

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki

Untersuchung des Zelloberflächenmoleküles Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) als prognostischer Marker beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Lea Struck
aus Hamburg

Hamburg, 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.07.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Bockhorn

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. L. Fischer

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	6
1.1	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	6
1.2	DAS PANKREAS.....	7
1.3	DAS PANKREASKARZINOM	8
1.3.1	ÄTIOLOGIE.....	10
1.3.2	PATHOGENESE	11
1.3.3	DIAGNOSTIK.....	11
1.3.4	TUMORKLASSIFIKATION	15
1.3.5	THERAPIE UND PROGNOSE.....	17
1.4	DAS EPITHELIALE ZELLADHÄSIONSMOLEKÜL (EPCAM)	20
1.4.1	CAMs	20
1.4.2	EPCAM	22
1.4.3	DAS EPCAM-GEN.....	22
1.4.4	DAS EPCAM-PROTEIN.....	24
1.4.5	FUNKTION VON EPCAM.....	27
1.4.6	EXPRESSION VON EPCAM.....	31
1.4.7	EXPRESSION VON EPCAM IN TUMOREN.....	32
1.4.8	EXPRESSION VON EPCAM IM PANKREASGEWEBE.....	33
1.4.9	EXPRESSION VON EPCAM UND PROGNOSE VON KREBSPATIENTEN	34
2	MATERIAL UND METHODEN	37
2.1	MATERIAL.....	37
2.1.1	REAGENZIEEN UND KITS:	37
2.1.2	ANSÄTZE UND PUFFER.....	38
2.1.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	38
2.1.4	GERÄTE.....	39
2.2	METHODEN	40
2.2.1	PATIENTENKOLLEKTIV	40
2.2.2	AUFBEREITUNG DER SERUMPROBEN.....	41
2.2.3	ELISA.....	41
2.2.4	VORBEREITUNG DER 96-WEEL-ELISA-PLATTEN.....	42
2.2.5	VORBEREITUNG DER SERUMPROBEN.....	42

2.2.6	<i>VORBEREITUNG DES EPCAM-STANDARDS</i>	42
2.2.7	<i>BEIMPFUNG DER ELISA-PLATTEN</i>	45
2.2.8	<i>MESSUNG DES GEBUNDENEN EPCAM-GEHALTES</i>	46
2.2.9	<i>STATISTISCHE ANALYSE</i>	46
3	ERGEBNISSE	48
3.1	VERGLEICH DER EPCAM-SERUMLEVEL	48
3.2	SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT VON EPCAM.....	49
3.3	KORRELATION VON EPCAM-SERUMLEVEL UND KLINISCH-PATHOLOGISCHEN MERKMALEN51	
3.4	EPCAM-SERUMLEVEL UND GESAMTÜBERLEBEN.....	53
4	DISKUSSION	55
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	74
7	LITERATURVERZEICHNIS	77
8	DANKSAGUNG	86
9	LEBENS LAUF	87
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	88

1 EINLEITUNG

1.1 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Pankreaskarzinom ist nach dem Kolon- und Magenkarzinom der dritthäufigste Tumor des Gastrointestinaltraktes, mit einer steigenden Inzidenz. Es hat dabei besonders aufgrund der späten Diagnosestellung eine sehr schlechte Prognose, welche mit einer 5-Jahresüberlebensrate von unter 5% einhergeht.

Zur mangelnden Früherkennung und somit Therapierbarkeit trägt neben den spät auftretenden Symptomen auch das Fehlen eines geeigneten Tumormarkers bei. Die bisher bekannten Tumormarker CA 19-9 und CEA sind in der Genauigkeit zur Diagnosestellung unzureichend und dienen bislang ausschließlich zur Verlaufskontrolle nach Behandlungsbeginn.

Das Zell-Adhäsions-Molekül EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) ist aktuell Mittelpunkt vieler Studien. Beim Adenokarzinom des Pankreas konnte mittels immunohistochemischer Untersuchungen eine erhöhte Expression von EpCAM im malignen Gewebe festgestellt werden, wohingegen die Expression in gesundem Gewebe sehr gering ist. Die physiologische Funktion von EpCAM ist bisher weitgehend ungeklärt, Untersuchungen bezüglich einer notwendigen Expression für Zell-Zell-Interaktionen konnten bislang nicht bestätigt werden.

In dieser Arbeit wird der Stellenwert von EpCAM als Serummarker bezüglich des Vorhandenseins eines Pankreaskarzinoms und zur Unterscheidung von Patienten mit chronischer Pankreatitis und gesunden Blutspendern untersucht. Zusätzlich wird geprüft, inwieweit erhöhte EpCAM-Konzentrationen als prognostische Marker im Hinblick auf das Gesamtüberleben beim Pankreaskarzinom eine Rolle spielen.

Die Bestimmung der EpCAM-Serumlevel erfolgt an bereits akquirierten, kryokonservierten Serumproben von 66 Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas und von 43 Patienten mit chronischer Pankreatitis, deren Diagnose postoperativ histopathologisch bestätigt wurde und deren klinische

follow-up Daten in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf vorliegen. Des Weiteren werden 104 Proben gesunder Blutspender aus dem Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf untersucht, welche als Vergleichsgruppe dienen. Die Versuche werden mittels eines Sandwich-ELISA eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (R&D Systems, Minneapolis, USA) durchgeführt.

1.2 DAS PANKREAS

Die Bauchspeicheldrüse, das Pankreas, ist eine etwa 15-20 cm lange Drüse mit einem Gewicht von 40-120 g (Durchschnitt: 70 g) und befindet sich im mittleren bzw. linken Oberbauch (Drenckhahn D, 2004). Es entwickelt sich aus einer dorsalen und einer ventralen Pankreasanlage mit jeweiligem Ausführungsgang, welche dem Endoderm der Duodenalanlage entstammen und sich um die 6.-7. Embryonalwoche vereinen. Durch das starke Wachstum des Mesogastrium dorsale und die Drehung des Magens in der embryonalen Entwicklung kommt es schließlich sekundär retroperitoneal zu liegen. Zwischen den Zellanlagen der Gangepithelien des exokrinen Pankreas bilden sich ab der 7. Embryonalwoche endokrine Zellen, welche als strangförmige Gebilde aus den exokrinen Gängen auswandern und im weiteren Verlauf zu den Langerhansschen Zellen differenzieren.

Makroskopisch wird das Pankreas in Caput, Corpus und Cauda unterteilt, welche jeweils sowohl exokrine, als auch endokrine Anteile enthalten. Der Hauptausführungsgang, der Ductus pancreaticus (Wirsung), ist etwa 3-5 mm dick und verläuft nahe der Hinterfläche des Pankreas über dessen gesamte Länge. In der Mehrzahl der Fälle vereinigt er sich mit dem Ductus choledochus und mündet gemeinsam mit diesem auf der Papilla duodeni major (Vateri) in die Pars descendens des Duodenum. Seltener münden beide Gänge auf unterschiedlichen Papillen, diese können dann bis zu 2 cm auseinander liegen. In etwa zwei Drittel der Fälle lässt sich außerdem ein akzessorischer Ductus pancreaticus (Santorini) finden, welcher den ehemaligen Ausführungsgang der dorsalen Anlage darstellt, und etwa 2 cm oberhalb der Papilla duodeni major, auf der Papilla duodeni minor, mündet.

Das Pankreas ist die wichtigste Verdauungsdrüse des Körpers und besteht aus exokrinem Drüsengewebe, in welches endokrine Zellgruppen (Langerhanssche Inseln) eingelagert sind. Der ekkrine, seröse Anteil setzt sich aus mehreren tausend Läppchen zusammen, welche durch schmale Bindegewebssepten voneinander getrennt werden. Sie sind mit bloßem Auge sichtbar (Durchmesser etwa 1-3 mm) und bestehen aus jeweils mehreren hundert Drüsenendstücken (Azini). Hier werden täglich etwa 1,5-2 l Pankreassekret gebildet, welches verschiedene Verdauungsenzyme enthält und durch seinen hohen Bicarbonatgehalt alkalisch ist. Die Azinuszellen bilden die Verdauungsenzyme, welche hauptsächlich als Zymogene, also inaktive Vorstufen, sezerniert werden. Die Zellen der kleinen Gänge bilden Bikarbonat, so dass das Pankreassekret schließlich einen pH-Wert von etwa 8 hat. Zudem gelangen etwa 95% des Sekretvolumens als Wasser über parazellulären Transport aus den Blutgefäßen in das Drüsenlumen. Voraussetzung hierfür ist die aktive Sekretion von Cl^- -Ionen. Stimuliert wird die Sekretion des Pankreas vor allem durch die Hormone Sekretin, Cholecystokinin und Gastrin, welche von endokrinen Zellen des Magens und des Duodenums gebildet werden, sowie durch parasymphatische Nervenendigungen des Vagus (Acetylcholin). Der endokrine Anteil des Pankreas besteht aus etwa 1 Million Langerhansschen Inseln und macht etwa 2% des Pankreasvolumens aus. Die Hauptfunktion der Inselzellen liegt in der Regulation des Glukosestoffwechsels. Sie setzen sich zusammen aus A-Zellen, welche Glucagon bilden, B-Zellen, welche Insulin produzieren, D-Zellen, welche Somatostatin bilden, und schließlich den PP-Zellen, welche das pankreatische Polypeptid (PP) bilden. Während Glucagon den Blutzucker hebt, wird er durch Insulin gesenkt. PP erhöht die Darmmotilität und Somatostatin hemmt vor allem die Glucagonfreisetzung (Drenckhahn D, 2004).

1.3 DAS PANKREASKARZINOM

Das Pankreas-Karzinom ist nach dem Kolon- und Magen-Karzinom der dritthäufigste Tumor des Gastrointestinaltraktes, dessen Inzidenz besonders in den westlichen Ländern kontinuierlich ansteigt (Adler et al., 2007). In Deutschland erkranken etwa

13.000 Menschen jährlich an einem Pankreaskarzinom. Das mittlere Erkrankungsalter liegt dabei für Männer bei 67 Jahren und für Frauen bei 74 Jahren; somit ist das Pankreaskarzinom ein Tumor des älteren Menschen (Adler et al., 2007).

Etwa 95% der Pankreaskarzinome entwickeln sich aus dem exokrinen Anteil des Pankreas, einschließlich des duktales Epithels, des Bindegewebes, der Azinuszellen und des lymphatischen Gewebes (Saif, 2011). Die histologisch verschiedenen Typen der exokrinen Pankreastumoren nach WHO-Klassifikation von 1996 sind in Tabelle 1 dargestellt. Zudem lassen sich drei Grundtypen unterscheiden: das duktales Adenokarzinom, welches mehr als 90% der Pankreaskarzinome ausmacht, die seltenen neuroendokrinen Tumore und zystische Neoplasien (Saif, 2011). Etwa 75% der Pankreaskarzinome befinden sich im Pankreaskopf, 15-20% im Corpus und 5-10% im Pankreasschwanz (Saif, 2011).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der exokrinen Pankreastumoren von 1996 (Klöppel G., 1996)

Benigne Tumoren	Seröses Zystadenom Muzinöses Zystadenom Intraduktal papillär muzinöses Adenom Reifes Teratom
Borderline Tumoren	Muzinöses Zystadenom mit mäßiger Dysplasie Intraduktal papillär muzinöser Tumor mit mäßiger Dysplasie Solid-pseudopapillärer Tumor
Maligne Tumoren	Schwere duktales Dysplasie – carcinoma in situ Duktales Adenokarzinom Muzinöses nichtzystisches Karzinom Adenosquamöses Karzinom Anaplastisches Karzinom Gemischt duktales-endokrines Karzinom Osteoklastenähnlicher Riesenzelltumor Seröses Zystadenokarzinom Muzinöses Zystadenokarzinom (nichtinvasiv/invasiv) Intraduktal papillär muzinöses Karzinom (nichtinvasiv/invasiv) Azinuszellkarzinom Azinuszellzystadenokarzinom Gemischt azinär-endokrines Karzinom Pankreatoblastom Solid-pseudopapilläres Karzinom

1.3.1 ÄTIOLOGIE

Die Ätiologie des duktales Adenokarzinoms und anderer exokriner Pankreastumore ist bisher weitgehend ungeklärt. Als mögliche Risikofaktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms werden jedoch seit vielen Jahren Ernährung, Lebensgewohnheiten und berufliche Exposition diskutiert. Spezifische Diättempfehlungen zur Reduktion des Pankreaskarzinomrisikos konnten bisher nicht eruiert werden, jedoch geben Studien Hinweise, dass ein sehr hoher Alkoholkonsum mit einem erhöhten Pankreaskarzinomrisiko assoziiert sein könnte, während zwischen moderatem Alkoholkonsum und Pankreaskarzinomrisiko bisher kein Zusammenhang gezeigt werden konnte (Brown, 2005; Talamini et al., 1999; Adler et al., 2007). Des Weiteren zeigten Studien, dass sich in verschiedenen untersuchten Populationen mit Adipositas (BMI > 30) ein erhöhtes Pankreaskarzinomrisiko finden lässt (Patel et al., 2005). Auch Tabakkonsum scheint, abhängig von individuellen genetischen Faktoren, das Risiko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms zu erhöhen (Talamini et al., 1999; Duell et al., 2002). Ebenso stehen Pestizide, Herbizide und Fungizide im Verdacht, das Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms zu steigern (Adler et al., 2007).

Zudem konnten einige Risikogruppen mit erhöhter genetischer Disposition für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms identifiziert werden. So haben Patienten mit Peutz-Jeghers Syndrom mit einem Lebenszeitrisiko von 36 – 42% gegenüber der Durchschnittsbevölkerung etwa ein 132-fach erhöhtes Risiko für ein Pankreaskarzinom (Canto, 2007). Die häufigsten mit dem Pankreaskarzinom assoziierten Mutationen sind die Keimbahnmutationen in BRCA2 (breast cancer gene 2) und BRCA1 (breast cancer gene 1). Diese Patienten mit hereditärem Mamma- und Ovarialkarzinom scheinen ein um zwei- bis sechsfach erhöhtes Risiko zu haben, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (Buxbaum und Eloubeidi, 2010). Hinzu kommen Keimbahnmutationen mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung eines Pankreaskarzinoms, zu denen die FAMMM (familiäre atypische multiple Muttermal oder Melanom Syndrom) und das Ataxia Telangiektasie Syndrom zählen (Brand et al., 2007; Whitcomb und Pogue-Geile, 2002). Für Verwandte ersten Grades eines Patienten mit einem Pankreaskarzinom wird das Risiko als etwa

zweifach erhöht angenommen, bei Erkrankungsalter unter 60 Jahre sogar etwa dreifach (McWilliams et al., 2005).

Neben genetischen Prädispositionen scheinen auch Patienten mit langjähriger chronischer Pankreatitis ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms zu haben. Verschiedene Studien zeigten dabei variable relative Risiken von 2,3 bis 18,5, wobei die kumulative Inzidenz nach 20 Jahren mit etwa 4% angegeben wird (Adler et al., 2007).

1.3.2 PATHOGENESE

Pathogenetisch lassen sich wie bei anderen malignen epithelialen Tumoren auch beim Pankreaskarzinom Vorläuferstadien eines Tumors finden. Die Tumorprogression vom Normalgewebe über präneoplastische Gangläsionen zum duktalem Adenokarzinom wird dabei durch eine Akkumulation verschiedener Genmutationen verursacht (Hruban et al., 2004). Zu den Genmutationen zählen unter anderem die Aktivierung des Onkogens K-ras, sowie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie etwa p53, p16 und dpc4. Dabei verläuft die Progression des duktalem Pankreaskarzinoms über pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanINs). Diese lassen sich anhand ihrer Morphologie unterscheiden. So kommt es über eine muzinöse Gangzellhyperthrophie (PanIN1A) zu einer duktalem papillären Hyperplasie (=DPH, PanIN1B) und weiterhin über die DPH mit mäßiger intraepithelialer Neoplasie (=IEN, PanIN2) zu einer schweren duktalem intraepithelialen Neoplasie (PanIN3), welche den entscheidenden Schritt in die Karzinogenese zu kennzeichnen scheint und ein hohes Malignitätspotential besitzt (Hruban et al., 2004).

1.3.3 DIAGNOSTIK

Aufgrund häufig erst spät auftretender Symptome und Fehlen sensitiver und spezifischer Marker wird die Mehrzahl der Pankreaskarzinome erst in Stadien diagnostiziert, in denen keine Therapieoptionen mit kurativer Zielsetzung bestehen. Oftmals hat bereits eine frühe Tumorausbreitung in das peripankreatische Gewebe

mit Infiltration insbesondere der Gallenwege, des Duodenums, sowie Gefäße und Nerven stattgefunden. Zudem beginnt eine lymphogene und hämatogene Metastasierung häufig frühzeitig, mit Fernmetastasen vor allem in der Leber, dem Peritoneum, der Pleura, der Lunge und des Skelettsystems (Adler et al., 2007).

Insbesondere Tumoren im Corpus- oder Schwanz-Bereich rufen häufig erst nach Infiltration umgebender Strukturen Symptome hervor und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (Adler et al., 2007).

Nach den Empfehlungen der aktuellen S3-Leitlinien für das exokrine Pankreaskarzinom von 2007 sollten neu aufgetretene Rücken- und Oberbauchschmerzen, schmerzloser Ikterus sowie eine akute Pankreatitis unklarer Ätiologie ab einem Alter von 50 Jahren zur Abklärung eines möglichen Pankreaskarzinoms führen (Adler et al., 2007). Bisher existiert jedoch keine Literatur, welche hinreichend beantwortet, welche Symptomkonstellationen zu welchen diagnostischen Vorgehensweisen zum Ausschluss eines Pankreaskarzinoms führen sollten. Vorschläge für ein auf Expertenmeinung basiertes verdachtsadaptiertes Vorgehen stellt Tabelle 2 dar.

Tabelle 2: Alters- und verdachtsleveladaptiertes diagnostisches Vorgehen bei neu aufgetretenen Oberbauch- und Rückenschmerzen nach den Empfehlungen der aktuellen S3-Leitlinien für das exokrine Pankreaskarzinom von 2007 (Adler et al., 2007)

Verdachtslevel	Alter (Jahre)	Symptome	Vorgehen
Niedrig	<50	nur Schmerz*	Sonographie bei Symptompersistenz
Mittel	<50	Schmerz plus**	Sonographie, ggf. CT
	>50	nur Schmerz*	Sonographie, ggf. CT
		Schmerz plus**	Sonographie, ggf. CT
Hoch	>50	Schmerz plus	Sonographie, ggf. CT/Endosonographie

* Neu aufgetretene Schmerzen, die lokalisiert/gürtelförmig in den Rücken ausstrahlen und nachts wahrnehmbar sind, bedürfen altersunabhängig individuell einer weiteren Abklärung. Bei hohem Verdachtslevel ggf. auch bei negativer Sonographie komplementär CT oder Endosonographie einsetzen.

** Schmerz plus andere Symptome (Inappetenz, Gewichtsverlust, Schwäche)

Statistisch gesehen ist ein Pankreas- oder Gallengangskarzinom mit 20% die häufigste Ursache für einen neu aufgetretenen schmerzlosen Ikterus bei Patienten im Alter über 60 Jahre (Watanabe et al., 2004). Somit sollte ein neu aufgetretener schmerzloser Ikterus in diesem Alter diagnostische Untersuchungen auf ein Pankreaskarzinom nach sich ziehen (Adler et al., 2007).

Weitere mögliche Symptome eines Pankreaskarzinoms sind anhaltender Gewichtsverlust, Neigung zu rezidivierenden Thrombophlebitiden, als paraneoplastisches Syndrom, und allgemeine Schwäche. Symptome wie ein Verschlussikterus, insbesondere bei Tumoren im Kopfbereich, Gewichtsverlust, rezidivierende Thrombophlebitiden und Rückenschmerzen weisen meist auf einen bereits fortgeschrittenen Befund hin. Bis zum Zeitpunkt der Diagnosestellung finden sich so in den meisten Fällen bereits Lymphknotenmetastasen (Adler et al., 2007).

