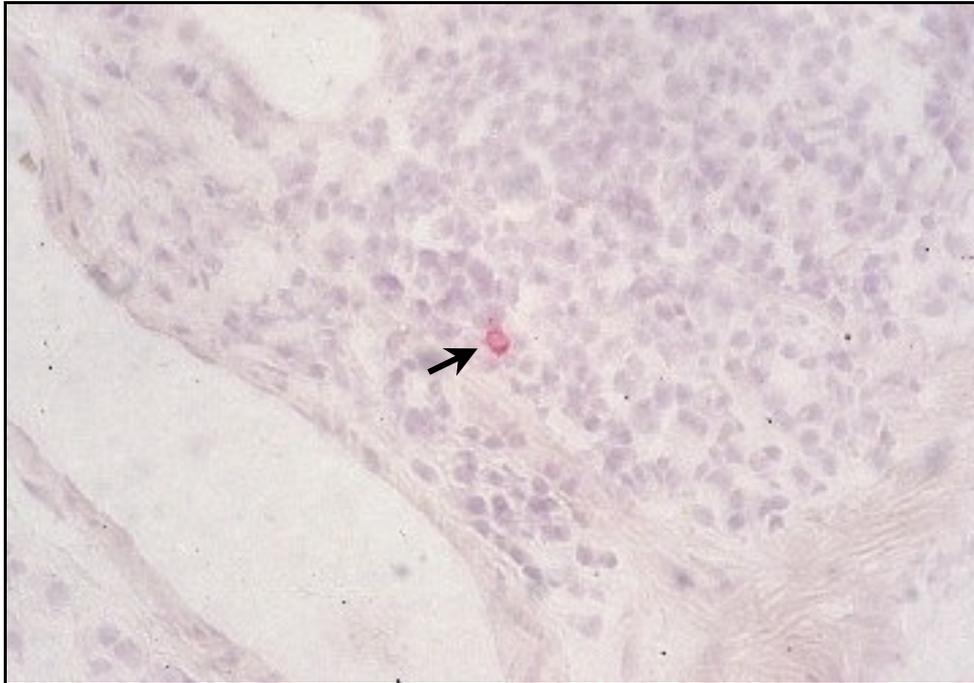
- = keine Anfärbung, + = schwache Anfärbung, ++ = mäßige Anfärbung, +++ = starke Anfärbung

#### 2.4.2 Isolierte Tumorzellen in Lymphknoten

Die immunhistochemisch gefärbten histopathologisch als tumorfrei klassifizierten Lymphknoten von 63 Patienten wurden ebenfalls doppel-blind von zwei unabhängigen Beobachtern ohne Kenntnis der Patientendaten ausgewertet.

Isolierte Tumorzellen (ITZ) wurden als einzelne Zellen oder als eine kleine Gruppe von nicht mehr als 3 Ber-EP4 positiven Zellen in einem histopathologisch als tumorfrei befundenen Lymphknoten definiert (siehe Abbildung 2.1). Als weiteres Kriterium zur Beurteilung dieser Zellen wurde deren Lokalisation im Lymphknotenrandsinus oder im lymphatischen Gewebe, die Morphologie und die Kern-Plasma-Relation der Zelle, herangezogen. Der Randsinus oder die von Lymphkappillaren gebildeten Intermediärsinus und der zentrale Marksinus, sind Orte an denen sich lymphogen gestreute einzelne Tumorzellen bevorzugt absiedeln.

**Abbildung 2.1** Isolierte Ber-EP4 positiven Tumorzelle in einem Lymphknoten



Pfeil: rot-angefärbte Ber-EP4 positive Zelle in einem histopathologisch „tumorfreen“ Lymphknoten

## 2.5 Statistische Analysen

In der univariaten Analyse wurden *Chi-Quadrat*-Tests durchgeführt und wann immer möglich mit dem *Fisher-Exact*-Test auf die Gleichheit zweier binominaler Verhältnisse hin überprüft. Für die Analyse des rezidivfreien Intervalls und der Gesamtüberlebenszeit wurden *Kaplan-Meier*-Analysen und der *Log-Rank*-Test verwendet.

Das Signifikanzniveau wurde dabei auf  $p < 0,05$  festgelegt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der Antigenexpression

#### 3.1.1 Fas Rezeptor

Von 70 Patienten mit Ösophaguskarzinom zeigte sich bei 4 Patienten (5,7%) eine starke Expression des Fas Rezeptors, bei 16 (22,9%) eine mäßige, bei 21 Patienten (30,0%) eine schwache und bei 29 (41,4%) Tumoren überhaupt keine Fas Expression (siehe Tabelle 3.1). Gemäß der in Tabelle 2.3 aufgeführten Skala zur Beurteilung der Fas Rezeptor Expression ergab sich somit für 50 Tumoren (71,4%) eine *down*-Regulation des Fas Rezeptors. Von diesen 50 Ösophaguskarzinomen konnten 29 (58,0%) histologisch dem Plattenepithel- und 21 (42%) dem Adenokarzinomtyp zugeordnet werden. Damit wiesen 74,4% der Plattenepithelkarzinome und 67,7% der Adenokarzinome eine Fas *down*-Regulation auf.

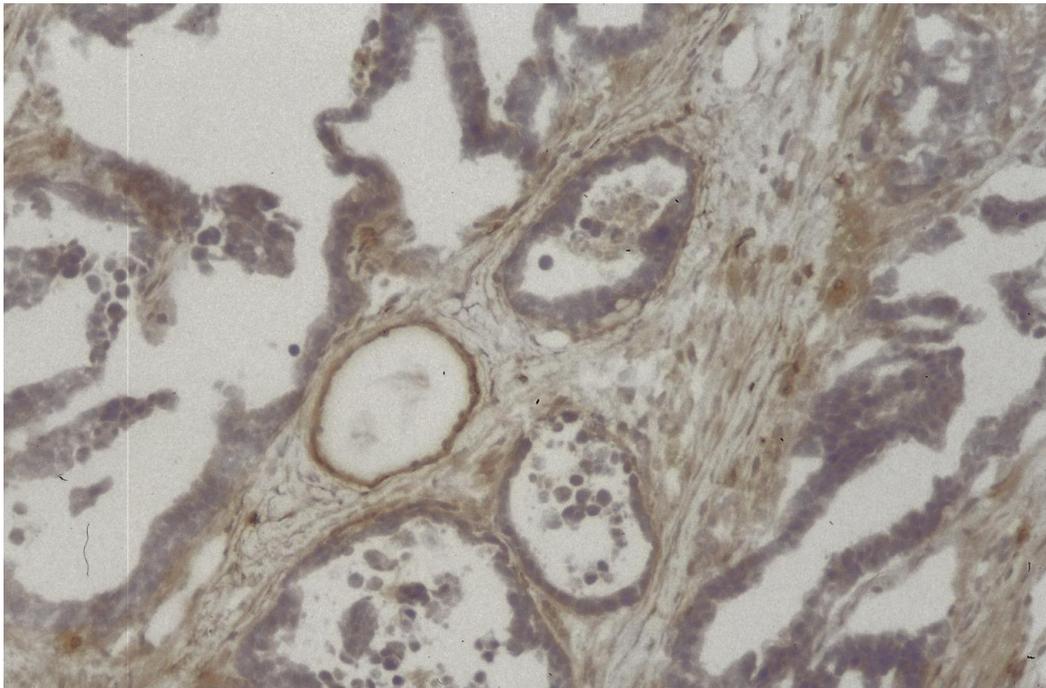
Die Tumoren von 20 Patienten (28,6%) wurden mit eine mäßigen bis starken Expression beurteilt und zeigten damit keine *down*-Regulation ihres Fas Rezeptors.

**Tabelle 3.1** *Fas Expression*

<b>Fas Expression</b>	<b>SCCE<sup>1</sup> Anzahl (%)</b> <i>n=39</i>	<b>ACE<sup>2</sup> Anzahl (%)</b> <i>n=31</i>	<b>Gesamt (%)</b> <i>n=70</i>
Keine	16 (41,0)	13 (41,9)	29 (41,4)
Schwache	13 (33,3)	8 (25,8)	21 (30,0)
Mäßige	8 (20,5)	8 (25,8)	16 (22,9)
Starke	2 (5,1)	2 (6,5)	4 (5,7)
<i>down</i> -Regulation	29 (74,4)	21 (67,7)	50 (71,4)

<sup>1</sup> SCCE = squamous cell carcinoma of the esophagus = Ösophagus-Plattenepithelkarzinome

<sup>2</sup> ACE = adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia = Ösophagus-Adenokarzinome

**Abbildung 3.1** Down-regulierte Fas-Expression auf Adenokarzinomzellen

### 3.1.2 Fas Ligand

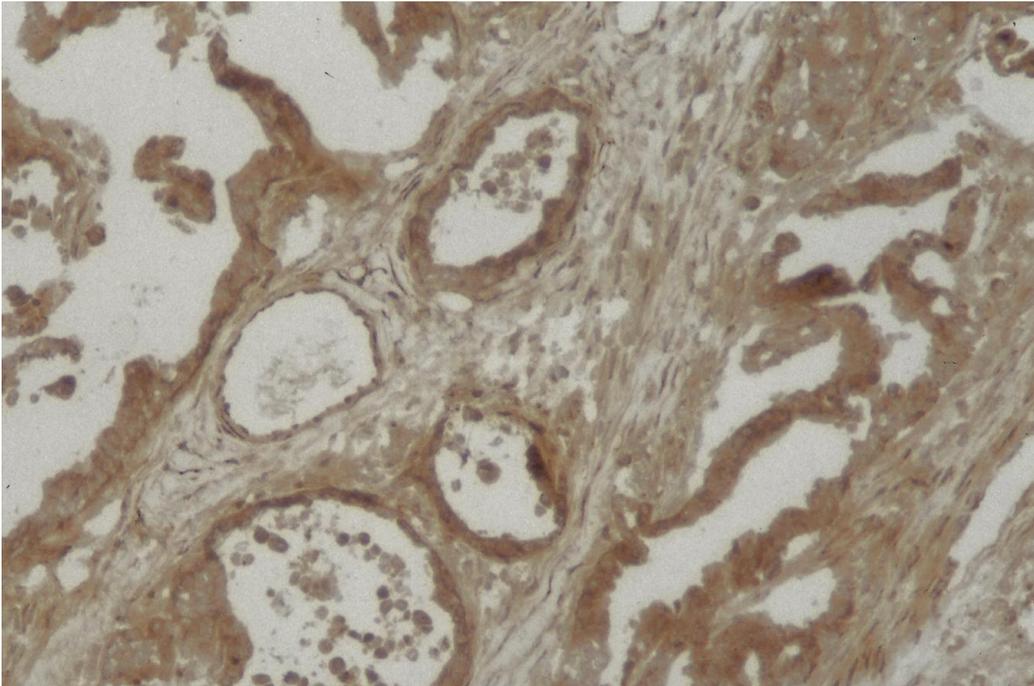
Eine starke Expression von Fas Ligand auf Tumorzellen der 70 Patienten mit primärem Ösophaguskarzinom ist das Kriterium für eine *up*-Regulation des Fas Ligand Antigens (siehe Tabelle 2.4). Dies traf für 74,4% der Patienten mit Plattenepithelkarzinom und 80,6% der Patienten mit Adenokarzinom zu (siehe Tabelle 3.2). Betrachtet man die Gesamtheit aller Ösophaguskarzinome, so kam es bei 54 von 70 Patienten (77,1%) zu einer *up*-Regulation des Fas Ligand Antigens. Insgesamt 10 der 39 Plattenepithelkarzinome (25,7%) und 6 der 31 Adenokarzinome (19,4%) zeigten nur eine mäßige bis gar keine Expression des Fas Liganden.

**Tabelle 3.2** Fas Ligand Expression

<b>FasL Expression</b>	<b>SCCE<sup>1</sup> (%)</b> <i>n</i> =39	<b>ACE<sup>2</sup> (%)</b> <i>n</i> =31	<b>Gesamt (%)</b> <i>n</i> =70
Keine	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Schwach	1 (2,6)	0 (0,0)	1 (1,4)
Mäßig	9 (23,1)	6 (19,4)	15 (21,4)
Stark (=up-Regulation)	29 (74,4)	25 (80,6)	54 (77,1)

<sup>1</sup> SCCE = squamous cell carcinoma of the esophagus = Ösophagus-Plattenepithelkarzinome

<sup>2</sup> ACE = adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia = Ösophagus-Adenokarzinome

**Abbildung 3.2** Expression von Fas Ligand auf Adenokarzinomzellen

### 3.1.3 Koexpression von Fas Rezeptor und Fas Ligand

Die Koexpression beider Antigene war auf 5 Primärtumoren (7,1%) nachweisbar (siehe Tabelle 3.3). Bei 11 Patienten (15,7%) zeigte sich eine Fas Rezeptor *down*-Regulation bei fehlender Fas Ligand Expression (Fas neg./FasL neg.). 21,4% der Ösophaguskarzinome (n=15) wiesen eine Fas Rezeptor-Expression bei gleichzeitigem Fehlen einer Fas Ligand-Expression auf. Die Mehrzahl der Tumoren (39 von 70, das entspricht 55,7%) zeigten eine Fas Rezeptor *down*-Regulation bei gleichzeitig vorhandener Expression des Fas Liganden (Fas neg./FasL pos.).