Zur Diagnostik eines Pankreaskarzinoms stehen heute verschiedene apparative Methoden zur Verfügung. Zur Klärung eines Tumorverdachts wird in der Regel

zunächst eine Oberbauchsonographie durchgeführt. Diese ermöglicht gegebenenfalls bereits die Verdachtsdiagnose eines Pankreaskarzinoms und kann Hinweise auf eventuell vorliegende Metastasen geben (Adler et al., 2007). Periphere Aufstauungen des Gallenganges, Konturunregelmäßigkeiten der Organbegrenzung und inhomogene Schallechos können auf einen Tumor hindeuten. Weitere Mittel der Wahl stellen die Endosonographie, die Multidetektor-CT-Untersuchung, die MRT in Kombination mit der MRCP, sowie die ERCP da (Adler et al., 2007). Laut den aktuellen S3-Leitlinien für das Exokrine Pankreaskarzinom von 2007 sind die CT und die MRT in Kombination mit der MRCP die beiden sensitivsten Verfahren zur Detektion eines Pankreaskarzinoms. Abhängig von der Erfahrung des Untersuchers erreicht die Endosonographie jedoch zum Teil sogar eine noch höhere Sensitivität (Adler et al., 2007). Die konventionelle Computertomographie hat eine Sensitivität von etwa 90% zur Erkennung eines Pankreaskarzinoms und einer Genauigkeit von 80-90% für das Staging, wobei diese Diagnostik bei sehr kleinen Tumoren und eventuellem Vorliegen von Lebermetastasen, einer Peritonealkarzinose oder beginnender Gefäßinfiltration in ihrer Genauigkeit eingeschränkt sein kann (Schima et al., 2007). Hier bietet die Multidetektionscomputertomographie (MD-CT) durch die Möglichkeit der dreidimensionalen Darstellbarkeit von potenziellen Gefäßbeteiligungen einen Vorteil und erscheint gleichwertig zur MRT mit MRCP in der Erkennung eines Pankreaskarzinoms. Bei nicht eindeutigem MD-CT kann die MRT mit MRCP hier zur Abgrenzung eines entzündlichen Pseudotumors, Abszessen oder zystischen Tumoren dienen. Mit Hilfe der Endosonographie können mit einer Sensitivität von bis zu 98% auch kleine Tumoren identifiziert werden (Schima et al., 2007).

Diagnostisch nicht wegweisend sind die aktuell verfügbaren Laborparameter. Durch Pankreasgangobstruktionen können gelegentlich Parameter einer akuten Pankreatitis sowie eine Hyperamylasämie nachgewiesen werden. Bei fortgeschrittenen Tumoren lassen sich teilweise auch erhöhte Werte der Tumormarker CA 19-9 und CEA nachweisen.

Als bisher am besten etablierter Marker für ein Pankreaskarzinom gilt CA 19-9 (carbohydrate antigen) mit einer Sensitivität von 80% und einer Spezifität von 90% (Steinberg, 1990). Jedoch können positive CA 19-9-Werte auch bei Patienten mit nicht malignen Erkrankungen gemessen werden, wie etwa bei Leberzirrhose, chronischer Pankreatitis, Cholangitis und Tumoren, deren Ursprung in anderen

Bereichen innerhalb des Gastrointestinaltraktes liegen (Duffy et al., 2010). Zudem zeigten in Studien nur 65% der Patienten mit resektablem Pankreaskarzinom erhöhte CA 19-9 Werte (Goggins, 2005). Weiterhin kann CA 19-9 von etwa 4-15% der Bevölkerung, welche negativ für das Lewis-Antigen (a-, b-) sind, nicht gebildet werden (Schlieman et al., 2003).

Am Samsung Medical Center in Südkorea wurde 2004 ein Screening auf CA 19-9 bei 70.940 asymptomatischen Probanden durchgeführt, von denen 1063 erhöhte Werte zeigten. Bei lediglich vier dieser Patienten ließ sich letztendlich ein Pankreaskarzinom nachweisen, von denen zwei Tumore resektabel waren (Kim et al., 2004). Die laborchemische Bestimmung von CA 19-9 ist also zur Erstdiagnose eines Pankreaskarzinoms nicht geeignet und sollte erst bei Nachweis einer Pankreasraumforderung zur Differentialdiagnostik und Verlaufskontrolle durchgeführt werden. Zudem kann ein sehr hoher präoperativer Wert, bei Resektabilität in der Bildgebung, einen Hinweis auf eine höhere Tumorlast geben, als bildmorphologisch angenommen (Forsmark et al., 1994).

Das Carcinoembryonale Antigen CEA wurde erstmals 1965 von Gold et al. beschrieben und ist ein onkofetales Glykoprotein (Gold und Freedman, 1965). Es kommt in der Peripherie von Tumor-Zellmembranen vor, von welcher es in umgebende Körperflüssigkeiten abgegeben wird. CEA scheint eine Rolle in Zell-Adhäsion und der Hemmung der Apoptose unter physiologischen Umständen zu spielen. So wird es in normalen Mukosa-Zellen exprimiert und in Adenokarzinomen des Pankreas, des Kolon, des Magens und anderen über-exprimiert (Schlieman et al., 2003). Die Sensitivität des CEA als Tumormarker für ein Pankreaskarzinom liegt bei etwa 45%, die Spezifität bei 75% (Ni et al., 2005).

1.3.4 TUMORKLASSIFIKATION

Die Einteilung der exokrinen Pankreastumoren entsprechend der verschiedenen histologischen Typen nach WHO-Klassifikation von 1996 ist in Tabelle 1 dargestellt. Darüber hinaus werden die Tumoren eines bestimmten Typs einem histopathologischen Differenzierungs- oder Malignitätsgrad zugeordnet. Hierzu werden Ähnlichkeit mit dem Normalgewebe, Schwere der Zellatypien, Mitosegehalt, Zellreichtum und andere Kriterien bewertet. Dabei steht Grad 1 für ein hoch

differenziertes Karzinom, Grad 2 entspricht einem mäßig differenzierten und Grad 3 einem wenig oder undifferenzierten Karzinom.

Der am weitesten verbreitete Standard zum Staging exokriner Pankreastumoren ist die TNM-Klassifikation der UICC. Diese Einteilung ist in Tabelle 3 dargestellt und umfasst die Beurteilung des Primärtumors, von Lymphknotenmetastasen und von Fernmetastasen.

Tabelle 3: TNM-Klassifikation der Karzinome des exokrinen Pankreas (nach UICC, 2002)

T - Primärtumor	TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
	T0	Kein Anhalt für Primärtumor
	Tis	Carcinoma in situ
	T1	Tumor auf Pankreas begrenzt, bis max. 2cm in größter Ausdehnung
	T2	Tumor auf Pankreas begrenzt, mehr als 2cm in größter Ausdehnung
	T3	Tumorausdehnung über das Pankreas hinaus, jedoch ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior,
	T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus oder Arteria mesenterica superior
N – regionäre Lymphknoten	NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M - Fernmetastasen	MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen

Weiterhin beschreibt die Residual (R)-Tumorklassifikation nach UICC das Vorhandensein oder Fehlen eines nachweisbaren Residualtumors nach erfolgter Therapie. Die entsprechende Einteilung ist in Tabelle 4 dargestellt. Dabei ist anzumerken, dass sowohl loko-regionäres Tumorgewebe als auch nicht resezierbare Fernmetastasen als Residualtumor gelten. Bei operativer Resektion eines Pankreas-Karzinoms können so primär palliative Eingriffe mit R1- beziehungsweise R2-Resektion von potentiell kurativen Eingriffen mit R0-Resektion unterschieden werden.

Tabelle 4: Residualtumor-Klassifikation der Karzinome des exokrinen Pankreas (nach UICC, 2002)

Rx	Residualtumor kann nicht bestimmt werden
R0	Kein Residualtumor nachweisbar
R1	Residualtumor nur mikroskopisch nachweisbar
R2	Residualtumor makroskopisch erkennbar

1.3.5 THERAPIE UND PROGNOSE

Die Prognosevorhersage und Risikostratifikation für Patienten mit Pankreaskarzinom erfolgt bisher anhand pathologischer Merkmale und ist bis heute nur unzureichend möglich. Mitentscheidend für die Prognose ist die Ermittlung des Tumorstadiums, welches anhand der TNM-Klassifikation der UICC bestimmt werden kann (Tabelle 5). Stadium I beschreibt dabei die geringste Tumorausbreitung, Stadium IV stellt einen weit fortgeschrittenen Tumor mit Fernmetastasen dar. Hier konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und eine Tumorgöße von >2,5 cm zum Operationszeitpunkt die 5-Jahres-Überlebensrate signifikant verschlechtern (Geer und Brennan, 1993; Sohn et al., 2000).

Weiterhin scheint der histopathologische Differenzierungsgrad des Tumors die Prognose der Patienten zu beeinflussen. Grad 1 beispielsweise steht für ein hochdifferenziertes Karzinom und stellt etwa 40 % der Pankreaskarzinome dar. Grad 2 (50 %) entspricht einem mäßig differenzierten und Grad 3 (10 %) einem wenig oder undifferenzierten Karzinom (Klöppel G., 1996). Dabei scheint ein geringer Differenzierungsgrad von 2–3 die Prognose von Patienten mit Pankreaskarzinom negativ zu beeinflussen (Geer und Brennan, 1993; Sohn et al., 2000).

Tabelle 5: Stadieneinteilung der exokrinen Pankreaskarzinome (nach UICC, 2002)

UICC Stadium	TNM-Klassifikation		
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1 – T3	N0	M0
Stadium III	T4	Jedes N	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Die einzige potentiell kurative Therapie für das Pankreaskarzinom ist bisher die radikale chirurgische Resektion des malignen Gewebes unter Einhaltung eines Sicherheitsabstandes. Jedoch haben bislang nur etwa 20% der Patienten zum Diagnosezeitpunkt einen resezierbaren Tumor, welcher auf das Pankreas begrenzt ist, keines der großen umliegenden Gefäße infiltriert oder Fernmetastasen gebildet hat (Saif, 2007). Die späte Diagnosestellung trägt dazu bei, dass nur wenige Patienten mit Pankreaskarzinom noch mit einer kurativen Zielsetzung durch eine radikale Resektion des Tumorgewebes behandelt werden können.

Abbildung 1 zeigt die 5-Jahres-Überlebensraten der Patienten mit Pankreaskarzinom für die verschiedenen Stadien zum Diagnosezeitpunkt von 1999 bis 2005 in den USA. Es zeigte sich, dass die Gesamt-5-Jahres-Überlebensrate bei etwa 5% lag, während Patienten, bei denen ein Pankreaskarzinom in frühen Stadien erkannt wurde und bei denen der Tumor das Pankreas nicht überschritten hatte, eine postoperative 5-Jahres-Überlebensrate von 22% erreichten (Jemal et al., 2012).

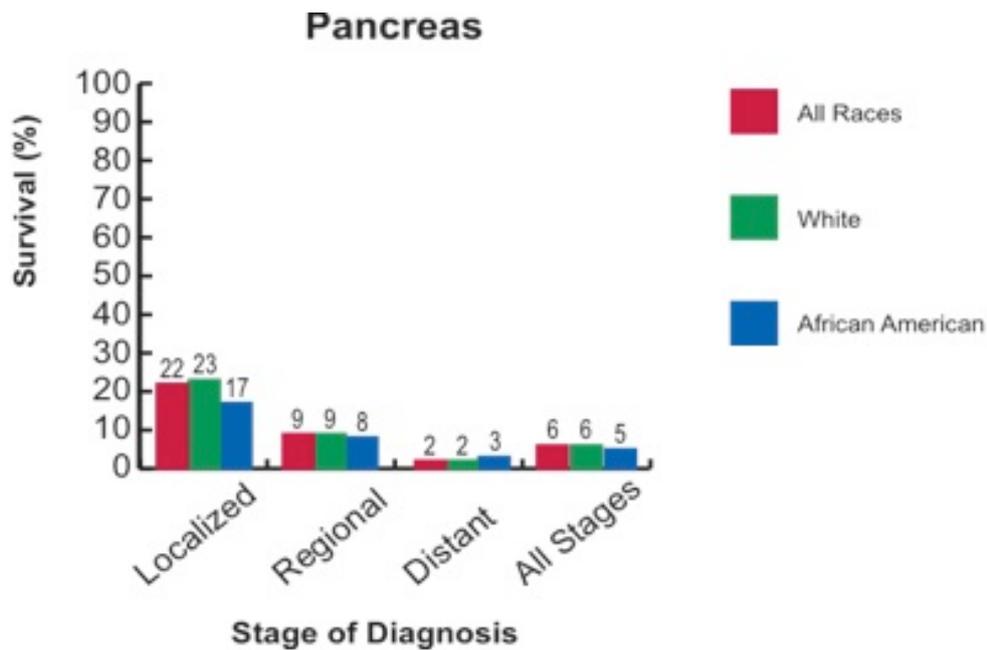


Abbildung 1: 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit Pankreaskarzinom in unterschiedlichen ethnischen Gruppen und mit unterschiedlichen Tumorstadien zum Diagnosezeitpunkt, USA, 1999 bis 2005 (Jemal et al., 2012)

Ein Therapieversagen nach Tumorresektion ist dabei am häufigsten auf lokale Rezidive, Fernmetastasen oder beide zurückzuführen und tritt meist innerhalb der ersten zwei postoperativen Jahre auf (Griffin et al., 1990). Die operative R0-Resektion des Tumors reduziert hierbei das Risiko von Lokalrezidiven und verbessert die Prognose der Patienten (Geer und Brennan, 1993).

Eine 2004 veröffentlichte randomisierte Studie mit 289 Patienten der European Study Group for Pancreatic Cancer zeigte zudem einen signifikanten Überlebensvorteil für Patienten, welche mit einer adjuvanten Chemotherapie behandelt wurden (Neoptolemos et al., 2004). Der Einsatz einer adjuvanten Radio-Chemo-Therapie zeigte dagegen keinen prognostischen Vorteil (Neoptolemos et al., 2004). Eine weitere vergleichende Studie von 2007 an 386 Patienten von Oettle et al. untersuchte die Auswirkung einer adjuvanten Chemotherapie mit Gemcitabine auf das Rezidiv-freie Überleben von Patienten mit Pankreaskarzinom, welche einer Tumorresektion mit kurativer Zielsetzung unterzogen wurden (Oettle et al., 2007). Dabei lag das mediane Rezidiv-freie Überleben in der Gruppe der Lymphknoten-negativen Patienten innerhalb der Kontrollgruppe bei 12 Monaten, während das mediane Rezidiv-freie Überleben in der Hochrisikogruppe mit R1-Resektion bei 18,5

Monaten lag, wenn diese mit Gemcitabine behandelt wurden (Oettle et al., 2007). Somit wird deutlich, dass es sich beim Pankreaskarzinom bereits in vermeintlich frühen Stadien um eine systemische Erkrankung handelt (Oettle et al., 2007).

Auch im Falle zunächst irresektabler fortgeschrittener Tumoren, ohne Metastasierung, kann in einigen Fällen durch eine neoadjuvante, d.h. vor der Operation durchgeführte, Radio-Chemo-Therapie eine kurative Resektion angestrebt werden (Bohmig und Rosewicz, 2004).

Bei Vorliegen von Fernmetastasen und inoperablen Pankreaskarzinomen wird im Rahmen einer Palliativtherapie meist eine Kombination aus Radio- und Chemotherapie eingesetzt (Bohmig und Rosewicz, 2004). Weiterhin kommen operative palliative Therapieoptionen in Frage, wie etwa die Anlage einer biliodigestiven Anastomose bei Vorliegen eines Ikterus oder die Anlage einer Gastroenterostomie bei Magenausgangsstenose (Bohmig und Rosewicz, 2004). Jedoch kann die Überlebenszeit bei all diesen Therapieverfahren nur in geringem Maße verbessert werden. Bei den Patienten, die lediglich palliativ behandelt werden können, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 2% (Jemal et al., 2012).

Das Pankreaskarzinom hat somit die schlechteste Prognose aller gastrointestinalen Tumore (Jemal et al., 2012). 2010 wurden in den USA etwa 43.140 Neuerkrankungen und 36.800 Todesfälle als Folge eines Pankreaskarzinoms gezählt. Somit ist das Pankreaskarzinom zwar nur die zehnt-häufigste aller bösartigen Tumorerkrankungen des Menschen, belegt jedoch mit 6% Platz vier der häufigsten Tumor-assoziierten Todesfälle unter Männern und Frauen (Jemal et al., 2012; Saif, 2011).

1.4 DAS EPITHELIALE ZELLADHÄSIONSMOLEKÜL (EPCAM)

1.4.1 CAMs

Zell-Adhäsions-Moleküle (CAMs) spielen eine wichtige Rolle in Geweben und sind an vielen unterschiedlichen Prozessen innerhalb der Zelle, aber auch der Zell-Zell-Kommunikation im Zellverband beteiligt. Sie vermitteln wichtige Zell-Zell-Kontakte, Zell-Matrix-Kontakte und sind beteiligt an Prozessen des Zell-Zyklus, der Zell-

Migration, sowie der Gewebereparatur und –Entwicklung (Okegawa et al., 2004). Zudem sind sie in verschiedene Pathologien involviert, wie zum Beispiel Karzinome, Infektionen und Autoimmunerkrankungen (Okegawa et al., 2004). Bisher wurden vier urbildliche CAM-Gruppen identifiziert: Die Cadherine, die Selektine, die Integrine und die Immunglobulin (Ig) CAM-Superfamilie (Balzar et al., 1999b).

Proteine der Cadherin–Familie sind Kalzium-abhängige Glykoproteine, welche eine extrazelluläre Domäne mit drei bis fünf inneren Wiederholungen, eine Transmembran-Domäne und eine intrazelluläre Domäne besitzen (Okegawa et al., 2004).

Die extrazelluläre Domäne der Selektine besteht aus einer Kalzium-abhängigen Lektin-Domäne, einer EGF-ähnlichen Domäne (epidermal growth faktor-like) und zwei bis neun Konsensus-Wiederholungen (Petruzzelli et al., 1999). Zudem besitzen sie eine hydrophobe Transmembran-Domäne und einen kurzen zytoplasmatischen Rest (Petruzzelli et al., 1999).

Integrine setzen sich aus zwei Transmembran-Untereinheiten zusammen, welche mit α und β bezeichnet werden und intra- und extrazelluläre Proteine binden (Maheshwari et al., 2000). Die spezielle Zusammensetzung von α - und β -Untereinheiten bestimmt hierbei die Spezifität für extrazelluläre Liganden und somit die intrazellulären Signalkaskaden (Maheshwari et al., 2000). Die Integrin-Familie stellt daher die Haupt-Rezeptorfamilie für die Interaktion mit der extrazellulären Matrix da.

Proteine der Ig-CAMs sind kalzium-unabhängige CAMs, deren extrazelluläre Domäne aus vier bis sechs Ig-ähnlichen Wiederholungen besteht, welche sich zu einer Liganden-Bindungs-Domäne zusammensetzen (Okegawa et al., 2004). Zudem besitzen sie bis zu fünf Fibronectin-ähnliche Wiederholungen und jeweils eine Transmembran- und intrazelluläre Domäne (Okegawa et al., 2004).

Zusätzlich existieren einige CAMs, welche sich bisher nicht eindeutig einer dieser Gruppen zuordnen lassen. Zu ihren prominenten Beispielen zählt auch EpCAM. Strukturell lässt sich EpCAM keiner der vier CAM-Gruppen zuordnen (Balzar et al., 1999b). Im Vergleich zu den ausgedehnten Expressions-Mustern der meisten anderen CAMs, ist die Expression von EpCAM auf epitheliale Zellen beschränkt. Aufgrund der Beobachtung, dass EpCAM Zell-Zell-Kontakte vermittelt, wurde zunächst angenommen, dass EpCAM ein Ca^{2+} -unabhängiges homophiles Zell-Adhäsions-Molekül ist (Litvinov et al., 1997). Die molekulare Untersuchung der von

EpCAM vermittelten Adhäsion zeigte dabei bisher keine interzellulären Kontakte, welche denen klassischer CAMs entsprechen. In Bereichen der Zellmembran, in denen keine Desmosomen oder E-Cadherin vermittelten Adhärens-Junktionen vorkommen, scheint EpCAM in der Lage zu sein, die Zellmembranen angrenzender Zellen in unmittelbare Nähe zueinander zu bringen (Balzar et al., 1999a). Daher scheint EpCAM eine andere Art der Zell-Adhäsion zu vermitteln als die interzellulären Junktionen, welche von typischen CAMs wie beispielsweise den klassischen Cadherinen vermittelt werden (Balzar et al., 1999b).

1.4.2 EpCAM

Das epitheliale Zell-Adhäsions-Molekül (EpCAM) ist ein Typ I transmembranöses Glykoprotein, welches erstmals 1979 von Koprowski et al. als tumor-assoziiertes Antigen in Tumoren epithelialen Ursprunges beschrieben wurde (Koprowski et al., 1979).

Viele Arbeitsgruppen konnten unterschiedliche Funktionen von EpCAM aufzeigen, welche sich nicht lediglich auf Zell-Adhäsion beschränken, sondern ähnlich wie andere CAMs zahlreiche Prozesse der Signaltransduktion, Zell-Migration, Proliferation und Differenzierung umfassen.

Während EpCAM im gesunden Gewebe in geringem Maße exprimiert wird, findet sich vor allem in malignen epithelialen Geweben eine deutliche Überexpression von EpCAM. Viele Tumoren sind also EpCAM-positiv, wodurch sich EpCAM in den letzten Jahren zum Mittelpunkt vieler Studien entwickelt hat, insbesondere in der spezifischen Antikörper-Tumorthherapie (Ruf et al., 2007; Heiss et al., 2010).

1.4.3 DAS EPCAM-GEN

Das EpCAM-Gen, auch als KSA, 17-1A, epitheliales Glykoprotein EGP40 und weitere in der Literatur zu finden, gehört zur Genfamilie GA-733, welche zwei Typ I-Transmembranproteine umfasst: EpCAM und Trop-2 (Epitheliales Glykoprotein 1) (Szala et al., 1990). Dabei beträgt die Aminosäuren-Sequenzhomologie von EpCAM und Trop-2 49% (Szala et al., 1990).

EpCAM wird durch das Gen GA733-2 kodiert, welches sich auf Chromosom 4 befindet (Linnenbach et al., 1993). Das Gen GA733-2 wurde kartiert; sein Lokus befindet sich in der chromosomalen Region 4q, mit einer geschätzten Größe von 14 kb. Bei Betrachtung der mutmaßlichen Promoter-Region konnten Konsensus-Sequenzen für die Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und AP-1 gefunden werden, jedoch weder TATA, noch CAAT-Elemente (Linnenbach et al., 1993). Durch den Vergleich der genomischen und der cDNA-Sequenz konnten 9 Exons im GA733-2-Gen identifiziert werden. Abbildung 2 zeigt GA733-2 wie es nach Linnenbach et al. beschrieben wurde (Linnenbach et al., 1993).

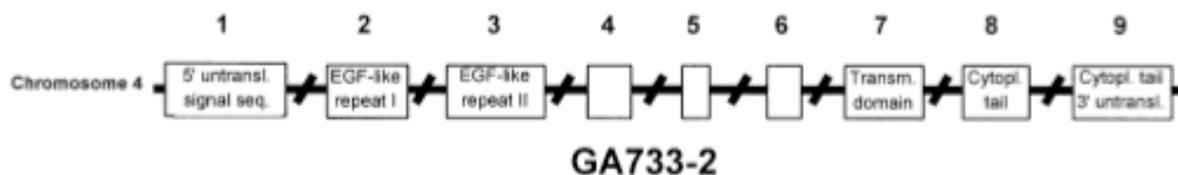


Abbildung 2: Struktur des GA733-2 Gens auf Chromosom 4. Es kodiert für das Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM), ein transmembranöses Glykoprotein, und besteht aus 9 Exons (Linnenbach et al., 1993).

Exon 1 kodiert für eine Aminosäure-Sequenz, welche einer Signal-Peptidsequenz entspricht, während Exon 2 bis Exon 6 die extrazelluläre Domäne von EpCAM codieren. Die Transmembran-Domäne wird durch Exon 7 kodiert. Exon 8 kodiert eine 15 Aminosäuren lange zytoplasmatische Domäne, während Exon 9 weitere zytoplasmatische Aminosäuren, das Stopp-Codon und die 3'-untranslatierte Region enthält.

Die entsprechende transkribierte mRNA von GA733-2 hat eine Größe von etwa 1,5 kb, wobei die ermittelte 5'-untranslatierte Region der mRNA von EpCAM eine Längenvariation von 16 bis 160 Basen zeigt (Simon et al., 1990; Perez und Walker, 1989). Der offene Leserahmen der mRNA entspricht einer Länge von 942 bp. Untersuchungen des 3'-untranslatierten Endes zeigten zwei möglicherweise besonders wichtige Regionen (Perez und Walker, 1989), die vermuten lassen, dass die Expression von EpCAM zu einem großen Teil auf der post-transkriptionellen Ebene reguliert wird. Zum einen findet sich hier eine Basensequenz (ATTTA), welche wahrscheinlich als Signal für die spezifische Degradation der mRNA durch Zytokine,

Lymphokine und einige Proto-Onkogene fungiert (Shaw und Kamen, 1986). Zum anderen erscheint eine zweite Sequenz (TTATTTAT) besonders interessant, da sie als eine Konsensussequenz in der 3'-Region von Entzündungsmediatoren identifiziert wurde (Caput et al., 1986). Zudem scheint für die mRNA kein alternatives Splicing zu existieren, so dass bisher von keiner mRNA, die eine Isoform von EpCAM kodiert, berichtet wurde (Balzar et al., 1999b).

1.4.4 DAS EPCAM-PROTEIN

Der offene Leserahmen von EpCAM kodiert für ein 314 Aminosäuren langes Polypeptid. Dieses besteht aus einer 23 Aminosäuren langen Leader-Sequenz und einer 242 Aminosäuren langen extrazellulären Domäne, welche zwei EGF-ähnliche Wiederholungen (EGF-like) innerhalb des Cystein-reichen Anteils des N-Terminus enthält. Zudem enthält es eine transmembranöse Domäne mit einer Länge von 23 Aminosäuren und einer 26 Aminosäuren langen intrazellulären Domäne (Balzar et al., 1999b).

Die 265 Aminosäuren lange extrazelluläre Domäne beginnt am N-Terminus mit einer Signalsequenz, welche elf hydrophobe Aminosäuren enthält. Zwischen Alanin 23 und Glutamin 24 erfolgt vermutlich der Signal-Peptidase-Verdau (Szala et al., 1990).

Bei der Sequenzanalyse der extrazellulären Domäne von EpCAM zeigte sich, dass die Cystein-reiche Region zwei EGF-ähnliche Wiederholungen beinhaltet, mit den Motiven CX₁CX₈CX₇CX₁CX₁₀C (Position 27 - 59) und CX₃₂CX₁₀CX₅CX₁CX₁₆C (Position 66 - 135), gefolgt von einer Cystein-armen Domäne.

Entsprechend ihrer Struktur und einigen Konsensus-Motiven lassen sich die EGF-ähnlichen Wiederholungen in die drei übergeordneten Gruppen I, II und III unterteilen (Appella et al., 1988). Dabei zeigen die EGF-ähnlichen Wiederholungen von EpCAM die größte Homologie zu Wiederholungen des Typs II und III, welche sich ebenfalls in Molekülen wie Nidogen, EGF-Vorläufer, L-Selektin, dem LDL-Rezeptor und PECAM (Platelet-endothelial cell adhesion molecule) finden lassen (Appella et al., 1988; Davis, 1990).

Die EGF-ähnlichen Domänen von EpCAM zeigen dabei eine große Homologie zu den vierten und fünften EGF-ähnlichen Wiederholungen (Position 776 - 809 und 819 - 889) innerhalb der stabähnlichen (rod-like) Domäne des Proteins Nidogen, eines

Laminin-bindenden extrazellulären Matrixproteins (Mann et al., 1989; Simon et al., 1990). Im Vergleich zur vierten EGF-ähnlichen Wiederholung von Nidogen besitzt die erste EGF-ähnliche Wiederholung von EpCAM keine potentielle β -Hydroxylierungsstelle, was eine Bindung von Ca^{2+} durch EpCAM unwahrscheinlich macht.

Zudem zeigt die zweite EGF-ähnliche Wiederholung von EpCAM Homologien zu der Thyreoglobulin (TY-) -Wiederholung Typ I. Einige Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass es sich bei der zweiten EGF-ähnlichen Wiederholung von EpCAM tatsächlich um eine Thyreoglobulin-Wiederholungsdomäne handelt (Linnenbach et al., 1989; Chong und Speicher, 2001), wobei Thyreoglobulin-Domänen häufig als EGF-ähnliche Domänen verkannt werden (Novinec et al., 2006).

Die Transmembrandomäne von EpCAM umfasst 23 hydrophobe Aminosäuren, an welche sich eine relativ kurze cytoplasmatische Domäne von 26 Aminosäuren anschließt. Die cytoplasmatische Domäne enthält das Internalisierungsmotiv NPXY, welches bereits in anderen Zell-Oberflächenrezeptoren identifiziert wurde, wie etwa dem LDL-Rezeptor und dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Hopkins, 1992). Neben diesem Internalisierungsmotiv enthält die zytoplasmatische Domäne zwei α -Aktinin-Bindungsstellen (Balzar et al., 1998).

Weiterhin besitzt das EpCAM-Molekül drei potentielle Glykosylierungsstellen, an denen Asparagin mit Mannose-Oligosaccharid-Ketten modifiziert werden kann (AS: 74,111,198) (Pauli et al., 2003). Durch Hemmung einer N-Glykosylierung mit Tunicamycin entstehen vor allem EpCAM-Moleküle mit einer Größe von etwa 34 kDa. In den meisten Karzinom-Zelllinien jedoch lassen sich EpCAM-Moleküle mit unterschiedlichem Molekulargewicht detektieren (38, 40, 42 kDa), was darauf hinweist, dass EpCAM in Karzinomen in unterschiedlich N-glykosylierter Form vorliegt (Litvinov et al., 1994). In experimentellen Versuchen mit der Behandlung von EpCAM-positiven Zellen mit dem Inhibitor der O-Glykosylierung O-Glycanase konnte kein Einfluss auf das Molekulargewicht von EpCAM gefunden werden, was eine O-Glykosylierung unwahrscheinlich macht (Thampoe et al., 1988). Ob die unterschiedlich glykosylierten Formen von EpCAM gewebsspezifisch sind oder unterschiedliche Funktionen erfüllen, ist bisher jedoch nicht vollständig bekannt.

Munz et al. identifizierten die Glykosylierung von EpCAM als mögliches Unterscheidungsmerkmal von normalen zu malignen Geweben, da EpCAM im Karzinom-Gewebe hyperglykosyliert vorkam, im autologen normalen Gewebe

jedoch meist nur schwach glykosyliert (Munz et al., 2008). Dabei konnten sie zeigen, dass die N-Glykosylierung von EpCAM am Asparagin 198 in vitro möglicherweise eine Rolle bei der Protein-Stabilität von EpCAM an der Plasmamembran spielt. Mutationen von EpCAM, in denen Asparagin 198 durch Alanin ersetzt wurde, zeigten eine verminderte Allgemein-Expression sowie eine dreifach verringerte Halbwertszeit an der Membran (Munz et al., 2008).

Über die glykosylierten Formen von EpCAM hinaus scheinen noch zwei weitere posttranslational modifizierte Varianten von EpCAM zu existieren. In Pulse-Chase Experimenten konnte gezeigt werden, dass EpCAM zunächst als 34 kDa großes Protein synthetisiert wird und anschließend zu der 38 kDa Form glykosyliert wird. Mit längeren Chase-Perioden entsteht zusätzlich ein 32 kDa EpCAM Protein, welches ein Proteolyse-Produkt des 38 kDa Proteins zu sein scheint (Thampoe et al., 1988). Eine mögliche Restriktionsstelle für Trypsin-verwandte proteolytische Enzyme stellt dabei Arginin an Position 80 dar (Szala et al., 1990). Unter nativen Bedingungen scheinen die beiden Spalt-Fragmente mittels kovalenter Disulfidbrücke verbunden zu sein, da die Zerstörung dieser Bindung unter reduktiven Bedingungen zur Bildung eines 6 kDa und eines 32 kDa großen Fragments führt (Thampoe et al., 1988).

Ferner wurde berichtet, dass EpCAM in vitro als Dimer und Tetramer vorliegt (Trebak et al., 2001). Die Oligomerisierung wird dabei durch die zweite EGF-ähnliche Wiederholung vermittelt (Balzar et al., 2001).

Das alte und das neue Domänen-Modell von EpCAM sind in Abbildung 3 dargestellt.

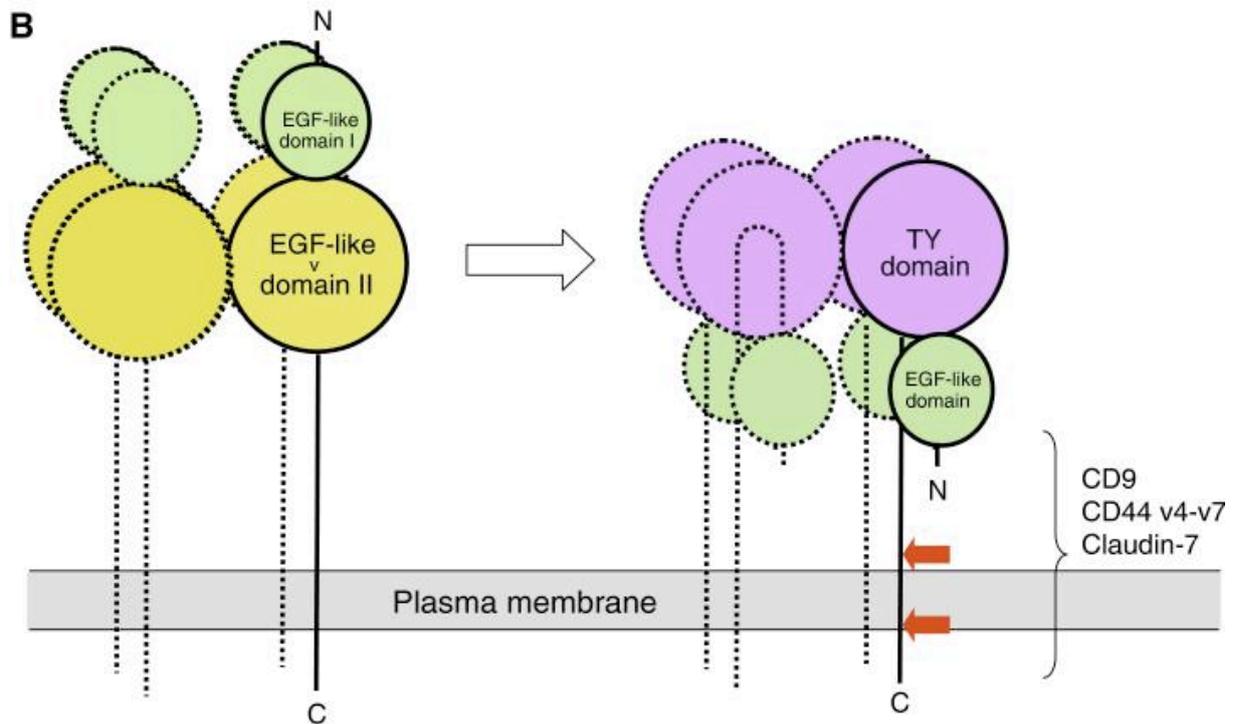


Abbildung 3: Das alte (links) und neue (rechts) Domänen-Modell von EpCAM. EpCAM ist als Tetramer mit drei weiteren Untereinheiten (gepunktete Linien) dargestellt. Die strukturelle Analyse vieler TY-Domänen unterschiedlicher Proteine hat gezeigt, dass die N- und C-Termini häufig nahe beieinander liegen, so dass die Polypeptidkette innerhalb der TY-Domäne gekrümmt dargestellt ist. Des Weiteren sind die möglichen Spaltstellen (rote Pfeile) von EpCAM markiert (Baeuerle und Gires, 2007).

1.4.5 FUNKTION VON EPCAM

Für EpCAM wurden bisher zahlreiche unterschiedliche Funktionen beschrieben. Zunächst wurde es 1994 von Litvinov et al. als Ca^{2+} -unabhängiges homophiles Zell-Adhäsions-Molekül (CAM) beschrieben, welches Zell-Zell-Kontakte mit umliegenden epithelialen Zellen ermöglicht, jedoch lässt sich EpCAM anhand seiner adhäsiven Eigenschaften nicht eindeutig einer CAM-Gruppe zuordnen (Litvinov et al., 1994). Weiterhin ist der durch EpCAM vermittelte Zell-Kontakt im Vergleich zu dem anderer CAMs relativ schwach, so dass seine primäre Rolle in der Aufrechterhaltung von Zellverbänden noch unklar ist (Litvinov et al., 1994). Vielmehr scheint EpCAM eine Rolle in dynamischen Prozessen der Signaltransduktion, Zell-Migration, -Proliferation und -Differenzierung zu spielen.

Vor kurzem wurde EpCAM von Maetzel et al. als ein mögliches Signal-Transduktions-Protein identifiziert: Durch regulierte intramembranöse Proteolyse (RIP) kommt es zum Ablösen der löslichen extrazellulären Domäne von EpCAM (EpEX) und zur nuklearen Translokation der intrazellulären Domäne (EpICD). Die EpEX wird dabei durch das Tumor-Nekrose-Faktor- α -konvertierende-Enzym (TACE) gespalten, während EpICD durch Presenilin-2 (PS-2) gespalten wird. EpICD verbindet sich mit dem Adapter-Protein FHL2 (four and a half LIM domain protein 2), β -Catenin und dem Transkriptionsfaktor Lef-1, welche dann als Transkriptionskomplex die Lef-1 consensus-Sequenz der DNA binden. Wie in Abbildung 4 dargestellt, kann dieser Transkriptionskomplex schließlich die Expression sowohl des Protoonkogens c-myc als auch der Zellzyklus-Proteine Cyclin A und E induzieren (Maetzel et al., 2009). So scheint EpCAM zudem Zellproliferation, Zell-Signalwege und Zellzyklus zu beeinflussen und eventuell onkogene Eigenschaften zu besitzen.

Initiales Signal zur EpCAM-Proteolyse ist möglicherweise eine homophile Aggregation von EpCAM-Molekülen an der Zellmembran und auf gegenüber liegenden Zellen, da EpCAM auf Einzelzellen, welche ohne Zell-Zell-Kontakte vorliegen, meist als intaktes Protein vorkommt (Maetzel et al., 2009). Ob ein weiterer spezifischer Ligand von EpCAM existiert, ist bisher noch nicht bekannt. Durch die Abspaltung von EpEX im Zuge der Aktivierungskaskade von EpCAM entsteht weiterhin ein löslicher Ligand, welcher sowohl autokrin als auch parakrin die Proteolyse weiterer EpCAM-Moleküle zu initiieren scheint (Maetzel et al., 2009).

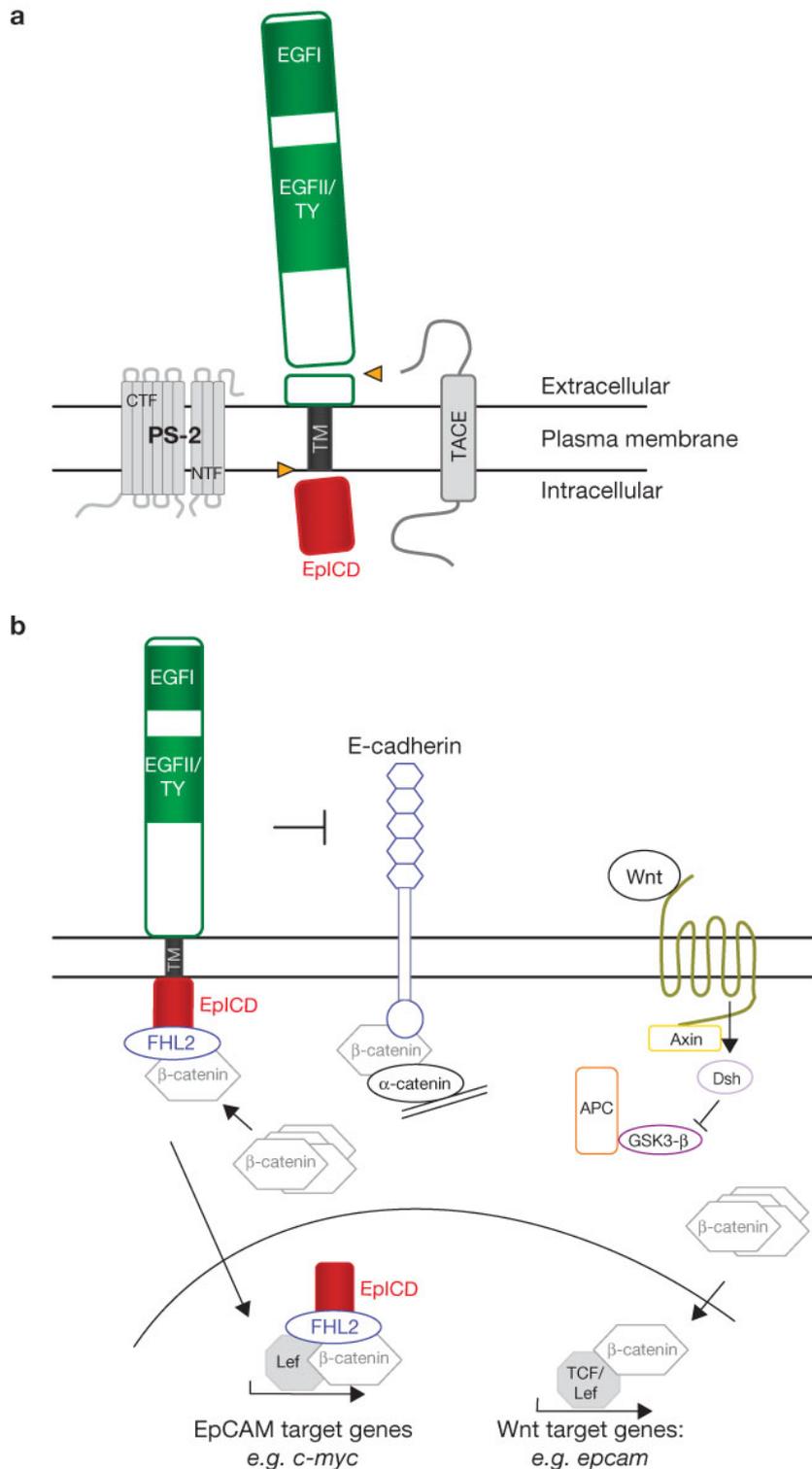


Abbildung 4: Modell des EpCAM-Signalweges nach Maetzel et al. (a) Spaltung von EpCAM durch TACE und PS-2. (b) EpCAM-Signalweg und mögliche Wechselwirkung mit E-Cadherin und den Wnt-Signalwegen. Die EpCAM-Signalwirkung wird durch RIP induziert, wodurch es zur nuklearen Translokation der intrazellulären Domäne (EpICD) kommt. Diese interagiert in einem Komplex mit FHL2 und β -Catenin. Innerhalb des Zellkerns interagiert dieser Komplex mit Lef-1 und bindet an die DNA (Maetzel et al., 2009).