Bei den Plattenepithelkarzinomen (n=39) konnte bei 4 Tumoren (10,3%) eine Koexpression Fas Rezeptor und Fas Ligand nachgewiesen werden (Fas pos./FasL pos.). Dieses Expressionsmuster zeigte bei den Adenokarzinomen nur ein Tumor von 31 (3,2%). Eine positive Fas Rezeptor-Expression bei gleichzeitig negativer Fas Ligand-Expression (Fas pos./FasL neg.) zeigte sich bei 6 Plattenepithel- (15,4%) und 9 Adenokarzinomen (29,0%). Weder eine Fas Rezeptor-Expression noch eine Fas Ligand-Expression lag bei den Plattenepithelkarzinomen in 6 von 39 Fällen (15,4%) und den Adenokarzinomen in 5 von 31 Fällen (16,1%) vor (Fas neg./FasL neg.). Am Häufigsten trat sowohl bei den Adenokarzinomen (51,6%), als auch den Plattenepithelkarzinomen

(59,0%) das Expressionsmuster einer *down*-Regulation des Fas Rezeptors bei gleichzeitiger Expression des Fas Liganden auf (Fas neg./FasL pos.).

**Tabelle 3.3** Koexpression von Fas Rezeptor und Fas Ligand

<b>Koexpression</b>	<b>SCCE<sup>1</sup> Anzahl (%)</b> <i>n</i> =39	<b>ACE<sup>2</sup> Anzahl (%)</b> <i>n</i> =31	<b>Gesamt (%)</b> <i>n</i> =70
Fas pos./FasL pos.	4 (10,3)	1 (3,2)	5 (7,1)
Fas pos./FasL neg.	6 (15,4)	9 (29,0)	15 (21,4)
Fas neg./FasL neg.	6 (15,4)	5 (16,1)	11 (15,7)
Fas neg./FasL pos.	23 (59,0)	16 (51,6)	39 (55,7)

<sup>1</sup> SCCE = squamous cell carcinoma of the esophagus = Ösophagus-Plattenepithelkarzinome

<sup>2</sup> ACE = adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia = Ösophagus-Adenokarzinome

### 3.1.4 Isolierte Tumorzellen in Lymphknoten

Von insgesamt 483 intraoperativ entnommenen und vom Operateur als „unauffällig“ eingestuft Lymphknoten wurden 195 Lymphknoten in der routinemäßigen histopathologischen Untersuchung als tumorfrei klassifiziert. Diese Lymphknoten wurden immunhistochemisch auf das Vorhandensein von frühdisseminierten Tumoreinzelzellen hin untersucht.

Die 195 konventionell histopathologisch als tumorfrei klassifizierten Lymphknoten verteilten sich insgesamt auf 63 Patienten. Bei 47 dieser 63 Patienten (74,6%) konnten in einem oder mehreren Lymphknoten isolierte Tumorzellabsiedlungen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.4). 26 dieser 47 Patienten (55,3%) hatten ein Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und 21 (44,7%) ein Adenokarzinom. Sechzehn der insgesamt 63 Patienten (25,4%) zeigten keine Hinweise auf Tumoreinzelzellabsiedlungen in ihren Lymphknoten.

**Tabelle 3.4** Inzidenz von Isolierten Tumorzellen (ITZ) in Lymphknoten

<b>ITZ<sup>1</sup> in Lymphknoten</b>	<b>SCCE<sup>2</sup> (%)</b> <i>n</i> =33	<b>ACE<sup>3</sup> (%)</b> <i>n</i> =30	<b>Gesamt (%)</b> <i>n</i> =63
Vorhanden	26 (78,8)	21 (70,0)	47 (74,6)
Nicht vorhanden	7 (21,2)	9 (30,0)	16 (25,4)

<sup>1</sup> ITZ = Isolierte Tumorzellen

<sup>2</sup> SCCE = squamous cell carcinoma of the esophagus = Ösophagus-Plattenepithelkarzinome

<sup>3</sup> ACE = adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia = Ösophagus-Adenokarzinome

### 3.2 Zusammenhang zwischen Antigenexpression und histopathologischen Parametern

#### 3.2.1 Fas Rezeptor

Bei 50 der 70 Patienten mit primärem Ösophaguskarzinom (71,4%) kam es zu einem Verlust der bei normaler Ösophagus-Schleimhaut vorhandenen Fas Rezeptor-Expression (Kriterien siehe Tabelle 2.3). Davon konnten 29 (58,0%) dem Plattenepithelkarzinomtyp und 21 (42,0%) dem Adenokarzinomtyp zugeordnet werden (siehe auch Tabelle 3.5). Der Unterschied war nicht signifikant.

**Tabelle 3.5** Fas Rezeptor-Expression und klinischpathologische Parameter

	Anzahl der Pat.	Fas negativ (%)	Fas positiv (%)	p-Wert
<b>Zelltyp</b>				0,365
SCCE <sup>1</sup>	n=39	29 (74,4)	10 (25,6)	
ACE <sup>2</sup>	n=31	21 (67,7)	10 (32,3)	
Gesamt	n=70	50 (71,4)	20 (28,6)	
<b>Primärtumorstadium</b>				0,663
pT <sub>1</sub>	n=6	5 (83,3)	1 (16,7)	
pT <sub>2</sub>	n=25	19 (76,0)	6 (24,0)	
pT <sub>3</sub>	n=39	26 (66,7)	13 (33,3)	
<b>Lymphknotenstadium</b>				0,197
pN <sub>0</sub>	n=26	16 (61,5)	10 (38,5)	
pN <sub>1</sub>	n=44	34 (77,3)	10 (22,7)	
<b>Lymphknoten-Metastasen</b>				0,468
M(lymph) <sub>0</sub>	n=64	45 (70,3)	19 (29,7)	
M(lymph) <sub>1</sub>	n=6	5 (83,3)	1 (16,7)	
<b>UICC Stadium</b>				0,555
I	n=5	4 (80,0)	1 (20,0)	
IIa	n=21	12 (57,1)	9 (42,9)	
IIb	n=14	12 (85,7)	2 (14,3)	
III	n=24	17 (70,8)	7 (29,2)	
IVa	n=6	5 (83,3)	1 (16,7)	
<b>Differenzierungsgrad</b>				0,353
G <sub>2</sub>	n=41	31 (75,6)	10 (24,4)	
G <sub>3</sub>	n=29	19 (65,5)	10 (34,5)	

<sup>1</sup> SCCE = squamous cell carcinoma of the esophagus = Ösophagus-Plattenepithelkarzinome

<sup>2</sup> ACE = adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia = Ösophagus-Adenokarzinome

Von den 50 als Fas Rezeptor *down*-reguliert klassifizierten Tumoren konnten 24 (48,0%) postoperativ dem Primärtumorstadium pT1-2 zugeordnet werden. Bei

den Fas Rezeptor positiven Tumoren hatten lediglich 35,0% das Primärtumorstadium pT1 und pT2. Eine Signifikanz bei der Korrelation der beiden Faktoren ergab sich nicht.

Ebenso konnten bei der Korrelation zwischen der Fas Rezeptor *down*-Regulation und dem Lymphknotenstadium (pN), dem UICC-Stadium, sowie dem Tumordifferenzierungsgrad keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

### 3.2.2 Fas Ligand

Insgesamt 77,1% der Tumoren der 70 Patienten mit primärem Ösophaguskarzinom zeigten eine positive Fas Ligand-Expression (siehe Tabelle 3.6). Lediglich 25,6% der Plattenepithelkarzinome und 19,4% der Adenokarzinome wiesen keine Fas Ligand-Expression auf. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Fas Ligand-Expression und dem Tumortyp konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei der Korrelation des Primärtumorstadiums (pT) mit dem Fas Ligand-Expressionsniveau zeigte sich, dass mit zunehmender Tumordinfiltrationstiefe eine Zunahme der Fas Ligand-Expression nachweisbar war. So wiesen nur 33,3% der als pT1 gewerteten Tumoren eine positive Fas Ligand-Expression auf, im Vergleich 80,0% der pT2- und 84,2% der pT3-Tumoren. Dieser Unterschied war signifikant ( $p=0,019$ ). Betrachtete man nur die Plattenepithelkarzinome, so zeigte sich, dass hier dieser Zusammenhang mit 20% FasL positiver pT1-Tumoren (1/5), 77,8% der pT2 Tumoren (7/9) und 87,5% der pT3 Tumoren (21/24) noch deutlicher war ( $p=0,005$ ).

Bei sieben der 26 Patienten (26,9%) ohne regionale Lymphknotenmetastasen (pN<sub>0</sub>) konnte keine Fas Ligand-Expression ermittelt werden im Vergleich zu 20,5% (9/44) der Patienten mit Metastasen in den regionären Lymphknoten (pN<sub>1</sub>). Hieraus ergab sich kein signifikanter Unterschied. Ebenso konnten bei der Korrelation zwischen der Fas Ligand-Expression und dem Tumordifferenzierungsgrad keine Unterschiede ermittelt werden ( $p=0,560$ ).

Die Stadiengruppierung nach UICC hingegen zeigte jedoch einen Zusammenhang mit der Fas Ligand Expression. Je fortgeschrittener das Tumorleiden war, desto höher war der Anteil an Fas Ligand positiven Tumoren.

So wiesen 20,0% (n=1) der UICC-Stadium I Tumoren im Vergleich zu 83,3% der Stadium IVa Tumoren (n=5) eine positive Fas Ligand Expression auf (p=0,021). Dieser Zusammenhang zeigte sich bei den isoliert betrachteten Plattenepithelkarzinomen analog zu den Primärtumorstadien ebenfalls noch deutlicher (p=0,004). Hier wies keiner der Tumoren (n=4) im UICC-Stadium I eine Fas-Ligand-Expression auf im Vergleich zu 75% (n=9) der Tumoren im Stadium III und 100% (n=2) im Stadium IVa. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass eine statistisch sinnvolle Analyse hinsichtlich der UICC-Stadiengruppierung und der Fas Ligand-Expression waren aufgrund der geringen Fallzahlen sowie der inhomogenen Verteilung auf die einzelnen Untergruppierungen nicht möglich ist. Wurden die UICC-Stadien I, IIa und IIb zusammengefasst und den UICC-Stadien III und IVa gegenübergestellt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

**Tabelle 3.6** *Fas Ligand-Expression und histopathologische Parameter*

	<b>Anzahl der Pat.</b>	<b>FasL negativ (%)</b>	<b>FasL positiv (%)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Zelltyp</b>				0,371
SCCE <sup>1</sup>	n=39	10 (25,6)	29 (74,4)	
ACE <sup>2</sup>	n=31	6 (19,4)	25 (80,6)	
Gesamt	n=70	16 (22,9)	54 (77,1)	
<b>Primärtumorstadium</b>				0,019
pT <sub>1</sub>	n=6	4 (66,7)	2 (33,3)	
pT <sub>2</sub>	n=25	5 (20,0)	20 (80,0)	
pT <sub>3</sub>	n=39	7 (17,9)	32 (82,1)	
<b>Lymphknotenstadium</b>				0,497
pN <sub>0</sub>	n=26	7 (26,9)	19 (73,1)	
pN <sub>1</sub>	n=44	9 (20,5)	35 (79,5)	
<b>Lymphknoten-Metastasen</b>				0,611
M(lymph) <sub>0</sub>	n=64	15 (23,4)	49 (76,6)	
M(lymph) <sub>1</sub>	n=6	1 (16,7)	5 (83,3)	
<b>UICC Stadium</b>				0,021
I	n=5	4 (80,0)	1 (20,0)	
IIa	n=21	2 (9,5)	19 (90,5)	
IIb	n=14	4 (28,6)	10 (71,4)	
III	n=24	5 (20,8)	19 (79,2)	
IVa	n=6	1 (16,7)	5 (83,3)	
<b>Differenzierungsgrad</b>				0,560
G <sub>2</sub>	n=41	9 (22,0)	32 (78,0)	
G <sub>3</sub>	n=29	7 (24,1)	22 (75,9)	

<sup>1</sup> SCCE = squamous cell carcinoma of the esophagus = Ösophagus-Plattenepithelkarzinome

<sup>2</sup> ACE = adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia = Ösophagus-Adenokarzinome

### **3.3 Koexpression von Fas Rezeptor und Fas Ligand**

Betrachtet man die Koexpressionsmuster der beiden Apoptose-Moleküle so zeigt sich, dass mit 39 von 70 die Mehrzahl der Tumoren (55,7%) eine positive Fas Ligand-Expression bei gleichzeitig *down*-reguliertem Fas Rezeptor (Fas neg./FasL pos.) aufweisen. Bei 15 der Tumoren (21,4%) konnte eine positive Fas Rezeptorexpression und eine Herunterregulierung der Fas Ligandexpression (Fas pos./FasL neg.) nachgewiesen werden. Keine der beiden Antigene wurden bei 11 (15,7%) der Tumoren dargestellt (Fas neg./FasL neg.) und nur fünf der insgesamt 70 untersuchten Tumoren (7,1%) wiesen sowohl eine Fas Ligand-, als auch eine Fas-Rezeptorexpression (Fas pos./FasL pos.) auf. Die Korrelation der Koexpressionsmuster mit Zelltyp, Primärtumorstadium (pT-Status), den Lymphknotenstadium (pN-Status), den Lymphknotenmetastasen (pM(lymph)-Status), UICC-Stadium und histologischem Differenzierungsgrad (G) blieb ohne statistische Signifikanz.

### **3.4 Korrelation von ITZ in LK mit histopathologischen Parametern**

Bei der Korrelation des Primärtumorstadiums mit dem immunhistochemischen Lymphknotenstatus zeigte sich, dass 60,0% der pT1 Tumoren (n=3), 69,6% der pT2 Tumoren (n=16) und 82,9% der pT3 Tumoren (n=29) isolierte Tumorzellen (ITZ) in ihren „tumorfreen“ Lymphknoten aufwiesen (siehe Tabelle 3.7). Trotz dieser Tendenz ergab sich aus der statistischen Analyse mit einem P-Wert von 0,375 keine Signifikanz. Auch bei der statistischen Korrelation des UICC-Stadiums mit der Inzidenz von ITZ in Lymphknoten der Patienten konnte kein signifikanter Zusammenhang eruiert werden.

Histopathologisch gesichert zeigten sich bei 40 Patienten (63,5%) regionale Lymphknotenmetastasen (pN<sub>1</sub>, siehe auch Tabelle 3.7). In den histopathologisch als tumorfrei klassifizierten Lymphknoten dieser Patienten konnten in 85,0% der Fälle (34 Patienten) isolierte Tumorzellen (ITZ) nachgewiesen werden. Analog dazu konnten mit 65,2% der Fälle (15 Patienten) bei der Mehrheit der 23 Patienten ohne regionale Lymphknotenmetastasen (N<sub>0</sub>) ITZ immunhistochemisch zur Darstellung gebracht werden. Auch dieser Unterschied erwies sich in der statistischen Analyse als nicht signifikant.

**Tabelle 3.7** ITZ<sup>1</sup> in Lymphknoten und histopathologische Parameter

	<b>Anzahl der Pat.</b>	<b>ITZ negativ (%)</b>	<b>ITZ positiv (%)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Zelltyp</b>				0,305
SCCE <sup>2</sup>	n=33	7 (21,2)	26 (78,8)	
ACE <sup>3</sup>	n=30	9 (30,0)	21 (70,0)	
Gesamt	n=63	16 (25,4)	47 (74,6)	
<b>Primärtumorstadium</b>				0,375
pT <sub>1</sub>	n=5	2 (40,0)	3 (60,0)	
pT <sub>2</sub>	n=23	7 (30,4)	16 (69,6)	
pT <sub>3</sub>	n=35	6 (17,1)	29 (82,9)	
<b>Lymphknotenstadium</b>				0,062
pN <sub>0</sub>	n=33	8 (34,8)	15 (65,2)	
pN <sub>1</sub>	n=40	6 (15,0)	34 (85)	
<b>Lymphknoten-Metastasen</b>				0,549
M(lymph) <sub>0</sub>	n=57	14 (24,6)	43 (75,4)	
M(lymph) <sub>1</sub>	n=6	1 (16,7)	5 (83,3)	
<b>UICC Stadium</b>				0,400
I	n=4	2 (50,0)	2 (50,0)	
IIa	n=19	6 (31,6)	13 (68,4)	
IIb	n=12	2 (16,7)	10 (83,3)	
III	n=22	3 (13,6)	19 (86,4)	
IVa	n=6	1 (16,7)	5 (83,3)	
<b>Differenzierungsgrad</b>				0,531
G <sub>2</sub>	n=35	8 (22,9)	27 (77,1)	
G <sub>3</sub>	n=28	7 (25,0)	21 (75,0)	

<sup>1</sup> ITZ Isolierte Tumorzellen

<sup>2</sup> SCCE = squamous cell carcinoma of the esophagus = Ösophagus-Plattenepithelkarzinome

<sup>3</sup> ACE = adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia = Ösophagus-Adenokarzinome

### 3.5 Korrelation zwischen immunhistochemischem Lymphknotenstatus und der Fas/FasL-Expression der Primärtumoren

Bei der Korrelation der Expressionsmuster der Apoptosemoleküle Fas und Fas Ligand mit dem Nachweis isolierter Tumorzellen (ITZ) in Lymphknoten zeigte folgende signifikante Zusammenhänge: So fanden sich zum einen bei 38 von 44 Patienten (86,4%) mit Fas *down*-regulierten Tumoren häufiger ITZ in den Lymphknoten als bei den 9 von 19 (47,4%) Fas Rezeptor positiven Tumoren ( $p=0,002$ ). Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch bei der alleinigen Betrachtung der Plattenepithelkarzinome ( $p=0,009$ ). Hier konnten bei 91,7% ( $n=22$ ) der 24 Plattenepithelkarzinome mit herunterregulierter Expression des Fas Rezeptors ITZ in Lymphknoten nachgewiesen werden, im Vergleich zu 44,4% ( $n=4$ ) der 9 Tumoren mit positiver Fas Expression. Des weiteren fiel

zusätzlich ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von ITZ in Lymphknoten und der Fas Ligand-Expression auf, der sich genau reziprok zu der Fas Rezeptor Expression verhielt ( $p=0,042$ ). Patienten mit Fas Ligand positiven Plattenepithelkarzinomen hatten mit 22 von 25 Tumoren (88,0%) entsprechend signifikant häufiger ITZ in ihren Lymphknoten, als Patienten ohne Fas Ligand-Expression mit 4 von 8 Tumoren (50,0%). Bei der isolierten Analyse der Adenokarzinome ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Tumoreinzellen in Lymphknoten und den Expressionsmustern von Fas und Fas Ligand.

Bei der Korrelation der Koexpressionsmuster mit dem immunhistochemischen Lymphknotenstatus zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede. So wiesen 31 von 47 Patienten mit ITZ in ihren Lymphknoten die Antigenkombination Fas Rezeptor *down*-Regulation bei gleichzeitiger Fas Ligand *up*-Regulation (Fas neg./FasL pos.) auf (66,0%) im Vergleich zu einem von 47 Patienten mit gleichzeitig positiver Fas Rezeptor- und Fas Ligand-Expression (Fas pos./FasL pos.), 8 von 47 mit Fas positiven und Fas Ligand negativen Tumoren (Fas pos./FasL neg.) und 7 von 47 Patienten mit sowohl Fas Rezeptor, als auch Fas Ligand negativen Tumoren (Fas neg./FasL neg.,  $p=0,005$ ). Analog hierzu hatten Patienten mit Fas Rezeptor und Ligand positiven (Fas pos./FasL pos.) und Fas Rezeptor positiven und Fas Ligand negativen Tumoren (Fas pos./FasL neg.) signifikant seltener ( $p= 0,047$  bzw.  $p=0,037$ ) ITZ in Lymphknoten (siehe Tabelle 3.8).

**Tabelle 3.8** Koexpression der Apoptosemoleküle im Vergleich zu ITZ<sup>1</sup> in LK

<b>Koexpression<sup>2</sup></b>	<b>n</b>	<b>ITZ<sup>1</sup> positiv (%)</b> <i>n=47</i>	<b>ITZ<sup>1</sup> negativ (%)</b> <i>n=16</i>	<b>P-Wert</b>
Fas pos./FasL pos.	4	1 (25,0)	3 (75,0)	0,047
Fas pos./FasL neg.	15	8 (53,3)	7 (46,7)	0,037
Fas neg./FasL neg.	9	7 (77,8)	2 (22,2)	0,589
Fas neg./FasL pos.	35	31 (88,6)	4 (11,4)	0,005

<sup>1</sup> neg. = negativ, pos. = positiv

<sup>2</sup> ITZ = Isolierte Tumorzellen

### 3.6 Ergebnisse der Nachbeobachtung

Für die postoperative Nachuntersuchung standen die Daten von 55 Patienten, die sich einer operativen Therapie ihres Ösophaguskarzinoms unterzogen, zur Verfügung. Es handelte sich bei den Patienten in 76,4% der Fälle um Männer (n=42) und in 23,6% der Fälle um Frauen (n=13). Der Altersmedian dieser Patienten betrug 59, wobei der jüngste Patient 36 und der älteste 80 Jahre alt war. Alle Resektionsränder der Operationspräparate dieser Patienten waren tumorfrei (R0). Keiner dieser Patienten verstarb während oder innerhalb eines Zeitraumes von 30 Tagen nach der Operation an den Folgen seines Eingriffes. Des weiteren wurden alle Patienten mit Fernmetastasen (Stadium IVb nach UICC) außerhalb der lokoregionären Lymphknoten aus der Studie ausgeschlossen. Der postoperative Nachbeobachtungszeitraum betrug insgesamt einen bis maximal 75 Monate (Median 18 Monate, siehe auch Tabelle 3.9). Patienten mit Plattenepithelkarzinomen wurden im Median 13 Monate und Patienten mit Adenokarzinomen 24 Monate nachbeobachtet. Dabei wurde das Operationsdatum als Beginn und der letzte Besuch des Patienten bei seinem Hausarzt, respektive der Todestag, als Ende des Nachbeobachtungszeitraumes festgelegt.

**Tabelle 3.9** *Patienten und Nachbeobachtungszeit*

<b>Patienten</b>	<b>Gesamtanzahl</b>	<b>Nachbeobachtung</b>	<b>Nachbeobachtungszeit in Monaten (Median)</b>
<b>SCCE<sup>1</sup></b>	39	31	1-75 (13)
<b>ACE<sup>2</sup></b>	31	24	3-67 (24)
<b>gesamt</b>	70	55	1-75 (18)

<sup>1</sup> SCCE = squamous cell carcinoma of the esophagus = Ösophagus-Plattenepithelkarzinome

<sup>2</sup> ACE = adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia = Ösophagus-Adenokarzinome

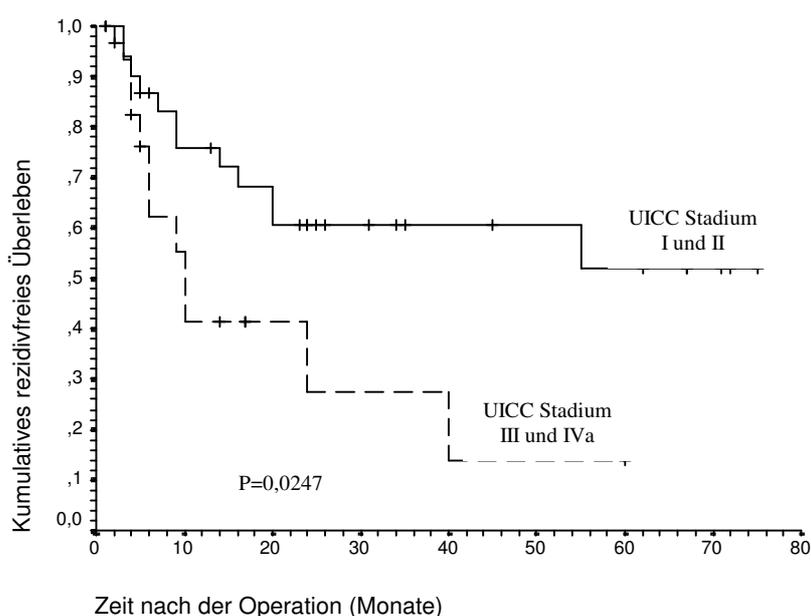
Bei der Betrachtung des Primärtumorstadiums der Tumoren von Patienten, die für die Nachuntersuchung zur Verfügung standen, zeigt sich, dass mit 17 Tumoren die Mehrzahl (30,9%) das Stadium IIa aufwies. Weitere 14 von 55 Tumoren (25,5%) befanden sich im Stadium IIb, der Anteil der Tumoren im Stadium III lag bei 23,6% und 6 der 55 (10,9%) Tumoren hatten das Tumorzellstadium IVa nach UICC. Bei 9,1% der Tumoren (5 von 55) zeigte sich ein Stadium I bei der postoperativen histopathologischen Beurteilung.

Während des Nachuntersuchungszeitraumes verstarben 25 Patienten (45,5%) an den Folgen ihres Tumorleidens. Die Mehrzahl dieser Patienten (60,0%) hatten ein Adenokarzinom. Vierundzwanzig der 55 (56,4%) Patienten erlitten im medianen Beobachtungszeitraum ein Rezidiv. Mehrheitlich handelte es sich hierbei mit 16 der 55 Patienten (66,7%) um ein Lokalrezidiv. Des weiteren kam es bei 18 Patienten (34,5%) zum Auftreten von Fernmetastasen außerhalb der lokoregionären Lymphknoten.

### 3.7 Korrelation der Nachbeobachtungsdaten mit etablierten Prognoseparametern

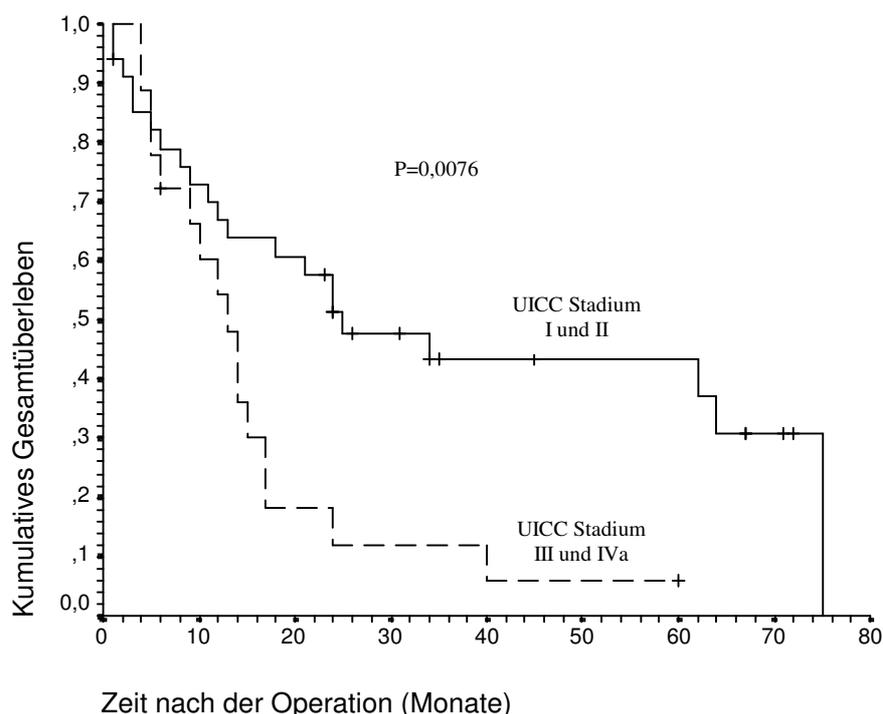
Zur Berechnung des rezidivfreien Überlebens und der postoperativen Gesamtüberlebenszeit wurden Patienten der UICC-Tumorstadien I und II, sowie die Stadien III und IVa zusammengefasst. Hierbei ergab sich, dass Patienten mit Tumoren, die sich im Stadium I oder II befanden, ein medianes rezidivfreies Intervall von 48 Monaten hatten im Vergleich zu 20 Monaten bei Patienten mit Tumoren im Stadium III bis IV ( $p=0,0247$ , siehe Abbildung 3.3). Bei den Plattenepithelkarzinomen wurde dieser Zusammenhang noch deutlicher ( $p=0,0147$ ). Hier hatten Patienten mit Tumoren im UICC-Stadium I und II im Mittel nach 60 Monaten ein Rezidiv gegenüber 9 Monaten bei Patienten mit Tumoren im Stadium III und IVa.