Des Weiteren scheint EpCAM in der Lage zu sein, E-Cadherin-vermittelte Zell-Kontakte aufzulösen, indem es die Bindung zwischen α -Catenin und F-Aktinin stört und somit die Zell-Zell-Adhäsion lockert und die Gewebsständigkeit von Zellen moduliert (Winter et al., 2003). Möglicherweise ist eine Überexpression von EpCAM, wie sie bei vielen Karzinomen typisch ist, ein beteiligter Mechanismus, welcher Zell-Zell-Kontakte stört und so zu Zell-Migration und Metastasenbildung führt.

Zusätzlich scheint die Verbindung von EpCAM mit Claudin-7 die EpCAM vermittelte homophile Zell-Adhäsion zu behindern, und hierdurch sowohl Zell-Motilität, -Proliferation und -Überleben, als auch die Karzinogenese und Metastasen-Formation zu begünstigen (Nubel et al., 2009).

Jedoch werden EpCAM auch Tumor-suppressive Eigenschaften zugerechnet. Anfänglich wurde EpCAM als Zell-Adhäsions-Molekül beschrieben, da EpCAM in der Lage ist, homophile Ca^{2+} -unabhängige interzelluläre Adhäsionen zu vermitteln und hierdurch eventuell Zell-Streuung zu verhindern (Litvinov et al., 1994). Aufgrund der adhäsiven Eigenschaften scheint es möglich, dass EpCAM in einigen Fällen eine Rolle in der Hemmung von invasiven Prozessen spielt (Litvinov et al., 1994). Tatsächlich konnte beim Kolonkarzinom gezeigt werden, dass der Verlust von EpCAM zu einem erhöhten Migrations-Potential führt (Gosens et al., 2007). Des Weiteren ergab die Studie von Basak et al. Hinweise auf eine protektive Rolle von EpCAM in der Karzinogenese des Kolonkarzinoms. Dort zeigten sich bei in vitro murinen Kolonkarzinom-Zellen, welche mit für humanes EpCAM kodierender cDNA transfiziert wurden, signifikant geringere Wachstumsraten und ein geringeres invasives Potential. Zudem zeigte sich hier in Gen-identischen immundefizienten und immunkompetenten Mäusen eine Verminderung des Metastasierungspotentials bei den EpCAM-transfizierten Mäusen im Vergleich zur Kontroll-transfizierten Gruppe (Basak et al., 1998).

Bei der Betrachtung der zahlreichen Studien zur Expression und möglichen Funktion von EpCAM zeigen sich viele unterschiedliche und teilweise widersprüchliche Ergebnisse. Selbst bei übereinstimmenden Studienergebnissen sind die zugrunde liegenden Prozesse häufig noch ungeklärt.

1.4.6 EXPRESSION VON EpCAM

Das Expressionsmuster der verschiedenen Zelladhäsionsmoleküle (CAM) ist sehr unterschiedlich, sowohl zwischen den CAM-Gruppen, als auch innerhalb der Gruppen selbst. Jedoch kommen die meisten CAM in nahezu allen Geweben vor.

Im Gegensatz hierzu kommt EpCAM im normalen adulten Gewebe ausschließlich in Epithelien vor. So kann EpCAM in allen einschichtigen, mehrreihigen und Übergangs-Epithelien nachgewiesen werden (Balzar et al., 1999b). Mehrschichtige Plattenepithelien hingegen sind EpCAM-negativ (Balzar et al., 1999b). Weiterhin konnte für mesenchymale, muskuläre und neuro-endokrine Gewebe bisher keine EpCAM-Expression nachgewiesen werden (Momburg et al., 1987; Bumol et al., 1988). Die EpCAM-Expressionsrate scheint sich dabei in den einzelnen Geweben stark zu unterscheiden. So lässt sich beispielsweise im Epithel des Magens nur eine sehr geringe EpCAM-Expression finden, während diese im Dünndarm bereits deutlich höher ist und sich im Kolon die wahrscheinlich höchsten EpCAM-Level aller Epithelien finden lassen (Balzar et al., 1999b).

Darüber hinaus wird EpCAM in pathologischen Geweben exprimiert, im besonderen Maße in Karzinomen und bei entzündlichen Erkrankungen. In normalen epithelialen Geweben ist EpCAM an der basolateralen Zellmembran lokalisiert, in Karzinom-Zellen jedoch meist über die gesamte Zellmembran gleichmäßig überexprimiert, häufig assoziiert mit einer zytoplasmatischen Anfärbbarkeit für EpCAM (Gosens et al., 2007)

Die Expression und Interaktion von CAMs spielen eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung und werden bereits in den ersten Stadien der Embryogenese in den jeweils gewebstypischen Mustern exprimiert. Gleichmaßen wird EpCAM schon in den frühesten Entwicklungsstadien exprimiert, beispielsweise in der befruchteten Oozyte, im Zwei-Zell-Stadium und im Stadium der Morula (Balzar et al., 1998).

Zudem konnte eine EpCAM-Expression in der fetalen Lunge, Niere (proximaler Tubulus), Leber, Keimzellen und im fetalen Pankreas nachgewiesen werden (Balzar et al., 1998).

Dabei scheint die Expression von EpCAM dynamischen Veränderungen im Laufe der Gewebsentwicklung zu unterliegen. Die epithelialen Zellen der Lunge etwa exprimieren EpCAM in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. So zeigen die Zellen sowohl in der pseudoglandulären, kanalikulären und alveolären Phase, als auch im

adulten Gewebe immunologische Reaktivität für EpCAM (Kasper et al., 1995). Im Vergleich dazu ist die Mehrheit der Vorläuferzellen der Hepatozyten um die achte Embryonalwoche noch EpCAM-positiv, während adulte Hepatozyten diese EpCAM-Expressivität verlieren und EpCAM nur noch in den Gallengängen nachweisbar ist (de Boer et al., 1999). In der Keimzellentwicklung exprimieren sowohl Keimzellen während der Migration um den zehnten Tag, als auch die frühen Gonadenformationen um den zwölften Tag EpCAM (Anderson et al., 1999).

Im reifen Gewebe ist in nahezu allen Epithelien die Expression von EpCAM zu beobachten. Dennoch kann sich die EpCAM-Expression in epithelialen Progenitor-Zellen ändern, welche zur Gewebs-Aufrechterhaltung und -Erneuerung benötigt werden. So zeigte die Arbeitsgruppe von Stingl et al., dass sowohl die Progenitor-Zellen des adulten Brustgewebes, als auch die Progenitor-Zellen, welche luminale Zell-Marker exprimieren, EpCAM-positiv sind (Stingl et al., 2001). Diese Progenitor-Zellen können das Wachstum myoepithelialer Progenitor-Zellen stimulieren, welche kein EpCAM exprimieren. Weiterhin zeigten sie, dass der Verlust von EpCAM mit einer Verminderung der Progenitor-Aktivität korreliert ist, was darauf hindeutet, dass das Level zellulärer Differenzierung und Spezialisierung zumindest teilweise von der EpCAM-Expression abhängig ist (Stingl et al., 2001).

1.4.7 EXPRESSION VON EpCAM IN TUMOREN

Neben der dynamischen Veränderung der EpCAM-Expression in fetalen und adulten gesunden Geweben lässt sich beobachten, dass die Expression von EpCAM auch in einigen Karzinomen Veränderungen unterliegt. So wurde sowohl die vermehrte Expression von EpCAM während des Wachstums epithelialer Tumoren als auch die de-novo-Expression während der Tumor-Transformation einiger eigentlich EpCAM-negativer Gewebe beschrieben. In Tumoren mesodermalen oder ektodermalen Ursprungs, wie Sarkomen, Melanomen und Lymphomen, wird EpCAM hingegen nicht exprimiert (Momburg et al., 1987).

Eine Veränderung der EpCAM-Expression wird besonders bei Plattenepithelien deutlich, welche sonst keine oder nur geringe EpCAM-Level aufzeigen. So kann in frühen Stadien der Neoplasien im Zervix uteri in den Regionen mit atypischen oder undifferenzierten Zellen innerhalb des Plattenepithels häufig eine de-novo-

Expression von EpCAM beobachtet werden (Litvinov et al., 1996). Demnach können in den Stadien CIN (cervical intraepithelial neoplasia) I und II basale und suprabasale Zellen gefunden werden, welche EpCAM-positiv sind, bei CIN III sind bis zu 100% der Plattenepithel-Zellen EpCAM-positiv. Zudem korreliert die EpCAM-Expressionsstärke bei atypisch veränderten Zellen in den CIN Stadien mit dem Verschwinden von Plattenepithelzell-typischen Markern und einer erhöhten Proliferation (Litvinov et al., 1996).

Im Drüsenepithel des Gastrointestinaltrakts kann eine deutliche Abnahme der EpCAM-Expression von den Krypten zu den Villi hin beobachtet werden (Schiechl und Dohr, 1987; Schiechl et al., 1986). Interessanterweise korrelieren die EpCAM-Level positiv mit der Proliferationsaktivität der intestinalen Zellen und umgekehrt mit deren Grad der Differenzierung (Schiechl et al., 1986). Hier lässt sich außerdem eine erhöhte EpCAM-Expression bei Dysplasien und oder Metaplasien beobachten. In gesunden Magenepithelien etwa lassen sich normalerweise nur geringe Level von EpCAM feststellen. Bei proliferativen metaplastischen Läsionen hingegen, wie bei der intestinalen Metaplasie, lässt sich eine hohe Expression von EpCAM nachweisen. Selbst im Kolon, dessen Epithelien sehr hohe EpCAM-Level aufweisen, lässt sich eine weitere Steigerung in der EpCAM-Expression bei der Entstehung von Polypen beobachten (Schiechl et al., 1986).

Hepatozyten sind in der embryonalen Entwicklung EpCAM-positiv und im reifen Gewebe EpCAM-negativ (de Boer et al., 1999). Während der Reifungsprozesse der Leber lassen sich Zellen finden, welche morphologisch Vorläufer-Stammzellen ähneln und EpCAM-positiv sind, während ihrer Reifung zu Hepatozyten allerdings ihre EpCAM-Expressivität wieder verlieren (de Boer et al., 1999). In schwachen, milden und schweren Dysplasien der Mundschleimhaut wurden darüber hinaus hohe EpCAM-Level in den basalen und suprabasalen Zellen beobachtet, welche sich deutlich von den EpCAM-negativen normalen epithelialen Zellen abgrenzen ließen (High et al., 1996).

1.4.8 EXPRESSION VON EpCAM IM PANKREASGEWEBE

Während der Entwicklung des Pankreas wird EpCAM gemeinsam mit anderen Zell-Adhäsionsmolekülen in der 18. Embryonalwoche co-exprimiert (Cirulli et al., 1995).

Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe von Cirulli et al. berichten, dass sich die höchsten EpCAM-Level des fetalen Pankreas in Epithelzapfen finden lassen, welche von den Sprossen des exokrinen Anteils ausgehen (Cirulli et al., 1998). Von diesen Zell-Clustern mit hoher EpCAM-Expression während der Entwicklung wird angenommen, dass sie die frühen endokrinen Zellen des Pankreas, die Inselzellen, bilden (Cirulli et al., 1998).

Im reifen Pankreas findet sich jedoch ein umgekehrtes Expressionsmuster. Hier ließ sich die höchste EpCAM-Expressionsrate nicht im endokrinen Anteil, sondern in den exokrinen kleinen Gängen, interlobulär und im Hauptgang des Pankreas nachweisen. Die adulten Inselzellen hingegen zeigten eine geringe EpCAM-Expressionsrate (Cirulli et al., 1998; Momburg et al., 1987).

Darüber hinaus zeigten Untersuchungen, dass die Hochregulierung der EpCAM-Expression im Zusammenhang mit Zellproliferation zu stehen scheint (Cirulli et al., 1998). Im fetalen Pankreas fanden Cirulli et al. die höchste Proliferationsrate in den Insel-Vorläuferzellen, welche aus den duktalem Epithelien ausknospen und eine hohe EpCAM-Expression zeigen. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte weiterhin nachweisen, dass die duktalem Zellen des reifen Pankreas, welche eine besonders starke immunhistochemische Färbbarkeit für EpCAM zeigten, hier den höchsten Proliferationsindex besaßen. Zudem konnte die Arbeitsgruppe unter den Zellen mit geringer EpCAM-Expression keine proliferierenden Zellen finden. Somit scheinen sie eine direkte Korrelation zwischen der Frequenz proliferierender Zellen und der EpCAM-Expression im entsprechenden Zell-Kompartiment nachgewiesen zu haben (Cirulli et al., 1998).

1.4.9 EXPRESSION VON EP-CAM UND PROGNOSE VON KREBSPATIENTEN

Mittelpunkt vieler Untersuchungen in den vergangenen Jahren war die Frage, ob eine hohe oder niedrige EpCAM-Expression im Tumorgewebe eine prognostische Auswirkung hat. Hierbei zeigte sich, dass eine hohe EpCAM-Expression in einigen Tumoren einen negativen, bei einigen einen scheinbar neutralen und in einigen Fällen einen positiven Einfluss auf das prognostische Gesamt-Überleben von Patienten hat. Eine Übersicht über einige Adeno- und Plattenepithelkarzinome, bei

denen eine signifikante Korrelation zwischen der EpCAM-Expression und der Überlebensprognose beobachtet wurde, stellt Tabelle 6 dar.

Tabelle 6: Übersicht über die humanen Adeno- und Plattenepithelkarzinome, bei denen eine signifikante Korrelation zwischen einer hohen EpCAM-Expression im Gewebe und der Überlebensprognose beobachtet wurde (Baeuerle und Gires, 2007)

Negative Auswirkung auf das Gesamtüberleben	Lymphknoten-positives Mammakarzinom Epitheliales Ovarialkarzinom Gallenblasenkarzinom Cholangiokarzinom Ampulläres Pankreaskarzinom Plattenepithelkarzinom des Ösophagus Plattenepithelkarzinome der Hals-Kopf-Region
Positive Auswirkung auf das Gesamtüberleben	Magenkarzinom (Stadium I und II) Klarzellkarzinom der Niere Mäßig differenziertes Kolonkarzinom Stadium II Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom Stadium pT2

In einigen Studien scheint eine EpCAM-Überexpression im Tumorgewebe bei verschiedenen Karzinomen mit einer schlechteren Prognose der Patienten assoziiert zu sein, wie etwa beim ampullären Pankreaskarzinom oder dem Gallenblasenkarzinom (Fong et al., 2008; Varga et al., 2004).

Bei der Untersuchung von Tumorgewebe konnten Fong und Kollegen bei 56% der untersuchten Pankreaskarzinomproben und 85% der untersuchten Tumorproben des ampullären Pankreaskarzinoms eine EpCAM-Überexpression feststellen (Fong et al., 2008). Zwar zeigte sich die EpCAM-Expression insgesamt nicht als unabhängiger prognostischer Marker, jedoch korrelierte hier eine EpCAM-Überexpression bei Patienten mit ampullärem Pankreaskarzinom und fortgeschrittenem Adenokarzinom des Pankreas mit einem kürzeren Gesamtüberleben dieser Patienten (Fong et al., 2008). Weiterhin zeigte sich eine Korrelation zwischen EpCAM-Überexpression und fortgeschrittenem Tumorstadium beim ampullären Pankreaskarzinom. In der Gruppe der Patienten mit fortgeschrittenem Adenokarzinom des Pankreas konnte darüber hinaus eine Verschlechterung des Gesamtüberlebens mit steigender EpCAM-Expression gefunden werden (Fong et al., 2008).

Des Weiteren konnte in einer Studie mit 99 Patienten mit Gallenblasenkarzinom die EpCAM-Überexpression des Tumors als unabhängiger prognostischer Marker

nachgewiesen werden (Varga et al., 2004). In 63% der Tumorgewebeproben konnte eine EpCAM-Überexpression und eine signifikante Korrelation mit einem verminderten Gesamtüberleben bei diesen Patienten gefunden werden (Varga et al., 2004). Zudem nahm das Gesamtüberleben stufenweise mit zunehmender EpCAM-Expression ab. Während in der Gruppe der pT1-Tumoren jene Patienten ohne EpCAM-Überexpression eine 5-Jahres-Überlebensrate von 100% zeigten, fand sich unter den Patienten mit EpCAM-Überexpression eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 38% (Varga et al., 2004).

Andererseits scheint eine hohe EpCAM-Expression bei einigen Tumoren mit einem verbesserten Patienten-Überleben assoziiert zu sein, wie etwa dem Ösophagus- oder Magenkarzinom (Kimura et al., 2007; Songun et al., 2005). In einer Studie mit 138 Patienten mit Ösophaguskarzinom konnte EpCAM in 97,8% der Gewebeproben nachgewiesen werden und eine Korrelation einer niedrigen EpCAM-Expression mit einer größeren Tumortiefe, einem höheren Tumorstadium und häufigerer Infiltration von Gefäßen gefunden werden (Kimura et al., 2007). Weiterhin zeigte sich hier ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer hohen EpCAM-Expression und einer besseren Überlebensrate der Patienten (Kimura et al., 2007). Darüber hinaus wurden in dieser Studie die Seren der Patienten auf die jeweiligen EpCAM-Spiegel hin untersucht. Im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe fanden sich hier bei allen Patienten mit Ösophaguskarzinom höhere EpCAM-Level im Serum. Des Weiteren war die Überlebensrate unter jenen Patienten mit hohen EpCAM-Leveln signifikant höher als bei den Patienten mit niedrigen Serum-Leveln (Kimura et al., 2007).

Auch für das Adenokarzinom des Magens konnte in einer Studie eine signifikant höhere 10-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit EpCAM-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zu EpCAM-negativen Tumoren beobachtet werden (Songun et al., 2005).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 REAGENZIEN UND KITS:

- EpCAM/TROP1 DuoSet, Catalog# DY960, R&D Systems, Minneapolis, USA
 - 1 Ampulle Capture Antibody (Part 842007)
 - 1 Ampulle Detection Antibody (Part 842008)
 - 3 Ampullen Standard Recombinant Human EpCAM (Part 842009)
 - 1 Ampulle Streptavidin-HRP (Part 890803)
- PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, pH 7,3 GIBCO by Invitrogen, Texas, USA
- Tween 20 pure 500 g Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, BRD
- Substrate Reagent Pack, Catalog# DY999 R&D Systems, Minneapolis, USA
 - A: Stabilized Peroxide Solution
 - B: Stabilized Chromogen Solution
- Reagent Diluent: 1% BSA in PBS, Catalog# DY995 R&D Systems, Minneapolis, USA
- STOP Solution (H₂SO₄), Catalog# DY994 R&D Systems, Minneapolis, USA

- Bovine Serum Albumin (BSA):
Fraktion V, 98% Reinheit
Sigma Aldrich, München, BRD

2.2.2 ANSÄTZE UND PUFFER

- EpCAM AK Coating:
1,6 µl Capture Antibody mit
400 µl PBS
- ELISA Blocking
PBS mit 3% BSA und 0,05%
TWEEN
- ELISA Washing
PBS mit 0,05% TWEEN
- Standard Recombinant hEpCAM
5 ng/ml (entspricht 5 µl
Standard Recombinant Human
EpCAM mit 200 µl PBS)
- Detection AK EpCAM Lösung
0,2 µg/ml (10 µl Detection
Antibody mit 5 ml PBS)
- Streptavidin-Reagenz
4 µl Streptavidin-HRP mit
800 µl PBS
- ELISA-Reagenz
200 µl Stabilized Peroxide
Solution und 200 µl Stabilized
Chromogen Solution

2.2.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

- Pipettenspitzen:
Biosphere Filter Tips
200 µl type Biohit
100 µl type Eppendorf / Gilson
20 µl type Eppendorf / Gilson
10 µl type Eppendorf / Gilson
Sarstedt, Nümbrecht, BRD
- 96-well-ELISA-Platte
nunc immunoplate F96 maxisorp
Thermo Fisher Scientific,
Schwerte, BRD

- 96-well Microtiterplatten
- Röhrchen, steril
- Einmalpipetten
- Klebefolie, optisch klar
- Reagenzreservoir, steril

Applied Biosystems,
Kalifornien, USA
Sarstedt, Nümbrecht, BRD
Sarstedt, Nümbrecht, BRD
R&D Systems, Minneapolis,
USA
Schott duran group,
Mitterteich, BRD

2.2.4 GERÄTE

- Pipetten: Eppendorf Research
 - 100 - 1000 μ l
 - 30 - 300 μ l
 - 10 - 100 μ l
 - 2 - 20 μ l
 - 0,5 - 10 μ l
 - 0,1 - 2,5 μ l
- Inkubator
- Laboruhr
- ELISA Messgerät, MR 5000

Eppendorf AG, Hamburg, BRD

Heraeus Instruments, Hanau,
BRD
C. Roth, Karlsruhe, BRD
Dynex Technologies,
Denkendorf, BRD

2.2 METHODEN

2.2.1 PATIENTENKOLLEKTIV

In der vorliegenden Arbeit wurden die Serumproben von Patienten untersucht, die im Zeitraum von 1992 bis 2009 im Rahmen einer Pankreas-Resektion in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in eine prospektive Pankreas-Datenbank eingeschlossen wurden. Von allen Patienten lag die schriftliche Einwilligung zur Untersuchung des operativ entfernten Tumorgewebes sowie zur Entnahme von Blutproben zur Erstellung der Datenbank vor.