**Abbildung 3.3** Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom UICC Stadium

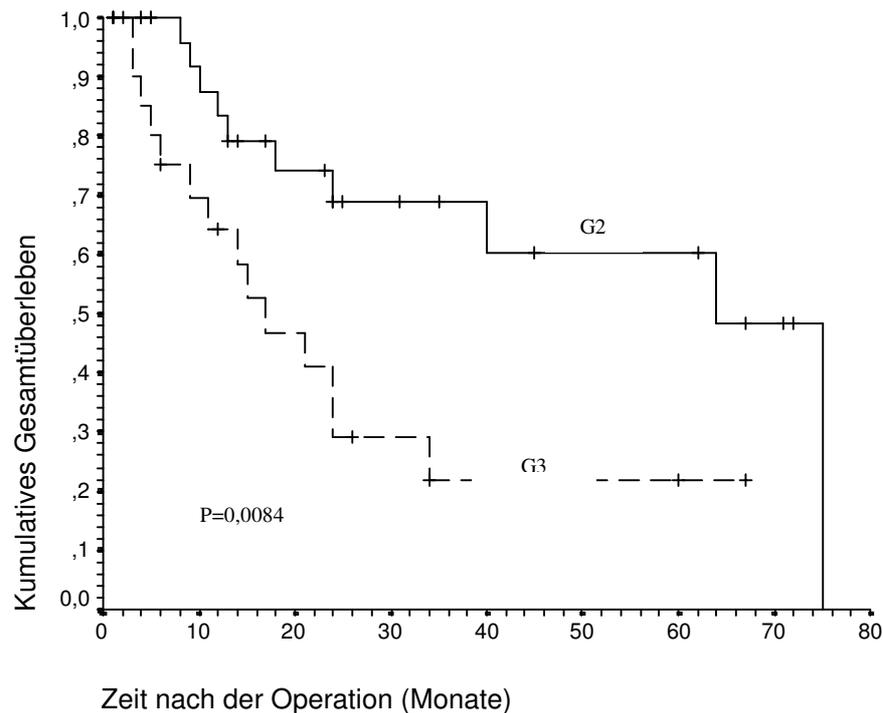


Ebenso zeigte die Korrelation des postoperativen Gesamtüberlebens mit dem UICC-Stadium einen signifikanten Zusammenhang (siehe Abbildung 3.4). Insgesamt 45,5% der Patienten (n=25) verstarben in dem medianen Beobachtungszeitraum von 18 Monaten. Bis zum tumorbedingten Tod vergingen bei Patienten mit Tumoren im Stadium I bis II im Median 64 Monate gegenüber 15 Monate bei Stadium III bis IVa-Tumoren ( $p=0,0076$ ).

**Abbildung 3.4** Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom UICC Stadium



Des weiteren zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad und sowohl dem Rezidivfreien Überleben als auch dem postoperativen Gesamtüberleben (siehe Abbildung 3.5). Patienten, deren Karzinome mäßiggradig differenziert waren, überlebten im Median 64 Monate im Vergleich zu 17 Monaten bei Patienten mit schlecht differenzierten Tumoren ( $p=0,0084$ ).

**Abbildung 3.5** Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad

Rezidive traten bei schlecht differenzierten Tumoren bereits in einer medianen Nachbeobachtungszeit von 10 Monaten auf, Patienten mit mäßiggradig differenzierten Tumoren wiesen dagegen ein medianes rezidivfreies Überleben von 55 Monaten auf ( $p=0,0199$ ).

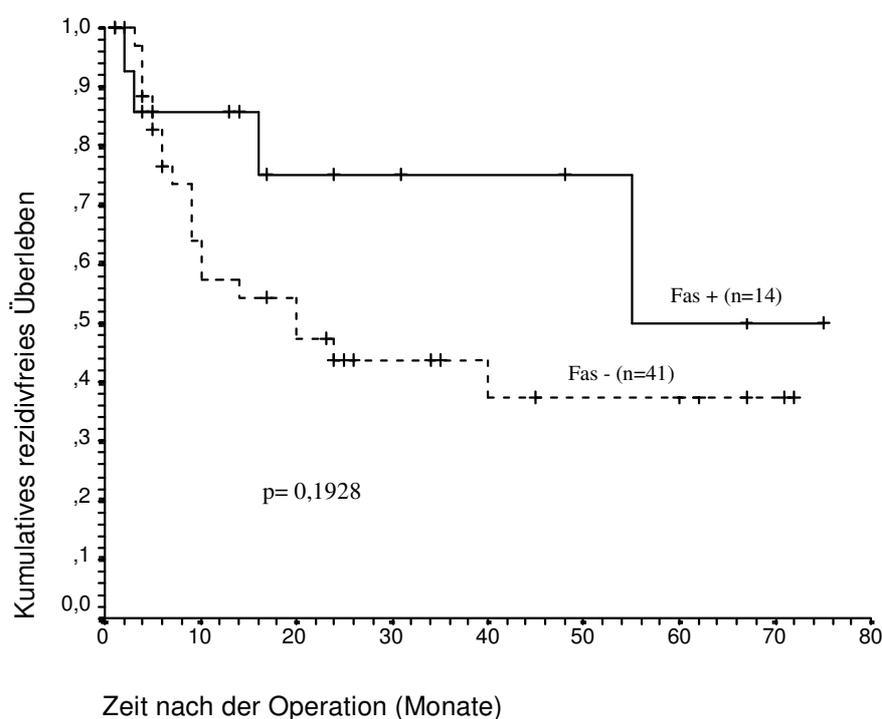
### 3.8 Prognostischer Einfluss von Fas, FasL und ITZ in Lymphknoten

Weder der Nachweis von isolierten Tumorzellen (ITZ) in Lymphknoten, noch das Expressionsniveau von Fas Rezeptor (Fas) und Fas Ligand (FasL) ergaben einen prognostischen Zusammenhang in Bezug auf die Rezidivrate und das Gesamtüberleben dieses Patientenkollektivs (Tabelle 3.10). So entwickelten 20 Patienten mit Fas Rezeptor negativen Tumoren bereits innerhalb von 20 Monaten im Median ein Tumorrezidiv, im Vergleich zu 55 Monaten medianen rezidivfreien Überlebens bei 4 Patienten mit Fas Rezeptor positiven Tumoren. Trotz dieser Auffälligkeit ergab sich in der Kaplan-Meier Überlebensanalyse mit einem P-Wert von 0,1928 keine statistische Signifikanz (siehe Abbildung 3.6). Bei Betrachtung des Gesamtüberlebens ergibt sich eine ähnliche Tendenz mit 64 Monaten Gesamtüberleben bei Fas Rezeptor positiven Tumoren, während

Patienten mit Fas Rezeptor negativen Tumoren im Median lediglich 24 Monate überlebten ( $p=0,4247$ ).

Eine ähnliche Tendenz ließ sich bei der Fas Ligand-Expression eruieren. So zeigte sich, dass Patienten deren Tumoren eine Fas Ligand *up*-Regulation aufwiesen im Mittel nach 37 Monaten ein Tumorrezidiv aufwiesen im Vergleich zu 49 Monaten bei den 4 Patienten ohne Fas Ligand-Expression. Auch hier ergab sich keine statistische Signifikanz ( $p=0,3610$ ).

**Abbildung 3.6** Rezidivfreies Überleben für Fas (Kaplan-Meier Analyse)



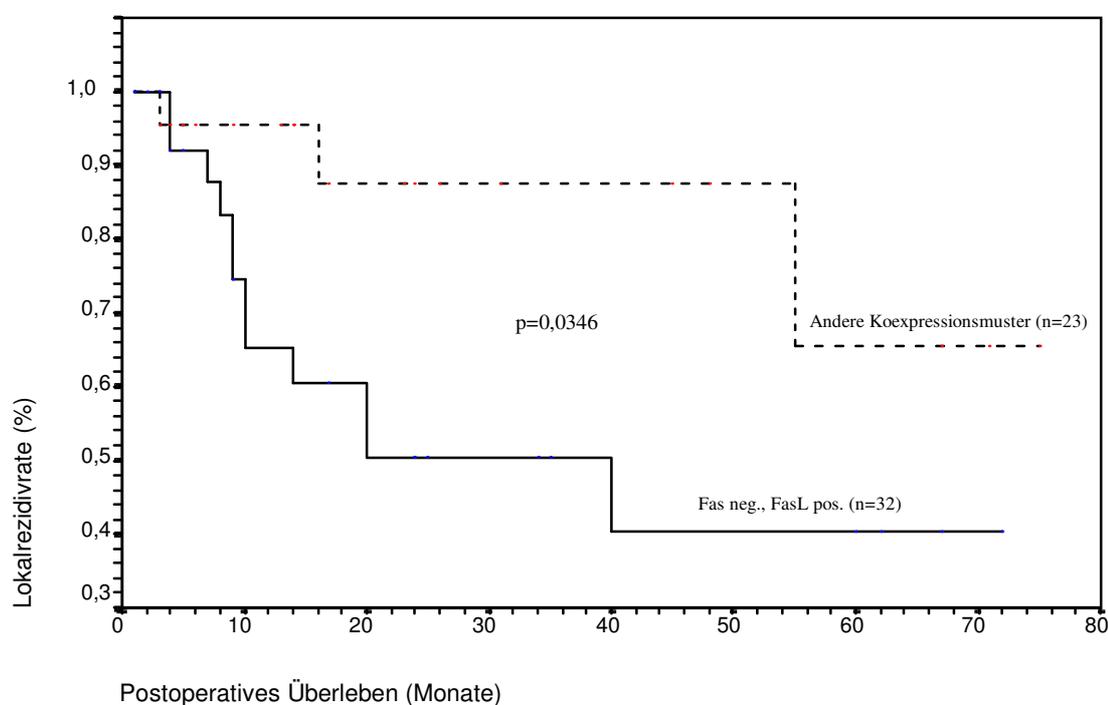
**Tabelle 3.10** Einfluss der Apoptosemoleküle und ITZ<sup>1</sup> auf die Rezidivrate

	<i>n</i>	Tumorrezidiv (%)	Kein Tumorrezidiv (%)	<i>p</i> -Wert
<b>Fas Rezeptor positiv</b>	14	4 (28,6)	10 (71,4)	
<b>Fas Rezeptor negativ</b>	41	20 (48,8)	21 (51,2)	0,1928
<b>Fas Ligand positiv</b>	42	20 (47,6)	22 (52,4)	
<b>Fas Ligand negativ</b>	13	4 (30,8)	9 (69,2)	0,3610
<b>ITZ<sup>1</sup> vorhanden</b>	39	19 (48,7)	20 (51,3)	
<b>ITZ nicht vorhanden</b>	16	5 (31,3)	11 (68,7)	0,2119

<sup>1</sup> ITZ = Isolierte Tumorzellen

Bei der Untersuchung der Koexpressionsmuster zeigte sich jedoch, dass bei Tumoren mit einer *down*-Regulierung des Fas Rezeptors bei gleichzeitig *up*-Regulierung des Fas Liganden (Fas neg./FasL pos.) im Vergleich zu anderen Koexpressionsmustern in der *Kaplan-Meier*-Überlebensanalyse einen Zusammenhang mit dem Entwicklung eines Lokalrezidivs bestand (siehe auch Abbildung 3.7). Patienten mit Tumoren dieser Antigenkombination wiesen im Median ein rezidivfreies Überleben von 38 Monate nach ihrer Operation auf, im Vergleich zu 63 Monaten bei anderen Koexpressionsmustern ( $p=0,0346$ ).

**Abbildung 3.7** Lokalrezidivfreies Überleben für Fas und Fas Ligand ( $n=55$ )



## 4 Diskussion

Trotz verbesserter chirurgischer Techniken, verfeinerter Diagnoseverfahren und multimodaler Therapieansätze haben Patienten mit Ösophaguskarzinomen mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 4-35,3% [6, 7, 24] eine unverändert ungünstige Prognose. Mögliche Erklärungen für diese Tatsache bestehen zum einen im späten Auftreten von Krankheitssymptomen [82, 81] und einem damit zum Zeitpunkt der Diagnose häufig weit fortgeschrittene Tumorleiden. Zum anderen neigen Ösophaguskarzinome zu einer frühen Tumorzell dissemination vor allem in die regionalen Lymphknoten [26].

Die Entstehung und Progression von Tumoren sind komplexe Prozesse, welche bis heute nur unvollständig aufgeklärt sind. Ein wichtiger Aspekt scheint in diesem Zusammenhang eine gestörte Immunität von Tumoren zu sein. So deutet vieles darauf hin, dass sich Tumorzellen mit Hilfe immunmodulatorischer Mechanismen zum Beispiel durch die *down*-Regulation von Antigenen des major histocompatibility complex (MHC) und seiner kostimulatorischen Moleküle wie ICAM-1 oder B7 [17, 90] oder der Sekretion von löslichen inhibitorischen Faktoren [109] der körpereigenen Immunabwehr entziehen können. Neuere Studien konnten darüber hinaus einen weiteren möglichen Mechanismus identifizieren, welcher es malignen Tumoren ermöglichen könnte, das endogene Immunsystem zu umgehen [5]. Zwei in diesem Zusammenhang wichtige Moleküle sind der zur Tumornekrosefaktor-Familie gehörende transmembranöse Apoptose-Rezeptor Fas (APO-1/CD95) und sein Ligand (FasL). Durch die Interaktion des Fas Liganden mit seinen Rezeptor wird in der betroffenen Zelle eine Proteinkettenreaktion ausgelöst, die den Tod der Zelle zur Folge hat. Dieser auch als Apoptose bezeichnete programmierte Zelltod spielt sowohl beim normalen Zellumsatz, als auch bei der Eliminierung Fas Rezeptor positiver virusinfizierter oder neoplastisch transformierter Zellen durch Fas Ligand exprimierende Zellen des Immunsystems eine zentrale Rolle.

Fas Ligand ist sowohl einer der Hauptmechanismen der Zytolyseinduktion durch zytotoxische T-Zellen [60], als auch ein Schlüsselement bei der Eliminierung von aktivierten T-Zellen während der Herunterregulation einer akuten Immunantwort [93, 101].

In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass es in malignen Tumoren durch einen partiellen oder kompletten Verlust des Fas Rezeptors (*down-Regulation*) zu einer Resistenz der Fas-vermittelten Apoptose kam [37]. Des Weiteren konnte in anderen Studien eine heraufregulierte Expression des Fas Liganden auf malignen Zellen nachgewiesen werden, die ihrerseits in Fas Rezeptor positivem gesundem Gewebe sowie aktivierten T-Lymphozyten Apoptose induzieren konnten [5, 26]. Bennett et al. [5] haben 1998 als erste den quantitativen Beweis erbringen können, dass in Fas Ligand positiven Tumorbereichen durchschnittlich doppelt so viele apoptotische tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) auftraten, als in Fas Ligand negativen Bereichen ( $p < 0,05$ ), was die von O'Connell et al. [77] 1996 erstmals postulierte Gegenattacke („counterattack model“) von Fas Ligand positiven Zellen gegen Fas Rezeptor positive TIL bestätigte.

Das „counterattack model“ ist weiterhin Gegenstand vieler aktueller Studien, da man sich hieraus ein besseres Verständnis des Immunsystems und dessen Interaktion mit malignen Tumorzellen verspricht. Die Ergebnisse solcher Arbeiten haben das Ziel, sowohl mögliche immuntherapeutische Strategien zu entwerfen, als auch denkbare immunmodulatorische Eingriffe zu ermöglichen, die versuchen könnten, die Resistenz der Tumorzellen gegenüber der körpereigenen Immunabwehr zu vermindern oder gar aufzuheben.

Eine Vielzahl von Untersuchungen hat sich damit beschäftigt, die Fas Rezeptor-Expression auf den unterschiedlichsten Geweben und malignen Tumoren zu ermitteln. So zeigte sich beispielsweise beim Colonkarzinom [68] und dem Lungenkarzinom [50] ein Verlust (*down-Regulation*) des Fas Rezeptors auf der Zelloberfläche (siehe Tabelle 1.3).

Auch Ösophaguskarzinome wurden auf ihre Fas Rezeptor-Expression hin untersucht. So zeigten Hughes et al. [36] eine Fas *down-Regulation* bei 69,5% der untersuchten Adenokarzinome des Ösophagus und die in der Studie von Gratas et al. untersuchten Plattenepithelkarzinome [26] waren zu 79% Fas *down-reguliert*. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stützen die Erkenntnisse der zuvor erwähnten Untersuchungen und zeigen eine *down-Regulation* des Fas Rezeptors bei 50 der 70 untersuchten Ösophagus-Primärtumoren (71,4%), wobei die Aufteilung in den Zelltyp keine wesentlichen

Unterschiede zeigte (74,4% der 39 Plattenepithelkarzinome und 67,7% der 31 Adenokarzinome zeigten eine *down*-Regulation ihres Fas Rezeptors). Im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Shibakita et al. [99] ergab sich in der vorliegenden Studie jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Herunterreglierung des Fas Rezeptors und dem Tumorstadium, sowie dem Differenzierungsgrad.

Die rezidivfreie Überlebenszeit war mit 55 Monaten im Median bei noch vorhandener Fas Rezeptorexpression deutlich höher als bei Patienten mit *down*-reguliertem Fas Rezeptor (20 Monate). Ähnliche Ergebnisse ergaben die Untersuchung der postoperativen Gesamtüberlebenszeit, die bei *down*-reguliertem Fas Rezeptor im Median 24 Monate betrug, im Vergleich zu 64 Monaten bei noch vorhandenem Fas Rezeptor. Die getrennte Betrachtung von Plattenepithel- und Adenokarzinomen brachte vergleichbare Erkenntnisse. Trotz dieser offensichtlichen Unterschiede war eine signifikante Korrelation zwischen der Fas Rezeptorexpression und dem postoperativen Verlauf in der Kaplan-Meier Überlebensanalyse nicht nachweisbar. Somit konnte die von einigen Forschergruppen erwähnte Unabhängigkeit der Fas Rezeptorexpression als prognostischer Faktor in multivariaten Analysen [50, 99] hier weder bei der isolierten Betrachtung von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen, noch der Ösophaguskarzinome insgesamt bestätigt werden.

Als mögliche Ursache für den Verlust des Fas Rezeptors auf neoplastischen Zellen kommt zum einen eine Mutation im Fas Gen in Betracht, die die Signalsequenz oder posttranslationale Modifikationen des Proteins verändern. Zum anderen sind Störungen im intrazellulären Transportsystem und somit der Translokation des Proteins auf die Zelloberfläche denkbar. Die zu diesem Ansatz durchgeführte *in vivo* Untersuchungen von Hughes et al. [36] deuteten nicht auf eine gestörte Transkription oder Mutation des Fas Gens, sondern vielmehr darauf hin, dass Tumorzellen die Translokation des Fas Rezeptors auf die Zelloberfläche verhindert. Der spezifische Defekt in der posttranslationalen Modifizierung konnte bisher nicht identifiziert werden.

Ein gänzlich neuer bisher nicht beschriebener Zusammenhang konnte in der vorliegenden Studie zwischen der Fas Rezeptor-Expression und dem Auftreten isolierter Tumorzellen (ITZ) in histopathologisch als tumorfrei klassifizierter Lymphknoten gezeigt werden. So waren ITZ in histopathologisch tumorfreien Lymphknoten bei Patienten mit *down*-reguliertem Fas Rezeptor signifikant häufiger nachweisbar ( $p=0,002$ ) als bei Patienten mit noch vorhandenem Fas Rezeptor (86,4% vs. 47,4%;  $p=0,002$ ). Bei der isolierten Betrachtung der Plattenepithelkarzinome wurde dieser Unterschied mit 91,7% vs. 44,4% noch deutlicher ( $p=0,009$ ). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Tumorzellen durch die Fas Rezeptor *down*-Regulation bei der Dissemination beziehungsweise Manifestation im lymphatischen System einen Selektions- und Überlebensvorteil gegenüber Fas Rezeptor positive Tumorzellen haben.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Studie eine Hochregulation (*up*-Regulation) des Fas Liganden bei 29 der 39 (74,4%) Plattenepithelkarzinome und 25 der 31 (80,6%) Adenokarzinome und somit 77,1% der Ösophaguskarzinome insgesamt ermittelt werden. Diese Ergebnisse fügen sich ein in Untersuchungen beim Hepatozellulären Karzinom [105], dem Malignen Melanom [30], dem Lungenkarzinom [75], Lebermetastasen von Colon-Adenokarzinomen [100], dem Magenkarzinom sowie dem Ösophagus Plattenepithelkarzinom [26], bei denen ebenfalls eine *up*-Regulation in 60 bis 100% der Karzinome immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 1.3 in der Einleitung).

In der vorliegenden Studie wurde die Fas Ligand-Expression sowohl hinsichtlich einer Korrelation mit den relevanten klinisch-pathologischen Parametern, als auch dem prognostische Einfluss untersucht. Hier konnte ein Zusammenhang zwischen dem Primärtumorstadium (pT) und der Fas Ligandexpression nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass Tumoren mit fortgeschrittener Infiltrationstiefe signifikant häufiger eine positive Fas Ligand-Expression ( $p=0,019$ ) aufwiesen. Noch deutlicher zeigte sich diese Verknüpfung bei der alleinigen Betrachtung der Plattenepithelkarzinome ( $p=0,005$ ).

Ein vergleichbarer Zusammenhang fiel auch zwischen der Stadiengruppierung nach UICC und der Fas Ligand-Expression auf, wobei ein niedriges Stadium durch eine niedrige und ein hohes UICC-Stadium durch eine hohe Fas Ligand-

Expression charakterisiert war. Dieses Ereignis könnte insgesamt darauf hindeuten, dass Modulationen der Fas Ligand-Expression im Rahmen der Tumorprogression erst in einem relativ späten Stadium auftreten.

Die von Gratas et al. [26] erwähnte Korrelation zwischen der Fas Ligand-Expression und dem Differenzierungsgrad konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Auch der Zelltyp des Primärtumors, sowie das Alter, Geschlecht oder Mikrometastasenstatus der Patienten wiesen keinen statistisch signifikanten Zusammenhang auf.

Nagashima et al. [72] wiesen eine verlängerte Überlebenszeit von Patienten mit Fas Ligand negativen Magenkarzinomen im Vergleich zu Fas Ligand positiven Tumoren nach. Dieser Vergleich ergab in der vorliegenden Studie mit einem insgesamt im Median 10 Monat längerem Gesamtüberleben bei Fas Ligand negativen Tumoren im Vergleich zu Fas Ligand positiven Tumoren eine ähnliche Tendenz, aber keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,3917$ ). Dieses Ergebnis stützt die von Koomägi et al. gewonnenen Erkenntnisse beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom [50], die ebenfalls die Fas Ligand-Expression keinen signifikanten Effekt auf das Gesamtüberleben der Patienten nachweisen konnten.

Insgesamt bestätigt diese Studie, dass Modulationen der Fas Rezeptor- und Ligand-Expression häufige Ereignisse sowohl beim Plattenepithelkarzinom, als auch beim Adenokarzinom des Ösophagus sind. Die häufigste Antigenkonstellation auf den Primärtumoren in dieser Studie war die *down*-Regulation des Fas Rezeptors bei gleichzeitiger heraufregulierter Expression des Fas Liganden. Diese Erkenntnisse legen im Einklang mit anderen diebezüglichen Studien nahe, dass sich Ösophaguskarzinome durch Expression des Fas Liganden sowie *down*-Regulation ihres Rezeptors der endogenen zellvermittelten Immunabwehr entziehen könnten. Tendenziell scheinen Ösophaguskarzinome bei *down*-Regulation des Fas Rezeptors früher und häufiger Rezidive zu entwickeln, als bei residualer Fas Expression. Ebenso scheint die noch vorhandene Fas Rezeptorexpression auf den neoplastisch entarteten Zellen den Patienten einen postoperativen Überlebensvorteil zu bieten. Diese Erkenntnisse decken sich mit anderen Studien [99], obgleich die

dort beschriebene Unabhängigkeit der Fas Expression als prognostischer Faktor hier nicht bestätigt werden konnte. Mögliche Ursachen könnten in der relativ geringen Anzahl der untersuchten Patienten oder der Wahl der verwendeten Primärantikörper oder immunhistochemischen Färbetechniken begründet liegen.

Zusätzlich konnte in dieser Studie ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Fas Ligand-Expression und dem T-Status, sowie der Stadiengruppierung nach UICC ermittelt werden. So war eine Fas Ligand-Expression signifikant häufiger bei fortgeschritteneren Tumoren nachweisbar, als bei frühen Tumorstadien. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Hochregulation von Fas Ligand ein im Verlauf der Tumorprogression eher spät auftretendes Ereignis darstellt.

Darüber hinaus legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen Zusammenhang von Fas *down*-Regulation und der Dissemination von Tumorzellen nahe. Diese Beobachtung könnte dahingehend gedeutet werden, dass sich Fas negative Tumorzellen durch Induktion von Apoptoseresistenz während der Dissemination und Manifestation in Lymphknoten wirkungsvoll den Angriffen der endogenen Immunabwehr entziehen können und somit gegenüber Fas Rezeptor positiven Tumorzellen einen Selektionsvorteil besitzen. Um diese Einschätzung weiter abzuklären wären jedoch weitere Fas Rezeptor Expressionsanalysen bei Lymphknoten Makrometastasen, beziehungsweise Einzelzellanalysen bei isolierten frühdisseminierten Tumorzellen notwendig.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen zahlreicher physiologischer und pathologischer Prozesse induziert das Membranprotein Fas Ligand (FasL) den apoptotischen Zelltod in Fas Rezeptor (Fas, APO-1, CD95) positiven Zellen. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass sich maligne Zellen durch die Hochregulierung des Fas Liganden und die Herunterregulierung des Fas Rezeptors auf ihrer Zelloberfläche der endogenen Immunabwehr entziehen könnten.

In dieser prospektiven klinisch-experimentellen Studie wurde unter Verwendung der Avidin-Biotin-Methode das Fas Rezeptor- und Fas Ligand-Expressionsmuster bei insgesamt 70 Patienten mit Ösophaguskarzinomen immunhistochemisch untersucht. Anschließend wurden diese experimentellen Ergebnisse mit etablierten pathohistologischen Parametern und Ergebnissen der postoperativen Nachsorgeuntersuchungen korreliert. Zusätzlich wurden 195 konventionell histopathologisch als tumorfrei klassifizierte Lymphknoten von 63 Patienten immunhistochemisch mit Hilfe der Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase Methode (APAAP) und dem Antikörper mAb Ber-EP4 auf isolierte Tumorzellen hin untersucht.