Die Serum-Proben dieser Patienten wurden unmittelbar vor der Operation durch die ärztlichen Mitarbeiter der Anästhesie gewonnen und kryokonserviert. Die Diagnosen wurden postoperativ histopathologisch bestätigt, entsprechende klinische follow-up Daten in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie dokumentiert.

Das untersuchte Patienten-Kollektiv bestand aus 43 Patienten mit der Diagnose chronische Pankreatitis und 66 Patienten mit duktalem Pankreas-Karzinom. Die Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas erhielten eine partielle Duodenopankreatektomie entweder mit oder ohne Pyloruserhalt. Keiner der Patienten erhielt im Vorfeld eine neoadjuvante Chemotherapie. Drei Patienten konnten aufgrund fehlender Daten des Todeszeitpunkts nicht in die Berechnung der Überlebenskurve einbezogen werden.

Das mediane Alter der Patienten mit Pankreaskarzinom lag bei 62,5 Jahren, im Patientenkollektiv der chronischen Pankreatitis lag der Median bei 47 Jahren. In der Gruppe der Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas wurden 40 männliche und 26 weibliche Patienten eingeschlossen, in der Gruppe der Patienten mit chronischer Pankreatitis fanden sich 30 Männer und 13 Frauen.

Des Weiteren wurde eine Referenzgruppe von 104 Blutspendern untersucht, deren Serumproben aus der Blutspenderdatenbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf stammten und welche als Vergleichsgruppe dienten.

2.2.2 AUFBEREITUNG DER SERUMPROBEN

Die Entnahme der venösen Blutproben erfolgte unmittelbar vor Operationsbeginn aus einem zentralen Venenkatheter durch die ärztlichen Mitarbeiter der Anästhesie in Serum-Gel-Monovetten der Firma Sarstedt. Die Proben wurden stehend verwahrt und in den Laboratorien der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf nach einem standardisierten Protokoll aufgearbeitet. Nach Gerinnung des venösen Vollblutes wurden die Serum-Gel-Monovetten 10 Minuten bei 3400 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation lag die Gelschicht über dem gesamten Blutkuchen, so dass keine Verbindung mehr zwischen Blutkuchen und dem überstehenden Serum bestand. Anschließend wurde der Überstand zunächst auf -20°C heruntergekühlt und schließlich bei -80°C kryokonserviert.

2.2.3 ELISA

Mit Hilfe des ELISA (Enzym-linked immunosorbent assay) lässt sich quantitativ die Menge eines Proteins oder Antigens in einer Probe bestimmen. Die Messung ermöglicht das so genannte Sandwich-Prinzip. Zunächst werden die Mikrotiterplatten mit einem „Fänger-Antikörper“ beschichtet und danach mit Hilfe einer Blotting-Lösung eventuell nicht belegte Bindungsstellen blockiert, um unspezifische Bindungen im Verlauf des ELISAs zu verhindern. Anschließend wird die Probe mit dem zu messenden Antigen hinzugefügt. Während der Inkubationszeit kann nun der „Fänger-Antikörper“ das in der Probe enthaltene Antigen binden.

Daraufhin wird meist ein Enzym-gekoppelter Sekundär-Antikörper hinzu gegeben, zum Beispiel ein Antikörper mit Alkalischer Phosphatase. In diesem Fall wurde ein ungekoppelter Detektions-Antikörper verwendet, welcher an das gebundene Antigen bindet, gemeinsam mit einem zusätzlichen sekundären Antikörper, in diesem Fall Streptavidin. Um das in der Probe ursprünglich enthaltene und nun gebundene Antigen quantitativ nachzuweisen, wird anschließend ein passendes chromogenes Substrat hinzugefügt, dessen enzymatische Umsetzung nach einer bestimmten Zeiteinheit photometrisch mit einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden kann.

2.2.4 VORBEREITUNG DER 96-WELL-ELISA-PLATTEN

Zunächst wurden die 96-well-ELISA-Platten (nunc immunoplate F96 maxisorp, Thermo Fisher Scientific) mit Hilfe des Fänger-Antikörpers vorbereitet. Hierzu wurden 1,6 µl EpCAM AK Coating-Lösung (1 mg/ml) (EpCAM/TROP1 DuoSet, Catalog # DY960, R&D Systems, Minneapolis, USA) mit 400 µl PBS-Puffer auf eine Konzentration von 4 µg/ml verdünnt. In jede Kavität der Platten wurden 50 µL dieser Lösung pipettiert und die Platten anschließend für zwölf Stunden bei 4°C inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit wurden die Platten mit Blotting-Lösung befüllt, um nicht belegte Bindungsstellen auf den ELISA-Platten zu blockieren. Für die Blotting-Lösung wurde PBS mit 3% BSA und 0,05% TWEEN verwendet. Von dieser Blotting-Lösung wurden in jede Kavität 100 µl hinein pipettiert und die Platten für 60 Minuten bei Raumtemperatur (20°C) inkubiert.

Für die Entfernung des nicht-gebundenen Antikörper-Überstandes wurde eine Washing-Lösung mit PBS und 0,05% Tween vorbereitet. Zunächst wurden die Kavitäten entleert und anschließend mit jeweils 200 µl drei Mal gespült. Dabei betrug die Einwirkzeit des Waschpuffers jeweils mindestens 60 Sekunden. Zwischen den Waschungen und abschließend wurden die Kavitäten entleert und die Platten gegen saubere Papiertücher ausgeschlagen, um Reste des Waschpuffers zu lösen.

2.2.5 VORBEREITUNG DER SERUMPROBEN

Zur Vorbereitung der Proben wurden die gefrorenen Serumproben zunächst auf Raumtemperatur erwärmt und aufgemischt. Anschließend wurden die Seren in 96-Well-Microtiterplatten im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnt (entspricht 10 µl Serum mit 40 µl PBS).

2.2.6 VORBEREITUNG DES EP-CAM-STANDARDS

Für jede der ELISA-Platten wurde eine Standard-Reihenverdünnung angefertigt. Hierzu wurden zunächst 5 µl des Standard Recombinant human EpCAM (EpCAM/TROP1 DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, USA) mit 200 µl PBS

gemischt, die geringste Verdünnung entsprach daher einer Konzentration von Standard recombinant hEpCAM 5 ng/ml. Die weiteren Lösungen wurden in Serien-Verdünnung jeweils im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Abbildung 5 zeigt die schematische Darstellung der Standard-Verdünnungsreihe.

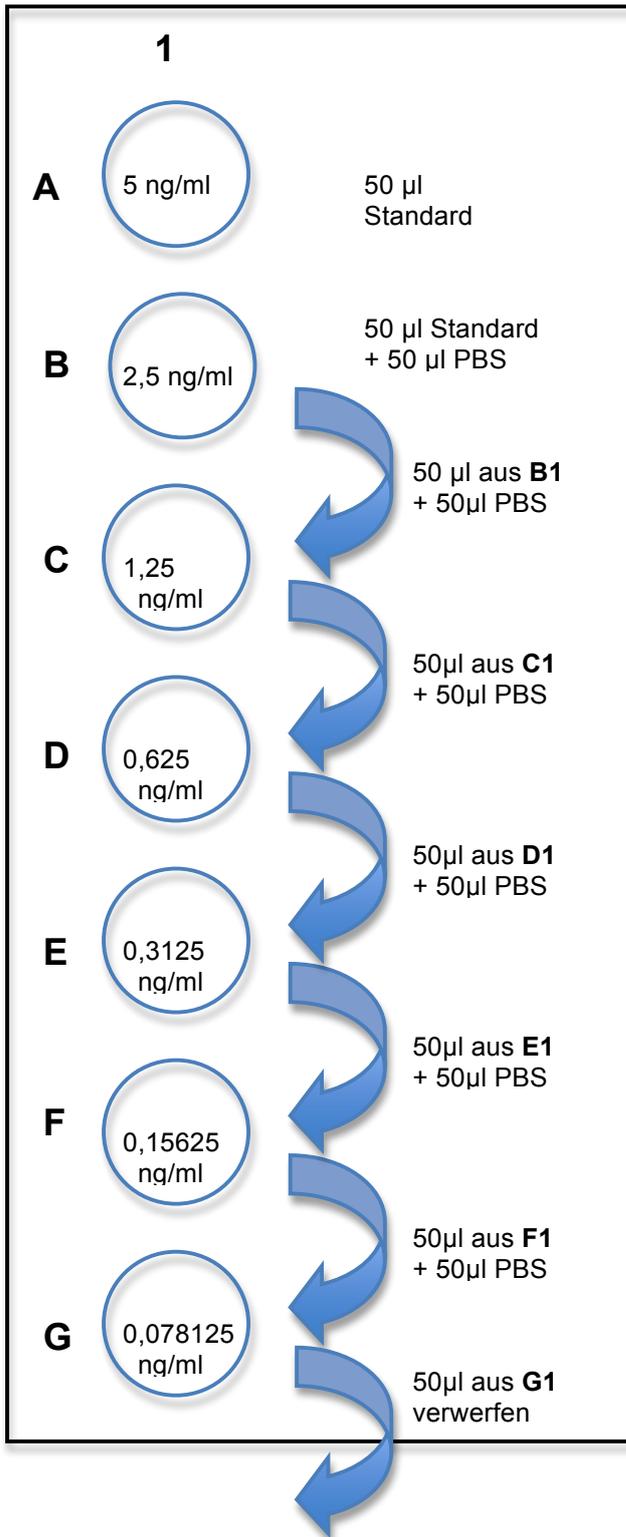


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Standard-Verdünnungsreihe

2.2.7 BEIMPFUNG DER ELISA-PLATTEN

Jeweils 50 µl der verdünnten Serumproben wurden anschließend in die Kavitäten der ELISA-Platte pipettiert. Mit jeder Serumprobe wurden jeweils zwei Verdünnungen vorbereitet und jeweils zwei Kavitäten zur Doppelbestimmung befüllt. Entsprechend der Serumproben wurden ebenfalls jeweils 50 µl der Standard-Verdünnungen in jeweils zwei Kavitäten zur Doppelbestimmung pipettiert. Zusätzlich wurden zwei Leerproben mit 50 µl PBS aufgebracht. Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung einer ELISA-Platte. Die Platten wurden nachfolgend erneut für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten wiederholt drei Mal mit je 200 µl ELISA-Washing pro Kavität gewaschen.

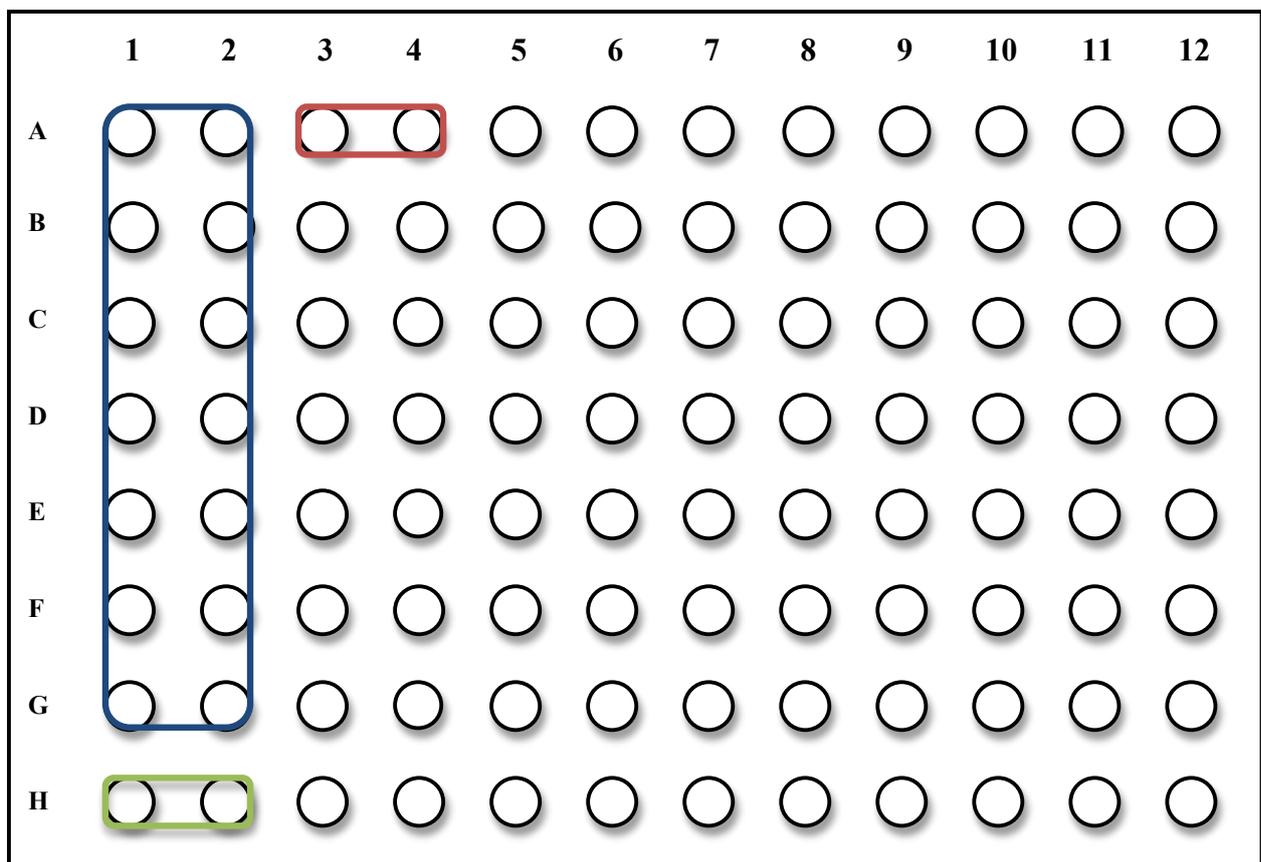


Abbildung 6: Schematische Darstellung der ELISA-Platte: blaue Markierung: Verdünnungsreihe Standard Recombinant Human EpCAM; grüne Markierung: Leerprobe mit PBS; rote Markierung: beispielhafte Darstellung der Doppelbestimmung einer Serumprobe

2.2.8 MESSUNG DES GEBUNDENEN EPCAM-GEHALTES

Um den gebundenen EpCAM-Gehalt in den Proben quantifizieren zu können, wurden die Kavitäten anschließend mit jeweils mit 50 µl Detection AK EpCAM Lösung befüllt, welche zunächst mit PBS auf eine Konzentration von 0,2 µg/ml verdünnt wurde. Die Platten wurden anschließend für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde die Kavitäten erneut drei Mal mit je 200 µl ELISA-Washing gewaschen, um den nicht-gebundenen Detection-Antikörper-Überstand zu entfernen.

Anschließend wurde in jede Kavität 50 µl Streptavidin pipettiert, in einer Verdünnung von 1:200 mit PBS. Anschließend wurden die Platten erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Erneut wurden die Platten drei Mal mit je 200 µl ELISA-Washing gewaschen (siehe oben).

Für die Farbreaktion wurde in jede Kavität 50 µl ELISA-Reagenz als Substrat im Verhältnis 1:1 (Stabilized Peroxide Solution und Stabilized Chromogen Solution) pipettiert. Bis zur ausreichenden Entwicklung der Farbreaktion wurden die Platten bei Raumtemperatur lichtgeschützt für 30 min inkubiert.

Um die Farbreaktion zu beenden, wurden daraufhin 25 µl ELISA-Stopp-Reagenz (H_2SO_4) zu jeder Kavität hinzugefügt und die ELISA-Platten anschließend mit dem ELISA-Leser (DynaTech MR 5000, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen.

2.2.9 STATISTISCHE ANALYSE

Sämtliche Daten der Arbeit wurden mithilfe von Microsoft Excel für Mac, Version 2008 erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Aus den Doppelbestimmungen der Serumproben wurden jeweils die Mittelwerte zur statistischen Auswertung verwendet. Bei einer Varianz von >5% zwischen den Doppelbestimmungen erfolgte eine Wiederholungsmessung.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Box-Plot, bei dem der Median sowie das obere und untere Quartil und Extremwerte dargestellt werden.

Für die Beurteilung der Effizienz der EpCAM-Serumwerte als diagnostischer Test und zur Kalkulation des Konzentrationsbereichs mit dem optimalen Verhältnis von Sensitivität und Spezifität wurde der Youden Index verwendet (Schisterman et al., 2005).

Für die Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas wurde die Überlebenszeit vom Operationsdatum bis zum Todeszeitpunkt ermittelt. Aus den ermittelten Überlebenszeiten wurden die Überlebensraten errechnet und in einer Kaplan-Meier-Kurve mit einem Konfidenzintervall von 95% mit den EpCAM-Serumleveln korreliert. Zum Vergleich der Überlebenskurven wurde der Log Rank-Test verwendet.

Für die Berechnung signifikanter Zusammenhänge zwischen kategorischen Variablen wurde der Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest verwendet.

Kontinuierliche Variablen wurden mit dem nicht parametrischen Kruskal-Wallis-Test bewertet. Für alle Tests wurde ein p-Wert <0,05 als signifikant definiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 VERGLEICH DER EPCAM-SERUMLEVEL

Der Vergleich der EpCAM-Serumlevel in den untersuchten Gruppen zeigte signifikante Unterschiede.

In der Gruppe der Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas lag der Mittelwert der EpCAM-Serumlevel bei 0,240 ng/ml (95%CI: 0,030 - 0,450) mit einer Standardabweichung von 0,833 ng/ml und einem Standardfehler von 0,105 ng/ml. Der Median lag bei 0,003 ng/ml, der kleinste gemessene Wert lag bei 0,0 ng/ml und der höchste Wert bei 5,130 ng/ml.

Für die Gruppe der Patienten mit chronischer Pankreatitis ergab sich ein Mittelwert von 0,192 ng/ml (95% CI: 0,008 - 0,375) mit einer Standardabweichung von 0,590 ng/ml und einem Standardfehler von 0,091 ng/ml. Für den Median ergab sich der Wert 0,013 ng/ml, für den kleinsten Wert 0,0 ng/ml und den größten Wert 3,246 ng/ml.

In den Proben der Blutspender ergab sich ein Mittelwert von 0,626 ng/ml (95% CI: 0,364 - 0,889) mit einer Standardabweichung von 1,164 ng/ml und einem Standardfehler von 0,132 ng/ml. Der Median lag bei 0,121 ng/ml, der kleinste gemessene Wert lag bei 0,0 ng/ml und der höchste Wert bei 4,513 ng/ml.

Des Weiteren zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Mediane der EpCAM unter den drei untersuchten Kollektiven ($p < 0,001$), bei einem gemeinsamen Median von 0,370 ng/ml.

Die Streuungs- und Lagemaße sind in der nachstehenden Abbildung als Boxplots mit Median, den 50% - Quartilen, den Extremwerten und Ausreißern dargestellt (Abbildung 7).