Bei 50 von 70 Ösophaguskarzinomen (71,4%) konnte eine *down*-Regulation des Fas Rezeptors, bei 77,1% (n=54) eine starke Expression des Fas Liganden eruiert werden. Bei insgesamt 47 Patienten (74,6%) konnten Ber-EP4 positive Zellen in Lymphknoten nachgewiesen werden. Bei der Korrelation dieser Daten mit den Ergebnissen der Fas Rezeptor- und Ligand-Expression zeigte sich, dass Tumoren mit *down*-reguliertem Fas Rezeptor überdurchschnittlich häufiger isolierte Ber-EP4 positive Zellen ihren Lymphknoten aufwiesen als Tumoren mit normaler Fas Rezeptorexpression (86,4% vs. 47,4%; p=0,002).

Bei der Korrelation der Ergebnisse zur Fas Rezeptor- und Ligand-Expression mit etablierten histopathologischen Parametern, wie pTNM-, UICC- und G-Status zeigte sich dass fortgeschrittenere Tumoren signifikant häufiger Fas Ligand hochreguliert waren als Tumoren in frühen Stadien. So zeigten beispielsweise 33,3% der als pT<sub>1</sub>-gewerteten Tumoren eine positive Fas Ligand-Expression auf im Vergleich zu 84,2% der pT<sub>3</sub>-Tumoren.

Bei der Berechnung des postoperativen Überlebens (Median 12 Monate ; range 1-75 Monate) zeigte sich, dass Patienten mit Fas Rezeptor positiven Tumoren im Median 55 Monate rezidivfrei überlebten, während Patienten mit Fas Rezeptor down-regulierten Tumoren nach median 20 Monaten ein Rezidiv entwickelten. Auch bei der Analyse des Gesamtüberlebens war dieser Zusammenhang eruierbar. Patienten mit Fas Rezeptor positiven Tumoren überlebten median 64 Monate, während Patienten mit Fas Rezeptor negativen Tumoren im Median nur 24 Monate überlebten. Bei der statistischen Analyse dieser Daten erwies sich das Fas Rezeptor-Expressionsmuster jedoch als nicht signifikant ( $p=0,1928$  /  $p=0,4247$ ). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Fas Ligandexpression und dem postoperativen Überleben und der Entwicklung eines Rezidivs ergab sich ebenfalls nicht.

Betrachtet man die Koexpressionsmuster von Fas Rezeptor und Fas Ligand, so zeigt sich, dass ein statistisch signifikanten Zusammenhang bei Tumoren mit down-reguliertem Fas Rezeptor und gleichzeitig hochreguliertem Fas Liganden mit der Entwicklung eines Rezidivs gibt. Patienten deren Tumoren die genannte Antigenkombination aufwiesen waren im Mittel 35 Monate kürzer rezidivfrei im Vergleich zu Tumoren mit anderen Koexpressionsmustern (38 vs. 63 Monate;  $p=0,0346$ ).

Die vorliegenden Ergebnisse weisen erstmalig auf einen Zusammenhang zwischen dem immunhistochemischen Lymphknotenstatus histopathologisch als tumorfrei klassifizierter Lymphknoten und der Fas Rezeptorexpression auf Ösophaguskarzinomen hin und beschreiben einen möglichen Einfluss des Fas Ligandstatus auf die Tumorprogression und Prognose der Patienten.

## 6 Anhang

### 6.1 Tabellen

**Tabelle 6.1** TNM/pTNM-Klassifikation des Ösophaguskarzinoms [124]

<b>Primärtumor (T)</b>	
T <sub>x</sub>	Die Ausdehnung der Tumorinvasion kann nicht bestimmt werden
T <sub>0</sub>	Keine Evidenz für einen Primärtumor
T <sub>is</sub>	Carcinoma in situ
T <sub>1</sub>	Tumorinfiltration bis in die Submucosa
T <sub>2</sub>	Tumorinfiltration bis in die Muscularis propria
T <sub>3</sub>	Tumorinfiltration über die Muscularis propria hinaus
T <sub>4</sub>	Tumorinfiltration in die Nachbarstrukturen
<b>Regionale Lymphknoten (N)</b>	
N <sub>x</sub>	Die Ausdehnung der Tumorinvasion kann nicht bestimmt werden
N <sub>0</sub>	Keine Evidenz für regionale Lymphknotenmetastasen
N <sub>1</sub>	Regionale Lymphknotenmetastasen
<b>Fernmetastasen (M)</b>	
M <sub>x</sub>	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht bestimmt werden
M <sub>0</sub>	Keine Evidenz für Fernmetastasen
M <sub>1</sub>	Fernmetastasen
suprabifurkal:	
M <sub>1a</sub>	Metastasen in zervikalen Lymphknoten
M <sub>1b</sub>	andere Metastasen
infrabifurkal:	
M <sub>1a</sub>	Metastasen in zöliakalen Lymphknoten
M <sub>1b</sub>	andere Metastasen

**Tabelle 6.2** Stadiengruppierung des Ösophaguskarzinoms [124]

Stadium 0	T <sub>is</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadium I	T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadium IIA	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadium IIB	T <sub>1</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>2</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
Stadium III	T <sub>3</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>4</sub>	Jedes N	M <sub>0</sub>
Stadium IVA	Jedes T	Jedes N	M <sub>1a</sub> (lokoreg LK)
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M <sub>1b</sub> (fernmet)

## 6.2 Spezielles Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 6.3** Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Vollständiger Name</b>	<b>Referenz</b>
ABC	Avidin-Biotin-Complex	[34]
ACE	Adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia	
APAAP	Alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase	[16]
APO-1	Apoptosis Receptor 1, siehe Fas	[68]
CAP	Cytotoxicity-dependent APO-1-associated protein	[48]
CD 95	Siehe Fas	
Caspase	Cystein aspartic acid-specific protease (Cystein protease cleaving an aspartic acid residue)	[70]
DAB	3,3'-diaminobenzidine	[16]
DD	Death Domain	[74]
DED	Death effector Domain	[13, 71]
DISC	Death Inducing Signaling Complex	[48, 101]
Fab	Protease-generated antibody fragment	
FADD	Fas-associated Death Domain Synonym: MORT-1	[13]
Fas	Fibroblast associated Synonyme : CD 95, Apo-1	[41]
FasL	Fibroblast associated Ligand Synonyme : CD 95L / Apo-1 Ligand / MAb	[41]
FLICE	FADD like ICE Synonym: MACH, Caspase-8, Mch5	[37, 71]
gld	generalized lymphoproliferative disease	[111]
ICE	Interleucin-1 $\beta$ -converting enzyme Synonym: Caspase-1	[2]
MAb	Synonym für Fas Ligand	
MACH	Siehe FLICE	
Mch-5	Siehe FLICE	
MORT-1	Siehe FADD	
SCEC	Small cell carcinoma of the esophagus	[65]
SCCE	Squamous cell carcinoma of the esophagus	[106]
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor	[37]
TRAF	TNF receptor associated factors	[121]

## 6.3 Färbeprotokolle

### 6.3.1 ABC

#### 1. Trocknen der Präparate

Die Schnitte werden für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet

#### 2. Fixierung der Gewebeschnitte

- a) Die Schnitte werden für 3 Minuten in 100% Aceton gelegt
- b) Danach werden sie zur Hydrierung zweimal für je 5 Minuten in Pufferlösung (PBS, pH 7,4) getaucht

#### 3. Blockschritte

- a) Hemmung der endogene Peroxidase: Eintauchen der Schnittpräparate in ein Bad aus 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS für 10 Minuten
- b) Waschen: Spülen der Schnitte zunächst in Aqua dest., dann in Pufferlösung (PBS, pH 7,4) zweimal für je 5 Minuten
- c) Hemmung der endogenen Avidin und Biotin: Auftragen zunächst der Avidin-, danach der Biotin-Lösung (VECTOR<sup>®</sup>, USA, Avidin-Biotin blocking kit, sp-2001) in einer Feuchtkammer für je 15min. bei Raumtemperatur
- d) Waschen: erneutes Eintauchen der Schnitte in Pufferlösung (PBS, pH 7,4) zweimal für je 5 Minuten
- e) Hemmung unspezifischer Antikörperanlagerung: Inkubation mit Blocking Serum<sup>1</sup> bei einer Verdünnung von 1:100 für 20 Minuten (Non-Immune-Serum)

#### 4. Auftragen der Primärantikörper und Isotypkontrollen

- a) Primärantikörper Anti -Fas ( DX2 Pharmingen<sup>®</sup> ), Verdünnung 1:500 (1µg/ml)
- b) Isotypkontrolle Fas ( Mouse IgG MOPC-21, Sigma<sup>®</sup>), Verdünnung 1:1000 (1µg/ml)
- c) Primärantikörper Anti-FasL ( Q 20, Santa Cruz Biotech.<sup>®</sup>), Verdünnung 1:200 (1µg/ml)
- d) Isotypkontrolle FasL (Rabbit IgG I8140, Technical Grade, SIGMA<sup>®</sup>), Verdünnung 1:50.000 (1µg/ml)

Auftragen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

<sup>1</sup> Alle Reagenzien befanden sich im Vectastain Elite ABC-KIT (Vector<sup>®</sup>, USA, PK-6200)

e) Waschen in Pufferlösung (PBS, pH 7,4) zweimal für je 5 min.

### 5. Auftragen des Sekundärantikörpers (Vector®)<sup>1</sup>

- a) Anmischen: in BSA/PBS 1% laut Anleitung und für 30min. inkubieren
- b) Waschen: zweimal in PBS Puffer (pH 7,4) jeweils 5 Minuten

### 6. Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex<sup>1</sup>

- a) Anmischen: laut Anleitung, auftragen und für 30 Minuten inkubieren
- b) Waschen: zweimal in PBS Puffer (pH 7,4) jeweils 5 Minuten

### 7. Färbung und Gegenfärbung

- a) Färbung: Auftragen des Chromogens (DAB, Vector®,SK-4100) für 5 Minuten
- b) Gegenfärbung:
  - ( Spülen unter fließendem Leitungswasser
  - ( Eintauchen in Aqua dest. für 10 Sekunden
  - ( Eintauchen in Meyer's Hämatoxilinlösung (Sigma, USA, MHS-32) für 5 Minuten
  - ( Bläuen: Spülen in fließendem Leitungswasser
  - ( Erneutes Eintauchen in Aqua dest. für 10 Sekunden

### 8. Trocknen lassen und Eindeckeln mit Gelatine

- a) Auftragen von Glycergelatine (Dako A/S, Dänemark, Glycergel, C 0563)
- b) Auflegen von Deckgläschen

---

<sup>1</sup> Alle Reagenzien befanden sich im Vectastain Elite ABC-KIT (Vector®, USA, PK-6200)

### 6.3.2 APAAP

#### 1. Trocknen der Präparate

Die Schnitte werden für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet

#### 2. Herstellung des Tris-Puffers

a) Herstellung der Stammlösung:

48,4g Tris (Life Technologies®, USA, Code 15504020) mit Aqua dest.  
auf 2 l auffüllen (ergibt Tris 2-molar)

b) Herstellung der Gebrauchslösung:

- ( 1225ml Tris 2 molar
- ( 100ml 2 molare Salzsäure
- ( 42,4g NaCl

mit Aqua dest. auf 5 l auffüllen, den pH-Wert auf 7,4 einstellen

#### 3. Fixierung der Gewebeschnitte

- a) Die Schnitte werden für 3 Minuten in 100% Aceton gelegt
- b) Danach werden sie zur Hydrierung zweimal für je 8 Minuten in Tris-Puffer (TBS, pH 7,4) getaucht

#### 9. Verringerung unspezifischer Hintergrundfärbung

- a) Inkubation mit AB-Serum (Biotest Diagnostics, Code-Nr.: 805135),  
Verdünnung auf 1:10 in TBS, Inkubation für 10 Minuten
- b) Abklopfen der Schnitte, nicht waschen

#### 10. Auftragen des Primärantikörpers und der Isotypkontrolle

- a) Primärantikörper Ber-EP4 (Dako A/S®, Dänemark, Code: M 804),  
Verdünnung 1:400 (0,625µg/ml)
- b) Isotypkontrolle ( Mouse IgG MOPC-21, Sigma®, Code-Nr.: M-9269),  
Verdünnung 1:1600 (1µg/ml)

Auftragen und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

- c) Waschen in Pufferlösung (TBS, pH 7,4) zweimal für je 5 min.

#### 11. Auftragen des Brückenantikörpers

- a) Sekundärantikörper Z 259 (Dako A/S, Dänemark), Verdünnung 1:50

- Auftragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- b) Waschen: zweimal in PBS Puffer (pH 7,4) jeweils 5 Minuten

## 12. Inkubation mit APAAP Komplex

- a) Tertiärantikörper APAAP Mouse (Dako A/S, Dänemark, Code-Nr. D 651, Klon AP7/6/7), Verdünnung 1:100
- Auftragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- b) Waschen: zweimal in PBS Puffer (pH 7,4) jeweils 5 Minuten

## 13. Färbung und Gegenfärbung

- a) Färbung: Ansetzen des Substrates
- ( Lösung A: 150ml TBS + 1,7g NaCl + 60mg Levamisole => mischen und pH-Wert auf 8,24 einstellen
  - ( Lösung B: 0,75ml N,N-Dimethylformamid (Sigma, D 4254) + 30mg Naphtol AS-BI-phosphat (Sigma, N 2250)
  - ( Lösung C: 0,3ml 5% Neufuchsin (Sigma N 0638, 5g in 100ml 2N HCl) + 7,5ml 4% Natriumnitrit (Sigma, S 2252)
- Substanzen der Lösung C für 60sek miteinander reagieren lassen =>
- Mischen der Lösung A und B => Hinzufügen von Lösung C => Filtern
- ( Inkubation: für 30 Minuten im Dunkeln
- b) Gegenfärbung:
- ( Spülen unter fließendem Leitungswasser
  - ( Zweimaliges Eintauchen in Aqua dest. für je 10 Sekunden
  - ( Eintauchen in Hämatoxilin Gill für 18 Sekunden
  - ( Eintauchen in Leitungswasser für 30 Sekunden
  - ( Erneutes Eintauchen in Aqua dest. für 10 Sekunden

## 14. Eindeckeln

- a) Überschichtung mit Crystal Mount (Biømeda, Code-Nr. MØ 3)
- b) Trocknen über Nacht bei Raumtemperatur
- c) am nächsten Tag Eindeckeln mit Permount (Fisher Scientific, Code-Nr. SP 15-500) und Deckgläschen

## Literaturverzeichnis

1. Adams J.M., Cory S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1325
2. Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171
3. Bamberger A.M., Schulte H.M., Thuncke I., Erdmann I., Bamberger C.M., Asa S.L. (1997) Expression of apoptosis-inducing Fas ligend (FasL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 3173-3175
4. Bellgrau D., Gold D., Selawry H., Moore J., Franzusoff A., Duke R.C. (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft reaktion. *Nature* 377: 630-632
5. Bennett M.W., O'Connell J., O'Sullivan G.C., Brady C., Roche D., Collins J.K., Shanahan F. (1998) The Fas Counterattack In Vivo: Apoptotic Depletion of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Associated with Fas Ligand Expression by Human Esophageal Carcinoma. *J.Immunol.* 160 (11): 5669-5675
6. Berrino F., Sant M., Verdecchia A., Capacaccia R., Hakulinen T., Estève J. (1995) Survival of cancer patients in Europe: the Eurocare Study. Lyon, France: IARC :
7. Blot W.J., Devesa S.S., Kneller R.W., Fraumeni J.F. (1991) Rising Incidence of Adenocarcinoma of the Esophagus an Gastric Cardia. *JAMA* 265: 1287-1289

8. Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V., Wallach D. (1996) Involvement of MACH, a Novel MORT1/FADD-Interacting Protease, in Fas/APO-1- and TNF Receptor-Induced Cell Death. *Cell* 85: 803-815
9. Boldin M.P., Varfolomeev E.E., Pancer Z., Mett I.L., Camonis J.H., Wallach D. (1995) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO-1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270: 7795-7798
10. Botterweck A.A.M., Schouten L.J., Volovics A., Dorant E., Van Den Brandt P.A. (2000) Trends in incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in ten European countries. *Int. J. Epidemiol.* 29: 645-654
11. Catlett I.M., Bishop G.A. (1999) Cutting edge: a novel mechanism for rescue of B cells from CD95/Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 163: 2378-2381
12. Chinnaiyan A.M., O' Rourke K., Tewari M., Dixit V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512
13. Chinnaiyan A.M., Tepper C.G., Seldin M.F., O' Rourke K., Kischkel F.C., Hellbardt S., Kramer P., Peter M.E., Dixit V.M. (1996) FADD/MORT1 Is a Common Mediator of CD95 (Fas/APO-1) and Tumor Necrosis Factor Receptor-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271 (9): 4961-4965
14. Cohen J.J., Duke C., Fadok V.A., Sellins K.S. (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 267-293
15. Consigliere D., Chua C.L., Hui F. (1992) Computed tomography for esophageal carcinoma: its value to the surgeon. *J. R. Coll. Surg. Edinb.* 37: 113-117

16. Cordell J.L., Falini B., Erber W.N., Ghosh A.K., Abdulaziz Z., MacDonald S., Pulford K.A., Stein H., Mason D.Y. (1984) Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J. Histochem. Cytochem.* 21: 219-229
17. Cordon-Cardo C., Fuks Z., Drobnjak M. (1991) Expression of the HLA-A.B.C antigens on primary and metastatic tumor cell populations of human carcinomas. *Cancer Res.* 51: 6372-6380
18. Daniel P.T., Krammer P.H. (1994) Activation induces sensitivity toward APO-1 (CD95)-mediated apoptosis in human B-cells. *J. Immunol.* 152: 5624-5632
19. Dhein, J., Daniel, P.T., Trauth, B.C., Oehm, A., Moller, P., Krammer, P.H. (1992) Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J. Immunol.* 149: 3166-3173
20. Dt. Krebsgesellschaft: Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2002, 3. Auflage 2002
21. Egerton M., Scollay R., Shortman K. (1990) Kinetics of mature T cell development in the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2579-2582
22. Eischen C.M., Schilling J.D., Lynch D.H., Krammer P.H., Leibson P.J. (1996) Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis. *J. Immunol.* 156: 2693-2699
23. Ellis R.E., Yuan J., Horvitz H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 663-698

24. Gillison, E.W., Powell, J., McConkey, C.C., Spychal, R.T. (2002) Surgical workload and outcome after resection for carcinoma of the oesophagus and cardia. *Br. J. Surg.* 89: 344-348
25. Gleeson C.M., Sloan J.M., McGuigan J.A., Ritchie A.J., Russell S.E.H. (1995) Base transition at CpG dinucleotides in the p53 gene are common in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 55: 3406-3411
26. Gratas C., Tohma Y., Barnas C., Taniere P., Hainaut P., Ohgaki H. (1998) Up-regulation of Fas (APO-1/CD95) Ligand and Down-Regulation of Fas Expression in Human Esophageal Cancer. *Cancer Res.* 58: 2057-2062
27. Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M., Green D.R., Ferguson T.A. (1995) Fas Ligand-Induced Apoptosis as a Mechanism of Immune Privilege. *Science* 270: 1189-1192
28. Griffith T.S., Ferguson T.A. (1997) The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol. Today* 18: 240-244
29. Hahne M., Renno T., Schroeter M., Irmeler M., French L., Bornand T., MacDonald H.R., Tschopp J. (1996) Activated B cells express functional Fas ligand. *Eur. J. Immunol.* 26: 721-724
30. Hahne M., Rimoldi D., Schröter M., Romero P., Schreier M., French L.E., Schneider P., Bornand T., Fontana A., Lienard D., Cerottini J.-C., Tschopp J. (1996) Melanoma Cell Expression of Fas (Apo-1/CD95) Ligand: Implications for Tumor Immune Escape. *Science* 274: 1363-1366
31. Hennessy T.P.J. (1996) Cancer of the esophagus. *Postgrad. Med. J.* 72: 458-463

32. Hitoshi Y., Lorens J., Kitada S.I., Fisher J., LaBarge M., Ring H.Z., Francke U., Reed J.C., Kinoshita S., Nolan G.P. (1998) Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T-cells. *Immunity* 8: 461-464
33. Hosch, S.B., Knoefel, W.T., Metz, S., Stoecklein, N., Niendorf, A., Broelsch, C.E., Izbicki, J.R. (1997) Early lymphatic tumor cell dissemination in pancreatic cancer: frequency and prognostic significance. *Pancreas* 15: 154-159
34. Hsu,-S-M; Raine,-L; Fanger,-H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580
35. Hu S., Vincenz C., Ni J., Gentz R., Dixit V.M. (1997) I-Flice, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor -1- and CD-95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 17255-17257
36. Hughes S.J., Nambu Y., Soldes O.S., Hamstra D., Rehemtulla A., Iannettoni M.D., Orringer M.B., Beer D.G. (1997) Fas/APO-1 (CD95) Is not Translocated to the Cell Membrane in Esophageal Cancer. *Cancer Res.* 57: 5571-5578
37. Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J.L., Schroter M., Burns K., Mattmann C. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-195
38. Itoh N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S.-I., Sameshima M., Hase A., Seto Y., Nagata S. (1991) The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis. *Cell* 66: 233-243

39. Izbicki, J.R., Hosch, S.B., Pichlmeier, U., Rehders, A., Busch, C., Niendorf, A., Passlick, B., Broelsch, C.E., Pantel, K. (1997) Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N. Engl. J. Med.* 337: 1188-1194
40. Jereczek-Fossa B., Airoidi M., Gribaudo S., Ruo Redda M.G., Valente G., Orecchia R. (2000) Small cell carcinoma of the esophagus. *Tumori* 86: 174-177
41. Johnson D., Lanahan A., Buck C.R., Sehgal A., Morgan C., Mercer E., Bothwell M., Chao M. (1986) Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47: 545-554
42. Ju S.T., Cui H., Panka D.J., Ettinger R., Marshak-Rothstein A. (1994) Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4<sup>+</sup> Th1 and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4185-4189
43. Kabat G.C., Ng S.K.C., Wynder E.L. (1993) Tobacco, alcohol intake, and diet in relation to adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Cancer Causes and Control* 4: 123-132
44. Kauma S.W., Huff T.F., Hayes N., Nilkaeo A. (1999) Placental Fas Ligand Expression Is a Mechanism for Maternal Innate Tolerance to the Fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 2188-2194
45. Kawabe Y., Ochi A. (1991) Programmed cell death and extrathymic reduction of V $\beta$ 8<sup>+</sup>CD4 cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin. *Nature* 349: 245-248
46. Kerr J.F.R. (1971) Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* 105: 13-20

47. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257
48. Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., Peter M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins (CAP) form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14: 5579-5588
49. Koide N., Koike S., Adachi W., Amano J., Usuda N, Nagata T. (1997) Immunohistochemical expression of bcl-2 protein in squamous cell carcinoma and basaloid carcinoma of the esophagus. *Surg. Today* 27: 685-691
50. Koomägi R., Volm M. (1999) Expression of Fas (CD95/APO-1) and Fas Ligand in Lung Cancer, its Prognostic and Predictive Relevance. *Int. J. Cancer* 84: 239-243
51. Krammer P.H., Behrmann I., Daniel P., Dhein D., Debatin K.-M. (1994) Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 279-289
52. Krammer P.H., Dhein J., Walczak H., Behrmann I., Mariani S., Matiba B., Fath M., Daniel P.T., Knipping E., Westendorp M.O., Stricker K., Bäumler C., Hellbardt S., Germer M., Peter M.E., Debatin K.-M. (1994) The Role of APO-1-Mediated Apoptosis in the Immune System. *Immunol. Rev.* 142: 175-191
53. Kubuschok, B., Passlick, B., Izbicki, J.R., Thetter, O., Pantel, K. (1999) Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 17: 19-24

54. Kwon B.S., Weissmann S.M. (1989) cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1963-1967
55. Latza, U., Niedobitek, G., Schwarting, R., Nekarda, H., Stein, H. (1990) Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial. *J. Clin. Pathol* 43: 213-219
56. Lee S.H., Jang J.J., Lee J.Y., Kim S.Y., Park W.S., Shin M.S., Dong S.M., Na E.Y., Kim K.M., Kim S.H., Yoo N.J. (1998) Fas ligand is expressed in normal skin and in some cutaneous malignancies. *Br.J.Dermatol.* 139: 186-191
57. Leithäuser F., Dhein J., Mechtersheimer G., Koretz K., Brüderlein S., Henne C., Schmidt A., Debatin K.-M., Krammer P.H., Möller P. (1993) Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab. Invest.* 69: 415-429
58. Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501
59. Lichter P., Walczak H., Weitz S., Behrmann I., Krammer P.H. (1992) The human APO-1 1 (APT) antigen maps to 10q23, a region that is syntenic with mouse chromosome 19. *Genomics* 14: 179-180
60. Lowin, B., Hahne, M., Mattmann, C., Tschopp, J. (1994) Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370: 650-652
61. Majno G., Joris I. (1995) Apoptosis, Oncosis and Necrosis - An overview of Cell Death. *Am. J. Path.* 146: 3-15

62. Mallett S., Fossum S., Barclay A.N. (1990) Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. *EMBO J.* 9: 1063-1068
63. Marger R.S., Marger D. (1993) Carcinoma of the esophagus ant tylosis: a lethal genetic combination. *Cancer* 72: 17-19
64. Mayer R.J. (1997) Gastrointestinal tract cancer. In: Fauci A.S., Braunwad E., Isselbacher K., Wilson J.D., Martin J.B., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L. (eds) *Harrisson' s principles of internal medicine*. McGrawHill, New York: 568-578
65. McKeown, F. (1952) Oat-cell carcinoma of the esophagus. *J. Pathol. Bacteriol.* 64: 889-891
66. Meneu-Diaz J.C., Blazquez,L.A., Vicente,E., Nuno,J., Quijano,Y., Lopez-Hervas,P., Devesa,M., Fresneda,V. (2000) The role of multimodality therapy for resectable esophageal cancer. *Am. J. Surg.* 179: 508-513
67. Moller H., Jensen O.M. (1988) Trends in incidence of esophagus, cardia and stomach cancer in Denmark 1943-1982. In: *The Sixth Annual ECP Symposium, International Symposium on Gastric Carcinogenesis 6th ed.* London:
68. Möller P., Koretz K., Leithäuser F., Brüderlein S., Henne C., Quentmeier A., Krammer P.H. (1994) Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int. J. Cancer* 57: 371-377
69. Montesano R., Hollstein M., Hainaut P. (1996) Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int. J. Cancer* 69: 225-235

70. Muzio M, Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Dixit V.M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation.. J. Biol. Chem. 273: 2926-2930
71. Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O' Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J.D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E., Dixit V.M. (1996) FLICE, A Novel FADD-Homologous ICE/CED-3-like Protease, Is Recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) Death-Inducing Signaling Complex. Cell 85: 817-827
72. Nagashima, H., Mori, M., Sadanaga, N., Mashino, K., Yoshikawa, Y., Sugimachi, K. (2001) Expression of Fas ligand in gastric carcinoma relates to lymph node metastasis. Int. J. Oncol. 18: 1157-1162
73. Nagata S. (1997) Apoptosis by death factor. Cell 88: 355-365
74. Nagata S., Golstein P. (1995) The Fas Death Factor. Science 267: 1449-1455
75. Niehans G.A., Brunner T., Frizelle S.P., Liston J.C., Salerno C.T., Knapp D.J., Green D.R., Kratzke R.A. (1997) Human Lung Carcinomas Express Fas Ligand. Cancer Res. 57: 1007-1012
76. Nossal G.J.V. (1994) Negative selection of lymphocytes. Cell 76: 229-239
77. O' Conell J., O' Sullivan G.C., Collins J.K., Shanahan F. (1996) The Fas Counterattack: Fas-mediated T Cell Killing by Colon Cancer Cells Expressing Fas Ligand. J. Exp. Med. 184: 1075-1082