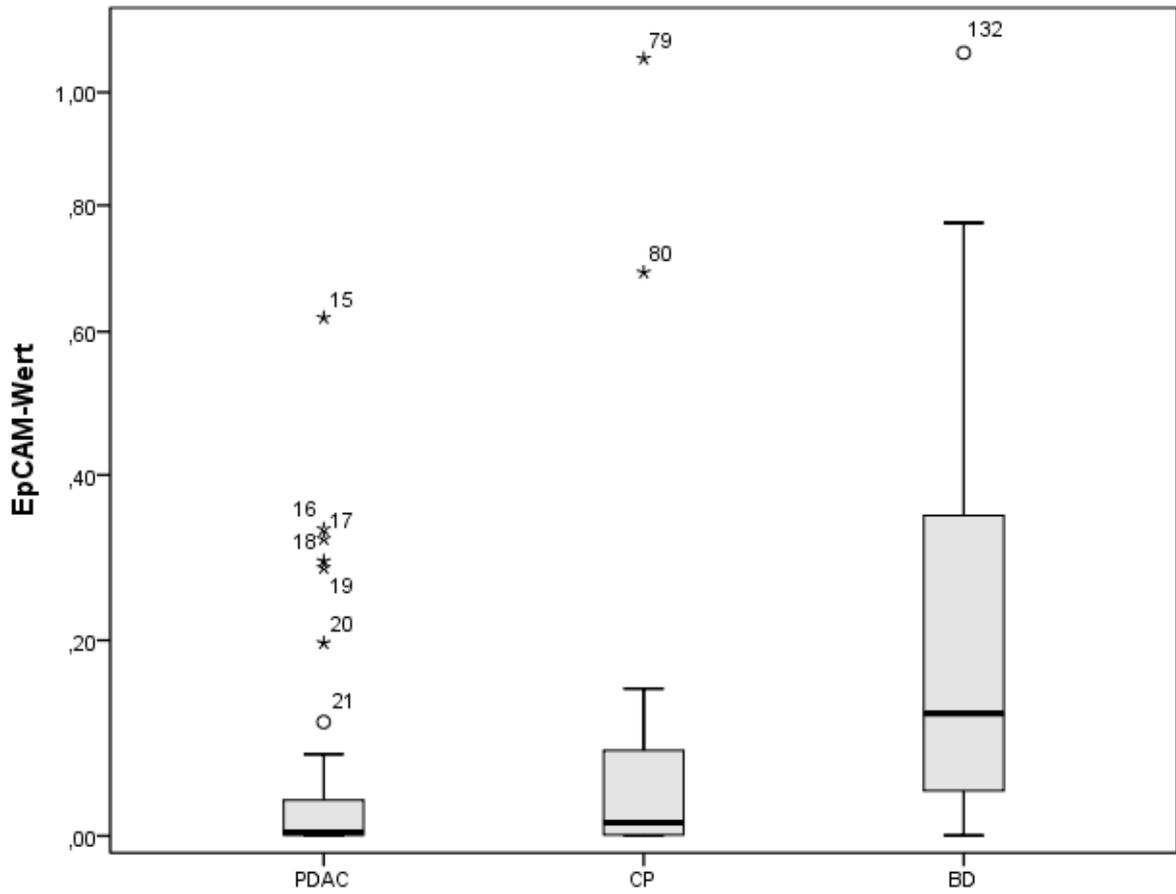


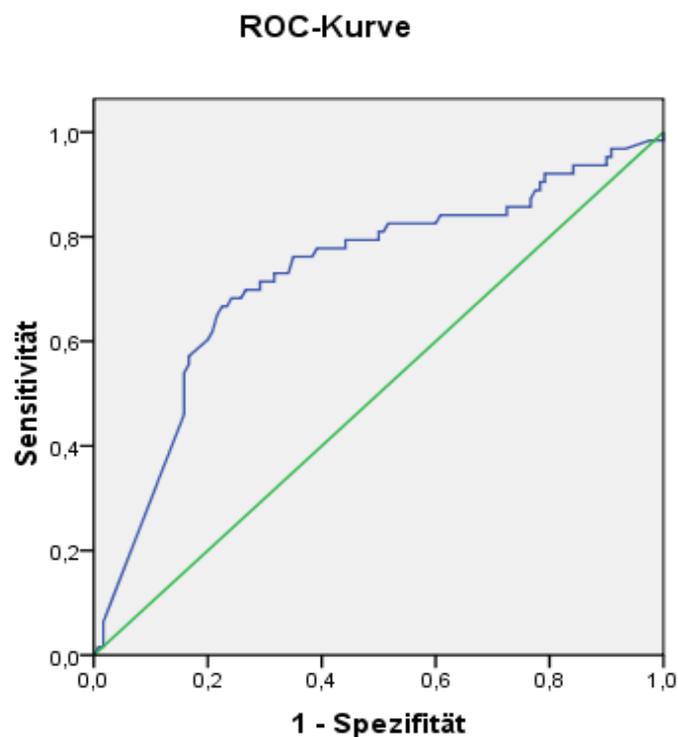
Abbildung 7: Boxplot-Diagramm zur Verteilung der EpCAM-Serumwerte (in ng/ml) unter Patienten mit Adenkarzinom des Pankreas (PDAC), Patienten mit chronischer Pankreatitis (CP) und Blutspendern (BD)

3.2 SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT VON EPCAM

Zur Ermittlung der Trennschärfe von EpCAM zur Unterscheidung der Patienten mit Pankreaskarzinom von Patienten mit chronischer Pankreatitis und den Blutspendern wurde eine Receiver Operating Characteristic Kurve (ROC) erstellt. Dabei wurden die Patienten mit chronischer Pankreatitis und die Blutspender zu einer Gruppe zusammengefasst und den Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas gegenüber gestellt.

Das Auftragen der Wertepaare von Spezifität und Sensitivität der verschiedenen ermittelten Cut-Off-Punkte zur Unterscheidung von Patienten mit Pankreaskarzinom von der „gesunden“ Gruppe ergab die nachstehende ROC-Kurve (Abbildung 8). Für die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC: Area under Curve) ergab sich eine Fläche von 0,726 (95% CI: 0,654 - 0,807) mit statistischer Signifikanz ($p < 0,001$).

Dabei zeigte sich, dass ein EpCAM-Serumwert von 0,442 ng/ml mit einer Sensitivität von 66,7% und einer Spezifität von 77,5% am besten zwischen Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas und der Kontrollgruppe unterscheidet.



Diagonale Segmente ergeben sich aus Bindungen.

Abbildung 8: Diagonale (grün) und ROC-Kurve (blau) für die EpCAM-Serumwerte von Patienten mit Pankreaskarzinom.

3.3 KORRELATION VON EPCAM-SERUMLEVEL UND KLINISCH-PATHOLOGISCHEN MERKMALEN

Zur Untersuchung einer möglichen Korrelation der Höhe der EpCAM-Serumlevel mit den klinisch-pathologischen Parametern wurden die Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas in zwei Gruppen eingeteilt. Dabei wurden die EpCAM-Serumwerte, welche zwischen dem dritten Quartil und dem gemessenen maximalen EpCAM-Serumwert lagen, als hohe EpCAM-Serumlevel bewertet und den übrigen 75% der gemessenen Werte gegenüber gestellt.

In der vergleichenden Untersuchung der EpCAM-Serumlevel innerhalb der Gruppe der Pankreaskarzinome mit den histopathologischen Parametern Primärtumor-Stadium (pT) ($p=0,786$), Lymphknotenstatus (pN) ($p=0,579$) und Fernmetastasenstatus (pM) ($p=0,828$) konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Auch der Vergleich des histologischen Differenzierungsgrads (G) mit den im Serum zu findenden EpCAM-Leveln zeigte keine signifikante Korrelation ($p=0,530$). Weiterhin konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Resektionsstatus (pR) ($p=0,681$), Gefäßinfiltration (pV) ($p=0,751$), perineuraler Infiltration (pPn) ($p=0,865$) und den EpCAM-Serumleveln festgestellt werden. Tabelle 7 zeigt die Patientencharakteristika in Bezug auf die EpCAM-Serumlevel im untersuchten Patientenkollektiv. Zusammenfassend bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den histopathologischen Merkmalen des untersuchten Patientenkollektivs und dem Nachweis von EpCAM im Serum.

Tabelle 7: EpCAM-Serumlevel und die Korrelation mit den demographischen Daten und pathologisch-anatomischen Ergebnissen. ¹ errechnet nach χ^2

	Patienten (n)	EpCAM im Serum				p – Wert ¹
		niedrig	%	hoch	%	
Gesamt	66					
Alter in Jahren						0,855
< 65	37	29	43,9	8	12,1	
> 65	29	22	33,3	7	10,6	
Geschlecht						0,003
weiblich	26	25	37,9	1	1,5	
männlich	40	26	39,4	14	21,2	
T- Stadium						0,786
pT1	4	3	5,0	1	1,7	
pT2	8	7	10,0	1	1,7	
pT3	43	33	50,0	10	15,0	
pT4	11	10	15,0	1	1,7	
N- Status						0,579
pN0	21	18	26,7	3	5,0	
pN1	45	35	53,3	10	15,0	
M- Status						0,828
pM0	54	44	66,7	10	15,7	
pM1	12	9	13,7	3	3,9	
G- Status						0,530
G1	5	3	5,2	2	3,5	
G2	38	31	46,7	7	10,3	
G3	23	18	27,6	5	6,9	
R-Status						0,681
R0	46	37	56,1	9	13,6	
R1	11	7	10,6	4	6,1	
R2	8	7	10,6	2	3,0	
Gefäßinfiltration						0,751
V0	44	28	42,9	16	23,8	
V1	22	13	19,1	9	14,3	
Perineurale Infiltration						0,865
Pn0	48	31	47,0	17	25,8	
Pn1	18	11	16,7	7	10,6	

3.4 EPCAM-SERUMLEVEL UND GESAMTÜBERLEBEN

Unter den untersuchten Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas (n=66) lag die mediane Gesamtüberlebenszeit bei 18,1 Monaten (95% CI: 15,4 – 20,9). Für die Patienten mit niedrigem EpCAM-Nachweis im Serum (n=51) ergab sich ein medianes Überleben von 16,3 Monaten (95% CI: 10,3 – 22,3), während die Patienten mit nachweisbarem EpCAM im Serum (n=15) im Median 25,4 Monate (95% CI: 13,7 – 37,0) überlebten (Tabelle 8). Jedoch konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Nachweis vom EpCAM im Serum und der Gesamtüberlebenszeit gefunden werden ($p=0,428$) (Abbildung 9).

Tabelle 8: Kaplan-Meier Gesamtüberlebensanalyse (Log Rank-Test) in Abhängigkeit von den EpCAM-Serumleveln bei Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas

Überlebenszeit in Monaten			
	Mittelwert (95% Konfidenzintervall)	Median (95% Konfidenzintervall)	p
EpCAM hoch	30,9 (19,2 – 42,6)	25,4 (13,7 – 37,0)	
EpCAM niedrig	37,0 (20,4 – 53,7)	16,3 (10,3 – 22,3)	
Gesamt	39,1 (24,4 – 53,8)	18,1 (15,4 – 20,9)	0,428

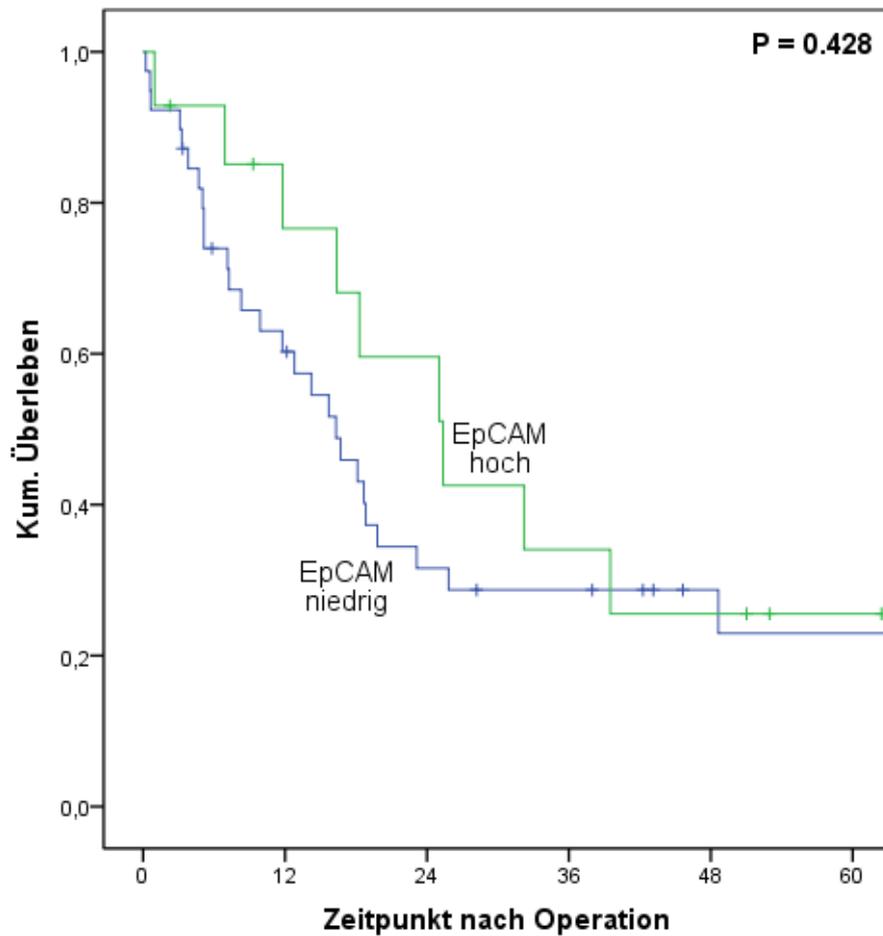


Abbildung 9: Einfluss des Nachweises und Fehlen von EpCAM im Serum auf das Gesamtüberleben in Monaten bei Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas

4 DISKUSSION

EpCAM wurde erstmals 1979 von Koprowski et al. als Tumor-assoziiertes Antigen in Tumoren epithelialen Ursprungs beschrieben (Koprowski et al., 1979). Über seine anfangs vermutete Funktion als Ca^{2+} -unabhängiges homophiles Zell-Adhäsions-Molekül hinaus scheint es eine Rolle in Prozessen der Signaltransduktion, Zell-Migration, Proliferation und Differenzierung zu spielen (vgl. Abschnitt 1.4.5).

Ziel dieser Arbeit war es, den potentiellen Stellenwert von EpCAM als Serummarker für das Vorhandensein eines Pankreaskarzinoms und zur Unterscheidung von Patienten mit chronischer Pankreatitis und Gesunden zu untersuchen. Des Weiteren wurde untersucht, ob die EpCAM-Serumkonzentrationen mit den klinisch-pathologischen Merkmalen von Pankreaskarzinom-Patienten korrelieren und hier als prognostischer Marker im Hinblick auf das Gesamtüberleben eine Rolle spielen.

In zahlreichen Studien wurde eine hohe EpCAM-Expression im Gewebe im Zusammenhang mit schnell proliferierenden Tumoren epithelialen Ursprungs identifiziert. Interessanterweise exprimieren viele der entsprechenden gesunden Epithelien ebenfalls EpCAM, hier jedoch häufig in einer geringeren Rate (Balzar et al., 1999b).

Im embryonalen Pankreasgewebe kann EpCAM um die 18. Entwicklungswoche nachgewiesen werden (Cirulli et al., 1998). Die höchste Expressionsrate fanden Cirulli et al. dabei in den entstehenden Insel-ähnlichen Zell-Clustern, welche aus dem embryonalen duktalem Epithel ausknospen (Cirulli et al., 1998). Von diesen Zell-Verbänden wird angenommen, dass sie den späteren endokrinen Anteil des Pankreas bilden. Interessanterweise fanden Cirulli et al. jedoch ein umgekehrtes Expressionsmuster im adulten Pankreas (Cirulli et al., 1998). Hier ließ sich die höchste EpCAM-Expressionsrate nicht im endokrinen Anteil, sondern in den exokrinen kleinen Gängen, interlobulär und im Hauptgang des Pankreas nachweisen. Die adulten Inselzellen hingegen zeigten eine geringe EpCAM-Expressionsrate (Cirulli et al., 1998).

Weiterhin zeigte sich eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl proliferierender Zellen und einer hohen EpCAM-Expression im adulten exokrinen Pankreas und der fetalen Inselzellen (Cirulli et al., 1998). Jedoch scheinen nicht sämtliche Zellen mit hoher EpCAM-Expression auch eine hohe Zellzyklusrate zu zeigen (Cirulli et al., 1998). Cirulli et al. vermuteten aus dieser Beobachtung heraus, dass eine hohe EpCAM-Expression im Gewebe nicht streng mit einer hohen Zellteilungsrate einhergeht, sondern dass eine hohe EpCAM-Expression möglicherweise die Fähigkeit der Zellen, auf mitogene und proliferationsfördernde Signale einzugehen, steigert (Cirulli et al., 1998).

Im Laufe der EpCAM-Aktivierung und –Signalkaskade wandert die intrazelluläre Domäne von EpCAM, EpIC, als Teil eines Transkriptionskomplexes in den Zell-Kern und rekrutiert dort Transkriptionsfaktoren, welche das Protoonkogen c-myc und andere Gene, die in der Karzinom-Zell-Proliferation involviert sind, induzieren (Maetzel et al., 2009). Unter der Annahme, dass die EpCAM-Expression im exokrinen Anteil des adulten Pankreas am höchsten ist, könnte vermutet werden, dass die exokrinen Gänge im adulten Pankreas eine höhere Ansprechrate auf Wachstumssignale besitzen als der endokrine Anteil. Hierzu passend ist die Beobachtung, dass mehr als 90% der Pankreaskarzinome aus den exokrinen Gangepithelien entstehen (Saif, 2011).

Bisher wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, welche die EpCAM-Expression im gesunden und malignen Gewebe histologisch untersucht haben. Dabei hat sich gezeigt, dass der überwiegende Teil der untersuchten Karzinome eine hohe EpCAM-Expression im Vergleich zum gesunden Gewebe besitzt (Balzar et al., 1999b). So konnten Fong et al. in einer 2008 veröffentlichten Studie in der Untersuchung von 153 Pankreaskarzinom-Proben eine starke EpCAM-Expression in 23% und eine mäßige EpCAM-Expression in 33% der histologisch untersuchten Gewebe nachweisen. Diese wurden als eine Gruppe klassifiziert und zu einer Fraktion von 56% mit Überexpression von EpCAM im Tumorgewebe zusammengefasst (Fong et al., 2008). Eine weitere Studie von Akita et al. von 2011 konnte in der histologischen Untersuchung von 95 Pankreas-Karzinomproben eine hohe EpCAM-Expression in 49,5% und in 50,5% eine geringe oder keine EpCAM-Expression nachweisen (Akita et al., 2011).

In der vorliegenden Studie wurden anstatt der histologischen EpCAM-Expressionsrate erstmals die EpCAM-Serumlevel beim Adenokarzinom des Pankreas untersucht. Eine lösliche Form von EpCAM, welche vermutlich ein Produkt der intramembranösen Proteolyse ist (vgl. Abschnitt 1.4.5), konnte erstmals 2002 in einer Studie von Abe et al. in den Seren von verschiedenen Krebspatienten nachgewiesen werden (Abe et al., 2002). Dieses Ergebnis wurde 2007 in einer Studie von Kimura et al. bestätigt, welche darüber hinaus bei Patienten mit Ösophagus-Karzinom eine negative Korrelation der EpCAM-Serumlevel mit der Überlebensrate ($p=0,211$) der Patienten identifizierte und zeigte, dass die EpCAM-Serumlevel in diesem Fall mit der Prognose assoziiert zu sein scheinen ($p=0,0074$) (Kimura et al., 2007). Auch Petsch et al. konnten sowohl in den Seren von Blutspendern, als auch in den Seren verschiedener Krebspatienten EpCAM nachweisen (Petsch et al., 2011). In all diesen Studien lagen die EpCAM-Serumkonzentrationen im niedrigen ng/ml-Bereich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die Resultate der vorangegangenen Studien, dass eine lösliche Form von EpCAM in nachweisbarer Höhe sowohl in den Seren von Krebspatienten, als auch in den Seren der Blutspender nachweisbar ist (Kimura et al., 2007; Abe et al., 2002; Petsch et al., 2011). Während die Studie von Petsch et al. keinen signifikanten Unterschied in den EpCAM-Serumleveln der Patientenproben und Blutspender finden konnte, konnten sowohl Kimura et al., als auch Abe et al. höhere EpCAM-Serumlevel in den Proben der Krebspatienten als in den Proben der Blutspender nachweisen, wobei die Unterschiede bei Ösophaguskarzinom-Patienten sogar signifikant waren ($p=0,0221$) (Kimura et al., 2007; Abe et al., 2002; Petsch et al., 2011).

Gegenläufig zu diesen Ergebnissen wiesen die Proben der Patienten mit Pankreaskarzinom in dieser Studie im Median (0,003 ng/ml) die geringsten EpCAM-Serumlevel auf, während der Median der Patienten mit chronischer Pankreatitis (0,013 ng/ml) etwas höher lag und die Blutspender die deutlich höchsten EpCAM-Serumlevel (Median: 0,121 ng/ml) aufwiesen. Der Kruskal-Wallis-Test ergab dabei ein Signifikanzniveau von $p<0,001$, so dass angenommen werden kann, dass sich die drei untersuchten Gruppen in ihren EpCAM-Serumleveln signifikant unterscheiden.

Das Ergebnis, dass die EpCAM-Serumlevel in dieser Studie unter den Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas am niedrigsten waren, entspricht zunächst nicht den Erwartungen angesichts des wissenschaftlichen Standes, dass viele gesunde Epithelien eine niedrige EpCAM-Expression aufweisen, wohingegen viele Karzinome EpCAM überexprimieren und dessen proteolytische Aktivierung und Signaltransduktionswege zu nutzen scheinen (Maetzel et al., 2009; Munz et al., 2009).

Wie die Studien von Fong et al. 2008 und von Akita et al. 2011 gezeigt haben, scheint EpCAM auch im Falle des Pankreaskarzinoms häufig im Tumorgewebe überexprimiert zu sein, so dass die höchsten EpCAM-Serumlevel in der Gruppe der Patienten mit Pankreas-Karzinom zu erwarten gewesen wären (Fong et al., 2008; Akita et al., 2011).

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Serumproben auf das Vorhandensein von EpCAM untersucht, während in den beiden Vorläuferstudien Gewebeproben untersucht wurden (Akita et al., 2011; Fong et al., 2008). Es ist bekannt, dass Antigene innerhalb eines Tumors inhomogen verteilt sind. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass durch die mögliche Inhomogenität des Tumors in seiner EpCAM-Expression und der Untersuchung eines lediglich kleinen Anteils des malignen Gewebes möglicherweise keine für den Gesamttumor repräsentativen Ergebnisse entstanden sind. Je nach Größe des untersuchten Gewebes und Entnahmestelle aus dem Tumor ist möglich, dass der Anteil EpCAM-exprimierender Zellen Schwankungen unterliegt.