78. O'Connell J., Bennett M.W., O' Sullivan G.C., Roche D., Kelly J., Collins J.K., Shanahan F. (1998) Fas ligend expression in primary colon adenocarcinomas: evidence that the Fas counterattack is a prevalent mechanism of immune evasion in human colon cancer. *J.Pathol.* 186: 240-246
79. Oehm A., Behrmann I., Falk W., Pawlita M., Maier G., Klas C., Li-Weber M., Richards S., Dhein J., Trauth B.C., Ponsting H., Krammer P.H. (1992) Purification and Molecular Cloning of the APO-1 Cell Surface Antigen, a member of the Tumor Necrosis Factor/Nerve Growth Factor Receptor Superfamily. *J. Biol. Chem.* 267: 10709-10715
80. Ohbu M., Saegusa M., Kobayashi N., Tsukamoto H., Mieno H., Kakita A., Okayasu I. (1997) Expression of bcl-2 protein in esophageal squamous cell carcinomas and its association with lymph node metastasis. *Cancer (Phila.)* 79: 1287-1293
81. Ojala K., Jokinen K., Sorri M., Kairaluoma M.I. (1982) Symptoms and diagnostic delay in patients with carcinoma of oesophagus and gastric cardia: a retrospective study of 225 patients. *Postgrad. Med. J.* 58: 264-267
82. Ojala K., Jokinen K., Sorri M., Kairaluoma M.I. (1982) Symptoms of carcinoma of the oesophagus. *Med. J. Aust.* 1: 384-385
83. Okada K., Komuta K., Hashimoto S., Matsuzaki S., Kanematsu T., Koji T. (2000) Frequency of Apoptosis of Tumor-infiltrating Lymphocytes Induced by Fas Counterattack in Human Colorectal Carcinoma and Its Correlation with Prognosis. *Cl. Cancer Res.* 6: 3560-3564
84. Orlinick J.R., Elkon K.B., Chao M.V. (1997) Separate Domains of the Human Fas Ligand Dictate Self-association and Receptor Binding. *J. Biol. Chem.* 272: 32221-32229

85. Osmond D.G., Kim R., Manoukjan R., Philips A., Rico-Vargas A., Jacobsen K. (1992) Dynamics and localisation of early B-lymphocyte precursor cells (pro-B-cells) in the bone marrow of scid mice. *Blood* 79: 1695-1703
86. Passlick, B., Izbicki, J.R., Kubuschok, B., Nathrath, W., Thetter, O., Pichlmeier, U., Schweiberer, L., Riethmuller, G., Pantel, K. (1994) Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 12: 1827-1832
87. Powell J., McConkey C.C. (1990) Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cardia and adjacent sites. *Br. J. Cancer* 62: 440-443
88. Raff M.C. (1992) Social Controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400
89. Reed C.E. (1999) Surgical Management of Esophageal Carcinoma. *Oncologist* 4: 95-105
90. Restifo N.P., Esquivel F., Kawakami Y., Yewdell J.W., Mulé J.J., Rosenberg S.A., Bennink J.R. (1993) Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J. Exp. Med.* 177: 265-272
91. Rice T.W., Zuccaro G., Adelstein D.J. (1998) Esophageal carcinoma: depth of tumor invasion is predictive of lymph node status. *Ann. Thorac. Surg.* 65: 787-792
92. Riede U.N., Schaefer H.E. (1999) Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
93. Rouvier E., Luciani M.-F., Golstein P. (1993) Fas Involved in Ca<sup>2+</sup>-independent T Cell-mediated Cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 177: 195-200

94. Sandler R.S., Nyren O., Ekblom A., Eisen G.M., Yuen J., Joseffson S. (1995) The risk of esophageal cancer in patients with achalasia. A population based study. *JAMA* 274: 1359-1362
95. Scaffidi C., Krammer P.H., Peter M.E. (1999) Isolation and Analysis of Components of CD95 (APO-1/Fas) Death-Inducing Signaling Complex. *Methods* 17: 287-291
96. Schattner E.J., Elkon K.B., Yoo D.H., Tumang J., Krammer P.H., Crow M.K., Friedmann S.M. (1995) CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B-Lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J. Exp. Med.* 182: 1557-1562
97. Schneider T.J., Grillo D., Foote L.C., Nunez G.E., Rothstein T.L. (1997) Bcl-x protects primary B cell against Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 159: 4834-4840
98. Sheibani, K., Shin, S.S., Kezirian, J., Weiss, L.M. (1991) Ber-EP4 antibody as a discriminant in the differential diagnosis of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 15: 779-784
99. Shibakita M., Tachibana M., Dhar D.K., Kotoh T., Kinugasa S., Kubota H., Masunaga R., Nagasue N. (1999) Prognostic Significance of Fas and Fas Ligand Expressions in Human Esophageal Cancer. *Cl. Cancer Res.* 5: 2464-2469
100. Shiraki K., Tsuji N., Shioda T., Isselbacher K.J., Takahashi H. (1997) Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 6420-6425
101. Singer G.G., Abbas A.K. (1994) The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1: 365-371

102. Sondenna K., Skaane P., Nygaard K. (1992) Value of computed tomography in preoperative evaluation of resectability and staging in esophageal cancer. *Eur. J. Surg.* 168: 537-540
103. Spechler S.J., Goyal R.K. (1986) Barrett' s esophagus. *N. Engl. J. Med.* 315: 362-371
104. Stamenkovic I., Clark E.A., Seed B. (1989) A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J.* 8: 1403-1410
105. Strand S., Hofmann W.J., Hug H., Müller M., Otto G., Strand D., Mariani S.M., Stremmel W., Krammer P.H., Galle P.R. (1996) Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells - A mechanism of immune evasion? *Nat. Med.* 2: 1361-1366
106. Streitz J.M., Ellis F.H., Gipp S.P., Heatley G.M. (1995) Achalasia and squamous cell carcinoma of the esophagus: analysis of 241 patients. *Ann. Thorac. Surg.* 59: 1604-1609
107. Suda T., Nagata S. (1994) Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.* 179: 873-879
108. Suda T., Takahashi T., Golstein P., Nagata S. (1993) Molecular Cloning an Expression of the Fas Ligand, a Novel Member of the Tumor Necrosis Factor Family. *Cell* 75: 1169-1178
109. Sulitzeanu D. (1993) Immunosuppressive factors in human cancer. *Adv. Cancer Res.* 60: 247-271
110. Suzuki H., Nagayo T. (1980) Primary tumors of the esophagus other than squamous cell carcinoma: Histologic classification and statistics in the surgical and autopsied materials in Japan. *Int. Adv. Surg. Oncol.* 3: 73-109

111. Takahashi T., Tanaka M., Brannan C.I., Jenkins N.A., Copeland N.G., Suda T., Nagata S. (1994) Generalized Lymphoproliferative Disease in Mice, Caused by a Point Mutation in the Fas Ligand. *Cell* 76: 969-976
112. Takahashi T., Tanaka M., Inazawa J., Abe T., Suda T., Nagata S. (1994) Human Fas ligand: gene Structure, chromosomal location an species specificity. *Int. Immunol.* 6: 1567-1574
113. Tanaka M., Itai T., Adachi M., Nagata S. (1998) Down-regulation of Fas ligand by shedding. *Nat. Med.* 4: 31-36
114. Thornberry N.A., Lazebnik Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316
115. Trauth B.C., Klas C., Peters A.M.J., Matzku S., Möller P., Falk W., Debatin K.-M., Krammer P.H. (1989) Monoclonal Antibody -Mediated Tumor Regression by Induction of Apoptosis. *Science* 245: 301-305
116. Ungefroren H., Voss M., Jansen M., Roeder C., Henne-Bruns D., Kremer B., Kalthoff H. (1998) Human Pancreatic Adenocarcinomas Express Fas and Fas Ligand Yet Are Resistant to Fas-mediated Apoptosis. *Cancer Res.* 58: 1741-1749
117. Upton C., DeLange A.M., McFadden G. (1987) Tumorigenic poxviruses: genomic organization and DNA sequence of the telomeric region of the Shope fibroma virus genome. *Virology* 160: 20-30
118. Urba S., Orringer M., Turrisi A. (1997) A randomized trial comparing surgery to preoperative concomitant chemoradiation plus surgery in patients with resectable esophageal cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 16: 277

119. Vilgrain V., Mompoin D., Palazzo L. (1990) Staging of esophageal carcinoma: comparison of results with endoscopic sonography and CT. *Am. J. Roentgenol.* 155: 277-281
120. Walsh T.N., Noonan N., Hollywood D., Kelly A., Keeling N., Hennessy T.P.J. (1996) A comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* 335 (7): 462-467
121. Wang C.Y., Mayo M.W., Korneluk R.G., Goeddel D.V., Baldwin A.S. (1998) NF- $\kappa$ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281: 1680-1684
122. Watanabe-Fukunaga R., Brannan C.I., Itoh N., Yonehara S., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nagata S. (1992) The cDNA Structure, Expression, and Chromosomal Assignment of the Mouse Fas Antigen. *Int. Immunol.* 148: 1274-1279
123. Winters D., Spurling T.J., Chobanian S.J., Curtis D.J., Esposito R.L., Hacker J.F., Johnson D.A., Cruess D.F., Cotelingham J.D., Gurney M.S., Cattau E.L. (1987) Barrett' s esophagus: a prevalent, occult complication of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 92: 118-124
124. Wittekind C., Wagner G, (Hrsg.) (1997) TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 5. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 5. UICC
125. Wyllie A.H. (1994) Death gets a brake. *Nature* 369: 272-273
126. Wyllie A.H. (1997) Apoptosis and carcinogenesis. *Eur. J. Cell. Biol.* 73: 189-197
127. Wyllie A.H., Morris R.G., Smith A.L., Dunlop D. (1984) Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142: 67-77

128. Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132
  
129. Zheng T., Devesa S.S., Kneller R.W., Fraumeni J.F. (1991) Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 265: 1287-1289

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem verehrten Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. Stefan B. Hosch für die Überlassung des Themas, die ausführlichen Diskussionen, mit denen er meine Arbeit unterstützte, herzlich bedanken.

Ganz besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. Peter Scheunemann für die intensive wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die Zeit, die er sich genommen hat, um viele konstruktive Anregungen zu geben.

Darüber hinaus möchte ich Frau Franziska Stern und Frau Silke Brilloff für die hervorragende Anleitung und technische Unterstützung im Forschungslabor danken.

## Lebenslauf

Am 09. Dezember 1973 wurde ich in Hamburg geboren. Von August 1980 bis Juni 1984 besuchte ich die Grundschule Oststeinbek (Schleswig Holstein) und von August 1984 bis Juni 1993 das Gymnasium Glinde (Schleswig Holstein), wo ich 1993 mein Abitur bestand. Nach dem Zivildienst, den ich von Juli 1993 bis Oktober 1994 als Krankenpflegehelfer im Marienkrankenhaus ableistete, immatrikulierte ich mich zum Wintersemester 1994 an der Universität Hamburg beim Fachbereich Humanmedizin. Im Oktober 1996 legte ich die Ärztliche Vorprüfung ab. Im Oktober 1997 absolvierte ich den Ersten Abschnitt und im September 2000 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Im Juli 1998 begann ich mit meiner klinisch-experimentellen Doktorarbeit unter der Leitung von Priv. Doz. Dr. S.B. Hosch in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf. Thema der onkologisch-orientierten Doktorarbeit war die vorliegende klinisch-experimentellen Arbeit zur Untersuchung von Modulationen in der Expression des Apoptose-Rezeptors Fas (Apo-1, CD95) und seines Liganden Fas Ligand (FasL, Apo-1L) beim Ösophaguskarzinom und deren Einfluss auf die Tumorprogression und Prognose der Patienten. Nach Einarbeitung in die Thematik und Methodik dieses Projektes erlernte ich die Präparation und Konservierung von Gewebeproben, die Anfertigung von Gewebeschnitten und die Durchführung von verschiedenen immunhistochemischen Färbeverfahren (ABC-, APPAP- und TUNEL-Technik). Zu meinen Aufgaben gehörte die Entwicklung eines individuellen Färbeverfahrens zur Darstellung der beiden Oberflächenmoleküle, die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, die histologische Beurteilung der Schnittpräparate und die statistische Analyse der Färbeergebnisse in Korrelation mit etablierten histopathologischen Parametern, isolierten Tumorzellen in Lymphknoten und Nachuntersuchungsdaten der Patienten.

Das Studium der Humanmedizin schloss ich im November 2001 mit dem bestandenen Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Hamburg ab.

## **Erklärung**

Diese Arbeit wurde von Juli 1998 bis Februar 2002 in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Priv. Doz. Dr. S.B. Hosch durchgeführt.

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung der Promotion beworben habe.

## Publikationen

### Kongresspublikationen

Scheunemann P., Hosch S.B., Sudmann S., Stoecklein N., Knoefel W.T., Izbicki J.R.

Down-regulation of FAS (Apo-1/CD95) seems to promote metastasis in esophageal cancer.

Forumsband des 118. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München (2001)

### Vorträge

Scheunemann P., Hosch S.B., Sudmann S., Stoecklein N., Knoefel W.T., Izbicki J.R.

Die Down-Regulation von FAS (Apo-1/CD95) begünstigt die Metastasierung beim Ösophaguskarzinom.

118. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München (2001)

Scheunemann P., Hosch S.B., Sudmann S., Stoecklein N., Knoefel W.T., Izbicki J.R.

Down-Regulation of FAS (Apo-1/CD95) seems to promote metastasis in esophageal cancer.

Digestive Disease Week

Atlanta, GA, 01-05.05.2001