Die Tatsache, dass die Ergebnisse dieser Studie nicht mit diesen vorangegangenen Studien zur EpCAM-Expression beim Pankreaskarzinom übereinstimmen, könnte darin begründet sein, dass die Proteolyse und Signaltransduktion von EpCAM hoch regulierte Prozesse sind, welche aufgrund bisher unbekannter Mechanismen im malignen oder entzündeten Gewebe möglicherweise inhibiert werden. So ist es möglich, dass neben den wenigen bisher bekannten Regulationsmechanismen von EpCAM weitere Faktoren an dessen Proteolyse und Signaltransduktion beteiligt sind, welche bisher noch nicht identifiziert wurden.

Die vorliegenden Studienergebnisse unterstützen darüber hinaus die Annahme, dass die Entstehung einer löslichen Form von EpCAM wahrscheinlich nicht auf einfache

Dissoziation von der Zellmembran zurückzuführen ist, da die EpCAM-Serumlevel unter den Patienten mit Pankreaskarzinom am niedrigsten waren und bisherige Studien auf eine Gewebsüberexpression von EpCAM beim Pankreaskarzinom hinweisen.

Denkbar ist auch, dass ein Teil des proteolytisch gebildeten EpEx-Proteins aufgrund seiner Tendenz Oligomere zu bilden (vgl. Abschnitt 1.4.4) an der Zellmembran verbleibt, an membranständige nicht-proteolytierte EpCAM-Proteine gebunden wird und somit nicht im Serum nachweisbar ist.

Weiterhin ist möglich, dass EpEx in Karzinomzellen molekularbiologische Unterschiede zu EpEx-Proteinen in gesunden Zellen zeigt, so dass bei gleicher oder gar vermehrter Menge von proteolysierten EpEX ein höherer Anteil in Karzinomzellen gebunden bleibt. Eine mögliche molekularbiologische Veränderung stellt beispielsweise die hyperglykosylierte Form von EpCAM in Karzinomen dar, welche von Munz et al. bereits als mögliches Unterscheidungsmerkmal von malignen zu gesunden Geweben identifiziert wurde (Munz et al., 2008).

Ebenso ist es möglich, dass EpEx im malignen Gewebe an bisher nicht bekannte Partner oder Rezeptoren bindet, so dass nur ein Teil des gebildeten EpEx im Serum nachgewiesen werden kann. Hier könnten ebenfalls die unterschiedlichen Glykosylierungsformen von EpCAM eine Rolle spielen. Wie bereits bei Fc-Rezeptoren, Immunglobulinen und extrazellulären Matrixproteinen beschrieben, scheint die Glykosylierung von Proteinen in der gegenseitigen Erkennung von Ligand und Rezeptor eine wichtige Rolle zu spielen (Rudzki und Jothy, 1997; Katoh et al., 1999; Mimura et al., 2001; Radaev und Sun, 2001). Die nicht-glykosylierten und glykosylierten EpCAM-Varianten könnten daher die Bindung an andere EpCAM-Proteine oder bisher unbekannte Liganden beeinflussen.

Auch der gesteigerte Abbau von EpCAM durch Proteasen im Serum von Tumorpatienten oder der Mikroumgebung des Tumors ist vorstellbar. Zur Evaluation des weiteren Weges der Ektodomäne von EpCAM und welche weiteren Rollen EpCAM im gesunden und malignen Gewebe erfüllt, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Einen wichtigen Aspekt in der Bestimmung der EpCAM-Serumwerte stellt die Wahl des Antikörpers dar. Die meisten der industriellen verfügbaren monoklonalen EpCAM-Antikörper binden die erste EGF-ähnliche Domäne von EpCAM. Da

verschiedene Formen von EpCAM bekannt sind (vgl. Abschnitt 1.4.4), werden einige Protein-Varianten, abhängig von den Epitopen, welche sie zeigen, nur von bestimmten Antikörpern gebunden. In der vorliegenden Studie wurde ein Antikörper der Firma R&D Systems (EpCAM/TROP1 DuoSet, Catalog# DY960, R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet, welcher die erste EGF-ähnliche Domäne des nativen EpCAM-Proteins erkennt. Ebenso verwendeten Petsch, Abe und Kimura et al. Antikörper, welche die erste EGF-ähnliche Domäne binden (Kimura et al., 2007; Abe et al., 2002; Petsch et al., 2011). Schmetzer et al. entwickelten in einer 2012 veröffentlichten Studie einen Fluoreszenz-basierten ELISA, welcher als Zielstruktur zwei Epitope der zweiten EGF-ähnlichen Domäne von EpCAM bindet und mit teilweise denaturiertem EpCAM entwickelt wurde (Schmetzer et al., 2012). Der direkte Vergleich in dieser Studie ergab bei den 412 untersuchten Serumproben von Kolonkarzinom-Patienten deutlich höhere EpCAM-Serumwerte im ELISA mit dem EGF-II-Antikörper zum konventionell verfügbaren ELISA, welcher die ungekürzte EpCAM-Protein-Form anhand der EGFI-Domäne detektiert (Schmetzer et al., 2012). Denkbar ist, dass der von Schmetzer et al. entwickelte Antikörper auch teilweise denaturiertes lösliches EpCAM erkennt, welches möglicherweise nach Tumor-Nekrosen im Serum auftaucht und von den gegen EGF-I-gerichteten ELISAs nicht erkannt wird. Folglich ist es möglich, dass in der vorliegenden Studie eventuell vorhandenes denaturiertes EpCAM im Serum der Karzinom-Patienten nicht erfasst werden konnte. Für die zuverlässige Verwendung von EpCAM als Serummarker wäre es also sicher nötig, die Möglichkeiten und Grenzen der Bestimmung von EpCAM im Serum anhand von ELISAs in weiteren Studien zu evaluieren und die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Antikörper und dieser Methode gegenüber anderen Techniken zu untersuchen.

Der Vergleich der EpCAM-Serumlevel in den drei untersuchten Gruppen ergab mit dem Kruskal-Wallis-Test ein Signifikanzniveau von $p < 0,001$, so dass angenommen werden kann, dass sich die drei untersuchten Gruppen in ihren EpCAM-Serumleveln signifikant unterscheiden.

Zur Ermittlung der Trennschärfe des Serumlevels von EpCAM zur Unterscheidung der Patienten mit Pankreaskarzinom von Patienten mit chronischer Pankreatitis und den Blutspendern ergab die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC: Area under Curve) eine Fläche von 0,726 (95% CI: 0,654 - 0,807) mit statistischer Signifikanz ($p < 0,001$).

Das EpCAM-Serumlevel scheint demnach eine gute Trennschärfe für die Unterscheidung von Pankreaskarzinom-Patienten zu Blutspendern und Patienten mit chronischer Pankreatitis zu besitzen. Dabei ergab sich der Schwellenwert für die EpCAM-Serumlevel mit der besten Trennschärfe bei 0,442 ng/ml, wobei hier eine Sensitivität von 66,7% und eine Spezifität von 77,5% erreicht werden konnte. Zu beachten ist hierbei die inverse Korrelation.

Gegenüber CEA, welches als Tumormarker und Verlaufsmarker für ein Pankreaskarzinom eine Sensitivität von etwa 45% und eine Spezifität von 75% besitzt, scheinen die EpCAM-Serumlevel überlegen zu sein (Ni et al., 2005).

Hingegen ist die Bestimmung von EpCAM im Serum der Sensitivität (80%) und Spezifität (90%) von CA 19-9 unterlegen, welches als am besten etablierter Tumormarker für das Pankreaskarzinom gilt (Steinberg, 1990). Jedoch können positive CA 19-9-Werte auch bei Patienten mit verschiedenen nicht malignen Erkrankungen gemessen werden (vgl. Abschnitt 1.3.3) (Duffy et al., 2010). In einer 2004 durchgeführten Studie wurde ein Screening auf CA 19-9 bei 70.940 asymptomatischen Probanden durchgeführt, von denen 1063 erhöhte Werte zeigten (Kim et al., 2004). Bei lediglich vier dieser Patienten ließ sich letztendlich ein Pankreaskarzinom nachweisen (Kim et al., 2004). Die laborchemische Bestimmung von CA 19-9 ist also zur Erstdiagnose eines Pankreaskarzinoms nicht geeignet und sollte erst bei Nachweis einer Pankreasraumforderung zur Differentialdiagnostik und Verlaufskontrolle durchgeführt werden (Forsmark et al., 1994).

Ebenso scheint die Bestimmung von EpCAM im Serum nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie nicht als diagnostischer Marker für das Vorliegen eines Pankreaskarzinoms geeignet zu sein.

Für die Evaluation von EpCAM als diagnostischer Marker wäre eine prospektive Studie mit einer größeren Kohorte und ähnlichem Aufbau sinnvoll. Weiterhin könnten weitere prospektive Studien Aufschluss darüber geben, ob sich die Bestimmung von EpCAM als Verlaufsmarker beim Pankreaskarzinom eignet. Ebenso könnte die Untersuchung unterschiedlicher EpCAM ELISAs oder andere Methoden wie Western Blot für die Bestimmung von EpCAM im Serum einen Hinweis darauf geben, ob sich EpCAM prinzipiell als diagnostischer Marker eignet.

Aufgrund der bisher schlechten Prognose für Patienten mit Pankreaskarzinom ist es sinnvoll, zum Zeitpunkt der Diagnose möglichst viele prognostische Variablen zu bestimmen, um über ein geeignetes therapeutisches Procedere für den einzelnen Patienten entscheiden zu können.

Für viele Karzinome konnte gezeigt werden, dass möglicherweise eine Korrelation zwischen der EpCAM-Expression im Gewebe und den klinisch-pathologischen Parametern vorliegt. So scheint die EpCAM-Expression im Gewebe beispielweise beim Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus, beim Gallenblasenkarzinom und beim Mamma-Karzinom mit einer malignen Progression zu korrelieren (Stoecklein et al., 2006; Varga et al., 2004; Spizzo et al., 2004; Gastl et al., 2000). Bei anderen Tumoren hingegen scheint eine hohe EpCAM-Expression mit einem verminderten malignen Potential zu korrelieren, wie etwa beim Magenkarzinom, Kleinzellkarzinom der Niere und beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Songun et al., 2005; Schmidt et al., 2008; Seligson et al., 2004). Die Korrelation zwischen der EpCAM-Expression im Gewebe und dem Tumorstadium, beziehungsweise der Prognose, scheint also ambivalent zu sein.

In der vorliegenden Studie wurden zum ersten Mal die EpCAM-Serumlevel von Patienten mit Adenokarzinom des Pankreas auf einen prognostischen Wert hin untersucht. Dabei konnte keine signifikante Korrelation zwischen den klinisch-pathologischen Merkmalen des untersuchten Patientenkollektivs und dem Nachweis von EpCAM im Serum dokumentiert werden. Diese Studie unterstützt somit die Ergebnisse von Fong et al. und Akita et al., welche in der immunhistochemischen Untersuchung von Pankreaskarzinom-Proben ebenfalls keine Korrelation der EpCAM-Expression mit den klinisch-pathologischen Parametern identifizieren konnten (Fong et al., 2008; Akita et al., 2011).

In der vorliegenden Untersuchung konnte darüber hinaus keine statistisch signifikante Korrelation zwischen hohen oder niedrigen EpCAM-Serumwerten und der Gesamtüberlebenszeit gefunden werden ($p=0,428$). Dennoch lag die mediane Überlebenszeit unter den Patienten mit niedrigen EpCAM-Werten im Serum bei 16,3 Monaten, während der Median unter den Patienten mit hohen EpCAM-Serumleveln bei 25,4 Monaten lag. Zwar konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Höhe von EpCAM im Serum und der Gesamtüberlebenszeit gefunden werden,

dennoch deuten die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass der Nachweis von hohen EpCAM-Serumwerten beim Pankreaskarzinom möglicherweise mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit einhergeht.

Die Studie von Fong et al. ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Prognose zwischen einer hohen und einer niedrigen EpCAM-Expression im Gewebe, jedoch konnte die Arbeitsgruppe eine Korrelation der EpCAM-Überexpression mit einem kürzeren Gesamtüberleben in der Untergruppe der Patienten mit fortgeschrittenen Pankreas-Karzinom feststellen (Fong et al., 2008). Hier ist zu bemerken, dass von den insgesamt 153 Patienten in dieser Studie 91 Patienten (60%) keiner radikalen operativen Behandlung mit kurativer Zielsetzung unterzogen wurden, stattdessen wurden 62 Patienten palliativ operiert und 29 Patienten als inoperabel klassifiziert (Fong et al., 2008). Weiterhin wurden in der Studie von Fong et al. weder die Resektionsränder der Präparate beschrieben, noch Bezug auf eventuell vorhandene Lymphknotenmetastasen genommen. Diese sind jedoch generell als wichtige prognostische Faktoren bei Pankreaskarzinom-Patienten anerkannt, so dass der Zusammenhang zwischen einer hohen EpCAM-Expression und der Prognose in dieser Studie nicht zweifelsfrei geklärt ist (Geer und Brennan, 1993).

Die Studie von Akita et al. hingegen ergab eine insgesamt signifikant bessere Prognose für Pankreaskarzinom-Patienten mit hoher EpCAM-Expression im resezierten Gewebe im Vergleich zu den Patienten mit niedriger oder fehlender EpCAM-Expression (3-Jahres-Überlebensrate; 56,2% vs. 19,2%, $p=0,0018$) (Akita et al., 2011). Darüber hinaus wurden hier die Patienten in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus in zwei Gruppen eingeteilt, wobei sich innerhalb der Gruppe der Lymphknoten-negativen Karzinome die 3-Jahres-Überlebensrate bei hoher oder niedriger EpCAM-Expression noch stärker unterschied (keine genauen prozentualen Angaben, s. Graphik im Anhang des Papers) (Akita et al., 2011). Des Weiteren wurde in dieser Studie das maligne Potenzial von nativen Elternzellen und EpCAM-transfizierten Zelllinien des humanen Pankreas-Karzinoms in Proliferations-, Migrations- und Invasions-Essays untersucht. Dabei zeigte eine der drei EpCAM-transfizierten Zelllinien eine signifikant geringere Proliferationsrate (Akita et al., 2011). In der Invasions- und Migrationsrate zeigten sogar alle EpCAM-transfizierten

Zelllinien ein signifikant geringeres malignes Potenzial im Vergleich zu den Elternzellen (Akita et al., 2011).

Auch der Vergleich zweier Studien zum Ösophagus-Karzinom ergibt widersprüchliche Resultate: Kimura et al. konnten in der histologischen Untersuchung der EpCAM-Expression bei Ösophagus-Karzinomen eine Korrelation mit der Tumortiefe ($p=0,0005$), des Tumorstadiums ($p=0,0037$) und der Gefäßinfiltration ($p=0,0397$) nachweisen. Es zeigten sich außerdem signifikant höhere Überlebensraten ($p=0,0291$) der Patienten mit hoher EpCAM-Expression im Vergleich zu den Patienten mit geringer Gewebsexpression (Kimura et al., 2007). Eine vorangegangene Studie von Stoeklein et al. hingegen konnte in der histologischen Untersuchung der EpCAM-Expression bei Ösophagus-Karzinomen keine signifikante Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern finden. Weiterhin korrelierte hier eine EpCAM-Überexpression mit einer verminderten medianen krankheitsfreien Periode ($p=0,0001$) und einer verminderten medianen Gesamtüberlebenszeit ($p=0,0003$) (Stoeklein et al., 2006).

Diese Beispiele betonen die nicht eindeutige Studienlage zu EpCAM und die sich zum Teil widersprechenden Studienergebnisse. Ein Grund hierfür ist sicherlich, dass die Funktion und die Rolle von EpCAM im malignen Gewebe noch nicht vollständig verstanden sind.

Wie bereits erwähnt, scheint EpCAM einerseits in der Lage zu sein, E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsionen aufzulösen, indem es die Bindung zwischen α -Catenin und F-Aktinin stört (Winter et al., 2003). Weiterhin scheint die Verbindung von EpCAM mit Claudin-7 die EpCAM-vermittelte homophile Zell-Adhäsion zu behindern und so die Zell-Motilität, Proliferation, Karzinogenese und Bildung von Metastasen zu begünstigen (Maetzel et al., 2009). Darüber hinaus gibt es Anhaltspunkte, dass die intrazelluläre Domäne EpIC im Rahmen der Signaltransduktion als Teil eines Transkriptionskomplexes die Expression von c-myc und Cyclin-A und -E induziert und so zur Induktion einer reduzierten Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, einer Proliferation, einer Dedifferenzierung, und eines verstärkten Metabolismus führt (Maetzel et al., 2009). So werden EpCAM einerseits onkogene Eigenschaften zugesprochen. Und tatsächlich scheint die EpCAM-Expression, wie zuvor beschrieben, bei einigen Tumoren mit einer schlechten

Prognose einher zu gehen (Varga et al., 2004; Stoecklein et al., 2006; Spizzo et al., 2004; Gastl et al., 2000).

Andererseits besitzt EpCAM möglicherweise auch tumorsuppressive Eigenschaften. Zunächst als Zell-Adhäsions-Molekül beschrieben, welches homophile Zell-Zell-Adhäsionen vermittelt, scheint es teilweise Zell-Streuung in Geweben zu verhindern und eventuell invasive Prozessen zu inhibieren (Litvinov et al., 1994). Tatsächlich scheint der Verlust der EpCAM-Expression zu einem erhöhten Migrationspotential bei kolorektalen Karzinomzellen zu führen (Gosens et al., 2007). Für das Nierenzell-Karzinom konnte weiterhin gezeigt werden, dass die EpCAM-Expression in den Metastasen deutlich geringer als im Primärtumor zu sein scheint (Went et al., 2005). Darüber hinaus scheint eine hohe EpCAM-Expression bei einigen Tumoren mit einer besseren Prognose assoziiert zu sein (Songun et al., 2005; Schmidt et al., 2008; Seligson et al., 2004).

Die Frage, ob EpCAM überwiegend tumorsuppressive oder onkogene Eigenschaften besitzt und somit die Prognose von Tumorpatienten positiv oder negativ beeinflusst, scheint zunächst also nicht allgemein zu beantworten zu sein. Zudem wird der Vergleich und das Ziehen von Parallelen zwischen unterschiedlichen oder sich widersprechenden Studienergebnisse durch verschiedene Faktoren erschwert. Neben der nicht vollständig geklärten Funktion von EpCAM tragen sicherlich die Verwendung unterschiedlicher Antikörper zur Bestimmung von EpCAM, die Interpretation der Ergebnisse anhand verschiedener Einteilungs- und Bewertungssysteme und die uneinheitliche Auswahl der untersuchten Medien zu nicht eindeutigen Studienergebnissen bei und erschweren die Bewertung der Ergebnisse im Vergleich zueinander.

Eine weitere Möglichkeit der Erklärung für die unterschiedlichen Studienergebnisse könnte darin liegen, dass die unterschiedlichen Eigenschaften von EpCAM in ihrer Ausprägung eventuell durch die Mikroumgebung des Tumors beeinflusst und moduliert werden, in welcher es zur Interaktion mit anderen Proteinen und Rezeptoren kommt. Tumore unterschiedlicher Entitäten, Stadien und Differenzierungsgrade scheinen die Funktion und Rolle von EpCAM im Gewebe zu beeinflussen, sodass abhängig vom Tumortyp die tumorsuppressiven oder

onkogenen Eigenschaften von EpCAM überwiegen. Die ungleichen Funktionen von EpCAM stehen dabei möglicherweise ebenfalls in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Glykosylierungszuständen von EpCAM, welche sowohl die Bindungspartner als auch die folglich durch EpCAM vermittelten Adhäsionseigenschaften beeinflussen könnten. Da EpCAM in gesunden Epithelien und unterschiedlichen Karzinomen verschiedene Glykosylierungsmuster zeigt, könnten diese eventuell den Einfluss von EpCAM auf Signaltransduktion, Zell-Migration und Zell-Adhäsion beeinflussen (Munz et al., 2008).

Weiterhin ist interessant, welche Rolle EpCAM als morphoregulatorisches Molekül erfüllt. In vielen Studien wurde die erhöhte oder de-novo-Expression von EpCAM mit einer erhöhten Proliferationsrate in Zusammenhang gebracht und scheint in einigen Fällen mit einer verminderten Zell-Differenzierung zu korrelieren (Litvinov et al., 1996; High et al., 1996; Zorzos et al., 1995). Dies wird besonders in Epithelien deutlich, welche eigentlich kein EpCAM exprimieren, wie etwa Plattenepithelien. Im Plattenepithel des Zervix uteri etwa lässt sich bereits in frühen Stadien einer Neoplasie die de-novo-Expression von EpCAM in Gewebsbereichen mit atypischen und dedifferenzierten Zellen nachweisen (Litvinov et al., 1996). Hier zeigen sich im Stadium CIN (cervical intraepithelial neoplasia) I und II die basalen und suprabasalen Zellen EpCAM-positiv, während im Stadium III bis zu 100% der Zellen aller Schichten des Plattenepithels EpCAM exprimieren (Litvinov et al., 1996). Ferner scheint hier die EpCAM-Expressionsrate mit dem Verschwinden von Differenzierungsmarkern des Plattenepithels und der Zellproliferation zu korrelieren (Litvinov et al., 1996).

Im Drüsengewebe des Gastrointestinaltraktes konnte weiterhin eine deutliche Abnahme der EpCAM-Expression von den Krypten zu den Villi hin gefunden werden (Schiechl und Dohr, 1987; Schiechl et al., 1986). Dabei scheint die EpCAM-Expression mit der proliferierenden Aktivität der intestinalen Zellen zu korrelieren (Schiechl et al., 1986). In dysplastischen und metaplastischen Gewebeproben konnte hier sogar eine noch stärkere EpCAM-Expression nachgewiesen werden (Schiechl et al., 1986). Im Laufe der Karzinogenese scheint die maligne Proliferation und Dedifferenzierung also häufig von der Expression von EpCAM begleitet zu sein.

1994 wurde erstmals die Hypothese für die Existenz von Tumor-Stammzellen bei der akuten myeloischen Leukämie beschrieben (Lapidot et al., 1994). Diese Tumor-Stammzellen scheinen eine Subpopulation von Tumorzellen darzustellen, welche retransplantiert werden können und in der Lage zu sein scheinen, einen Primärtumor im Mausmodell zu initiieren (Rosen und Jordan, 2009). Hieraus wurde die Vermutung abgeleitet, dass diese Tumor-Stammzellen möglicherweise auch für solide Tumoren existieren könnten und Stammzell-Eigenschaften besitzen, wie die Möglichkeit zur unbegrenzten Regeneration, Tumorgenität (eine Tumor-Stammzelle kann als Keimzelle für einen malignen Tumor fungieren), Pluripotenz und eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber exogenen Noxen (Cioffi und Heeschen, 2012).

So konnten auch Hermann et al. Hinweise darauf finden, dass es beim Adenokarzinom des Pankreas eine hierarchische Organisation der Tumorzellen zu geben scheint und auch hier möglicherweise Tumor-Stammzellen existieren, welche die Metastasierung und Invasion des Tumors fördern (Hermann et al., 2007). Li et al. identifizierten EpCAM als möglichen Oberflächenmarker von Tumor-Stammzellen und Munz et al. wollen gezeigt haben, dass in diesen mutmaßlichen Tumor-Stammzellen EpCAM überexprimiert zu sein scheint (Munz et al., 2009; Li et al., 2007). So zeigten unter den Pankreaskarzinomzellen mit Stammzelleigenschaften die EpCAM exprimierenden Zellen ein 100-fach erhöhtes karzinogenes Potential gegenüber den EpCAM-negativen Zellen (Li et al., 2007). Auch beim hepatozellulären Karzinom konnte gezeigt werden, dass EpCAM-positive mutmaßliche Tumorstammzellen in SCID-Mäusen (Severe Combined Immunodeficiency) die Tumorbildung initiieren konnten, während EpCAM-negative Tumorstammzellen hierzu nicht in der Lage waren (Yamashita et al., 2009).

Auf der anderen Seite lassen sich unter den Tumorzellen mit Stammzelleigenschaften auch EpCAM-negative Zellen identifizieren, welche einen mesenchymalen Phänotyp besitzen (Mani et al., 2008). Es wird davon ausgegangen, dass epitheliale Tumorzellen im Zuge der Tumorgenese phänotypische Veränderungen durchlaufen müssen, um die verschiedenen Barrieren zur Intravasation zu durchbrechen, im Blut zu überleben und im Anschluss an die Extravasation Metastasen bilden zu können (Thiery et al., 2009; Gorges et al., 2012).

Mit der Veränderung des Phänotyps scheint es zu einer verminderten interzellulären Adhäsion und dem Verlust der Zell-Polarität zu kommen (Gorges et al., 2012). Hierdurch geht die Struktur des Gewebsverbandes verloren, die epithelialen Zellen nehmen eine fibroblastische Form an und gewinnen die Fähigkeit zur Migration und Invasion (Thiery et al., 2009). Darüber hinaus verlieren diese Zellen ihre epithelialen Marker und induzieren die Expression mesenchymaler Eigenschaften, wie Vimentin und N-Cadherin (neural-Cadherin) (Gorges et al., 2012; Palagani et al., 2012). Dieser Übergang von Epithelzellen zu Zellen mit mesenchymalem Phänotyp wird als Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet und scheint möglicherweise von Abnahme oder Verlust der EpCAM-Expression und dessen späterer Re-Expression in den Metastasen-Zellen am Metastasierungsort begleitet zu sein (Trzpis et al., 2007; van der Gun et al., 2010; Jojovic et al., 1998). Eine wichtige Rolle im Zuge der EMT spielt der Verlust der E-Cadherin-Expression (Thiery et al., 2009).

Akita et al. konnten für das Pankreaskarzinom beschreiben, dass die EpCAM-Expression mit der Expression von E-Cadherin im Zusammenhang zu stehen scheint (Akita et al., 2011). So zeigten die EpCAM-transfizierten Zelllinien in dieser Studie eine deutlich erhöhte Expression von E-Cadherin, dessen Verlust einer der prominentesten Marker für die Epitheliale-Mesenchymale Transition ist, während die Vimentin-Expression negativ mit der EpCAM-Expression korrelierte (Akita et al., 2011).

Darüber hinaus konnten Jojovic et al. für humane Tumorzellen darlegen, dass die EpCAM-Expression im Zuge der EMT vorübergehend abnimmt und es zu einer Re-Expression von EpCAM am Metastasierungsort kommt (Jojovic et al., 1998; van der Gun et al., 2010). Weiterhin konnte beim Mausmodell mit Mamma- und Kolon-Karzinom gezeigt werden, dass kleine Metastasen EpCAM-negativ waren, größere Metastasen hingegen die gleiche EpCAM-Expressionsrate wie der Primärtumor besaßen (Rao et al., 2005; Stubke et al., 2012). Hierzu passend zeigten Rao et al. für verschiedene Tumoren, dass die EpCAM-Expression in im Blut zirkulierenden Tumorzellen deutlich niedriger war als im Primärtumor und dessen Metastasen (Rao et al., 2005).

Möglich ist also, dass die Expression von EpCAM beim Pankreaskarzinom im Rahmen der Tumorentstehung zunächst zunimmt, jedoch im Zuge der EMT der Tumorzellen wieder abnimmt.

Die Annahme, dass die EMT eine wichtige Rolle in Prozessen der Invasion und Metastasierung spielt und mit einer Abnahme der EpCAM-Expression einhergeht, könnte eine Erklärung dafür bieten, weshalb niedrigere EpCAM-Serumlevel in dieser Studie auf eine kürzere mediane Überlebenszeit für die Patienten mit Pankreaskarzinom hindeuteten. Möglicherweise geben niedrige EpCAM-Serumlevel also einen Hinweis auf die Abnahme der EpCAM-Expression im Primärtumor im Zuge der EMT und der Tumor-Dedifferenzierung. Somit ist möglich, dass die EpCAM-Serumlevel zwar keine direkte prognostische Aussagekraft besitzen, eine Abnahme der EpCAM-Serumlevel aber Rückschlüsse auf eine Tumorprogression und Metastasierungsprozesse bieten könnte.

Seit Beginn der 90er Jahre ist bekannt, dass EpCAM in vielen Karzinomen überexprimiert wird und die Expressionshöhe teilweise mit dem Dysplasiegrad zunimmt (de Boer et al., 1999; Szala et al., 1990; Litvinov et al., 1996). EpCAM wurde daher als tumor-assoziiertes Antigen bezeichnet und besitzt in der Anwendung als Marker für CTCs (circulating tumor cells) im Blut einen hohen klinischen Stellenwert (Andreopoulou et al., 2011).

Cristofanilli et al. konnten 2004 die klinische Bedeutung von CTCs als unabhängiger prognostischer Faktor bei Brustkrebspatientinnen zeigen (Cristofanilli et al., 2004). Hierfür wurde die Menge der CTCs im peripheren Blut bei 177 Patientinnen vor Beginn einer Therapie ermittelt und im Verlauf überwacht. Dabei schien die Menge zirkulierender Tumorzellen vor Beginn einer Behandlung ein unabhängiger prognostischer Faktor für die Länge der krankheitsfreien Zeit und der gesamten Überlebenszeit von Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs zu sein.

Die gängigen Methoden zur Bestimmung von CTCs bei Tumorpatienten basieren zur Zeit auf der spezifischen Anreicherung und anschließender Detektion der CTCs (Andreopoulou et al., 2011). Dabei basiert die Anreicherung der CTCs zumeist auf Capture-Antikörpern mit magnetischen Mikropartikeln, welche gegen membranständiges EpCAM gerichtet sind (Andreopoulou et al., 2011). Nach der Immunomagnetischen Zellselektion können die CTCs mittels verschiedener Techniken detektiert werden, wie der RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion). Mit einem Testsystem der Firma AdnaGen (AdnaTest) können zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut heute etwa bei Patientinnen mit

Mammakarzinom nachgewiesen werden, um möglicherweise frühzeitige Hinweise auf ein Therapieversagen zu erhalten (Andreopoulou et al., 2011).

Gorges et al. untersuchten in einer 2012 veröffentlichten Studie Blutproben im Xenograft-Modell der Maus mit metastasierten Brustkrebs auf das Vorhandensein zirkulierender Tumorzellen (Gorges et al., 2012). Sowohl der Primärtumor als auch die Metastasen waren hier EpCAM-positiv. Dabei verglichen Gorges et al. den AdnaTest, als EpCAM-abhängige Methode, mit der Untersuchung auf EMT-assoziierte Gen-Expression der Zellen mithilfe EMT-spezifischer Assays. Es zeigte sich, dass anhand der EpCAM-abhängigen Bestimmung deutlich weniger CTCs in den Blutproben gefunden werden konnten als anhand der EMT-basierten Methode. Weiterhin konnten sie unter den CTCs eine fehlende Expression von EpCAM und die Expression mesenchymaler Marker nachweisen. Gorges et al. leiteten hieraus die Hypothese ab, dass die phänotypischen Veränderungen im Zuge der EMT und die hiermit assoziierte verminderte Expression von EpCAM für das Teilversagen des AdnaTest verantwortlich waren (Gorges et al., 2012).

Ein Therapieversagen beim Pankreaskarzinom ist auch nach erfolgreicher Tumorresektion am häufigsten auf lokale Rezidive oder Metastasen zurückzuführen (Griffin et al., 1990). Auch wenn diese Theorien noch kontrovers diskutiert werden, kommen hier als mögliche Ursache die Entstehung von CTCs oder Tumorstammzellen in Frage, von denen angenommen wird, dass sie nur bedingt durch die heutigen Standardtherapien eliminiert werden können und möglicherweise für die Entstehung von Metastasen und Sekundärtumoren auch nach erfolgreicher Entfernung des Primärtumors verantwortlich sind (Klein, 2009). Unter der Annahme, dass EpCAM letztendlich ein epitheliales Differenzierungs-Antigen und kein tumor-spezifisches Antigen ist und dass die EpCAM-Expression im Zuge der EMT und CTC-Entstehung abnimmt, könnten sinkende EpCAM-Serumwerte eventuell einen Hinweis auf die Tumorprogression und zunehmende Dedifferenzierung der Zellen geben. Möglich ist auch eine funktionelle Abnahme der EpCAM-Expression der Zellen im Zuge der EMT, in welcher EpCAM eventuell morphoregulatorische Eigenschaften zukommen.

In der vorliegenden Untersuchung konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen hohen oder niedrigen EpCAM-Serumwerten und der Gesamtüberlebenszeit der Patienten gefunden werden ($p=0,428$). Dennoch deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der Nachweis von hohen EpCAM-Serumwerten beim Pankreaskarzinom möglicherweise mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit einhergeht.

Darüber hinaus ist möglich, dass im Zuge der EMT die Proteolyse von EpCAM abnimmt, da es durch den Verlust der epithelialen Gewebeordnung möglicherweise nicht mehr zur Annäherung membranständiger EpCAM-Moleküle kommt. Somit fällt unter Umständen das von Munz et al. vermutete initiale Signal zur Proteolyse weg, die auto- bzw. parakrine Proteolyse weiterer EpCAM-Moleküle durch EpEx wird erschwert und somit nimmt die lösliche EpCAM-Menge im Serum ab (Maetzel et al., 2009). Gegen diese Vermutung sprechen jedoch die Studien, welche gezeigt haben, dass die EpCAM-Expression im Zuge der EMT abnimmt (Jojovic et al., 1998; Akita et al., 2011).

Die Tatsache, dass sich in dieser Studie zwischen den EpCAM-Serumleveln und dem Gesamtüberleben der Patienten mit Pankreaskarzinom keine signifikante Korrelation ergeben hat, könnte in der vorliegenden Studie auf die relativ geringe Fallzahl ($n=66$) zurückzuführen sein. Eine weitere prospektive Studie unter Einschluss eines größeren Patientenkollektivs könnte einen deutlicheren Hinweis darauf geben, ob eine zukünftige Bestimmung von EpCAM im Serum als prognostischer Marker sinnvoll ist. Aufgrund dieser Ergebnisse und der möglichen Fehlerquellen der bisher verfügbaren Tests scheint die klinische Bestimmung der EpCAM-Serumwerte zur Einschätzung der Prognose bis dato nicht sinnvoll.

Darüber hinaus wird die Einordnung der vorliegenden und vorangegangener Studien wohl erst mit dem weiteren Verständnis der biologischen Funktion von EpCAM möglich sein. Ob es sich bei EpCAM um ein epitheliales Differenzierungs-Antigen oder ein tumor-spezifisches Antigen handelt und welche Rollen EpCAM in Prozessen der Gewebsentwicklung und Morphogenese, Karzinogenese und Aufrechterhaltung eines malignen epithelialen Phänotyps spielt, ist noch nicht hinreichend erklärt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Expression des epithelialen Zell-Adhäsionsmoleküls EpCAM konnte in einer Vielzahl von Epithelien nachgewiesen werden. Diverse Studien geben Hinweise auf eine Überexpression von EpCAM in einigen Karzinomen, des Weiteren wird eine Beteiligung in Signaltransduktionswegen und Gewebeproliferation diskutiert. Die Daten zur Korrelation der EpCAM-Expression in Tumoren und der Prognose der Patienten sind jedoch lediglich deskriptiv und ob EpCAM hierbei onkogene oder tumorsuppressive Eigenschaften zukommen, bleibt aufgrund der ambivalenten Studienergebnisse bis dato ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Serumlevel von EpCAM verschiedener Gruppen untersucht, um Erkenntnisse zu dessen Bedeutung als diagnostischer und prognostischer Marker beim duktalem Pankreaskarzinom zu gewinnen.

Hierzu wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen, etablierten ELISA-Kits ein Sandwich-ELISA an den Serumproben von 66 Patienten mit duktalem Karzinom des Pankreas, 43 Patienten mit chronischer Pankreatitis und 104 gesunden Blutspendern durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine lösliche Form von EpCAM in allen drei Gruppen nachweisbar ist. Entgegen der Erwartungen und der bisherigen Studienlage wiesen Proben der Patienten mit Pankreaskarzinom in der vorliegenden Studie im Median die geringsten EpCAM-Serumlevel auf. Der Median der Patienten mit chronischer Pankreatitis lag etwas höher und die untersuchten Blutspender zeigten die höchsten EpCAM-Serumlevel, wobei die Unterschiede zwischen den drei untersuchten Gruppen signifikant waren. Die beste Trennschärfe von Patienten mit Pankreaskarzinom gegenüber Patienten mit chronischer Pankreatitis und Blutspendern ergab sich bei einem Schwellenwert für das EpCAM-Serumlevel von 0,442 ng/ml, wobei hier eine Sensitivität von 66,7% und eine Spezifität von 77,5% erreicht werden konnte. Eine Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter bei Patienten mit Pankreaskarzinom und den EpCAM-Serumleveln konnten wir in dieser Studie nicht nachweisen. Auch zwischen hohen oder niedrigen EpCAM-Serumwerten

und der Gesamtüberlebenszeit konnte keine statistisch signifikante Korrelation festgestellt werden.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie und der noch nicht vollständig bekannten Funktion von EpCAM erscheint die Bestimmung des EpCAM-Serumlevels zum heutigen Zeitpunkt weder als diagnostischer noch als prognostischer Marker für das Pankreaskarzinom sinnvoll.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	alpha
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
AUC	Area under curve
β	beta
BMI	body mass index
bp	Basenpaare
BRACA	breast cancer gene
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CAM(s)	cell adhesion molecule(s)
cDNA	komplimentäre DNA
CD	cluster of differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
c-myc	Transkriptionsfaktor, Protoonkogen
CT	Computertomographie
CTC	Circulating Tumor Cells
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpc	DNA protein crosslinks

EGF	epidermal growth factor
EGP	epitheliales Glykoprotein
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
EpEx	extrazelluläre Domäne von EpCAM
EpICD	intrazelluläre Domäne von EpCAM
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
Fc	crystallisable fragment
FHL2	four and a half LIM domain protein 2
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HRP	Horse-radish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
inkl.	inklusive
kDa	Kilo-Dalton
k-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
l	Liter
LDL	low density lipoprotein
Lef-1	lymphoid enhancer-binding factor 1
LIM	Akronym der Proteine LIN11, ISL1 und MEC3
L-Selektin	Lymphozyten-Selektin
μ	mikro
M	Metastasen
m	Meter / milli
mAk	monoklonaler Antikörper
MDCT	Multidetektionscomputertomographie
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
N	Stickstoff / Lymphknoten
n	nano
O	Sauerstoff
p	Protein

PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PS-2	Presenilin-2
q	langer Arm eines Chromosoms
RIP	regulierte intramembranöse Proteolyse
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
s.	siehe
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
T	Tumor
Tab.	Tabelle
TACE	Tumor-Nekrose-Faktor- α -konvertierendes –Enzym
TY	Thyreoglobulin
U	unit
UICC	Union internationale contre le cancer
USA	United States of America
usw.	und so weiter
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organisation
Wnt	wingless-type
z.B.	zum Beispiel

7 LITERATURVERZEICHNIS

- ABE, H., KUROKI, M., IMAKIIRE, T., YAMAUCHI, Y., YAMADA, H. & ARAKAWA, F. (2002) Preparation of recombinant MK-1/Ep-CAM and establishment of an ELISA system for determining soluble MK-1/Ep-CAM levels in sera of cancer patients. *J Immunol Methods*, 270, 227-33.
- ADLER, G., SEUFFERLEIN, T., BISCHOFF, S. C., BRAMBS, H. J., FEUERBACH, S., GRABENBAUER, G., HAHN, S., HEINEMANN, V., HOHENBERGER, W., LANGREHR, J. M., LUTZ, M. P., MICKE, O., NEUHAUS, H., NEUHAUS, P., OETTL, H., SCHLAG, P. M., SCHMID, R., SCHMIEGEL, W., SCHLOTTMANN, K., WERNER, J., WIEDENMANN, B. & KOPP, I. (2007) [S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer" 2007]. *Z Gastroenterol*, 45, 487-523.
- AKITA, H., NAGANO, H., TAKEDA, Y., EGUCHI, H., WADA, H., KOBAYASHI, S., MARUBASHI, S., TANEMURA, M., TAKAHASHI, H., OHIGASHI, H., TOMITA, Y., ISHIKAWA, O., MORI, M. & DOKI, Y. (2011) Ep-CAM is a significant prognostic factor in pancreatic cancer patients by suppressing cell activity. *Oncogene*, 30, 3468-76.
- ANDERSON, R., SCHAIBLE, K., HEASMAN, J. & WYLIE, C. (1999) Expression of the homophilic adhesion molecule, Ep-CAM, in the mammalian germ line. *J Reprod Fertil*, 116, 379-84.
- ANDREOPOULOU, E., YANG, L. Y., RANGEL, K. M., REUBEN, J. M., HSU, L., KRISHNAMURTHY, S., VALERO, V., FRITSCH, H. A. & CRISTOFANILLI, M. (2011) Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect versus Veridex CellSearch system. *Int J Cancer*, 130, 1590-7.
- APPELLA, E., WEBER, I. T. & BLASI, F. (1988) Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS Lett*, 231, 1-4.
- BAEUERLE, P. A. & GIRES, O. (2007) EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer*, 96, 417-23.
- BALZAR, M., BAKKER, H. A., BRIARE-DE-BRUIJN, I. H., FLEUREN, G. J., WARNAAR, S. O. & LITVINOV, S. V. (1998) Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol*, 18, 4833-43.
- BALZAR, M., BRIARE-DE BRUIJN, I. H., REES-BAKKER, H. A., PRINS, F. A., HELFRICH, W., DE LEIJ, L., RIETHMULLER, G., ALBERTI, S., WARNAAR, S. O., FLEUREN, G. J. & LITVINOV, S. V. (2001) Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol*, 21, 2570-80.
- BALZAR, M., PRINS, F. A., BAKKER, H. A., FLEUREN, G. J., WARNAAR, S. O. & LITVINOV, S. V. (1999a) The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM. *Exp Cell Res*, 246, 108-21.
- BALZAR, M., WINTER, M. J., DE BOER, C. J. & LITVINOV, S. V. (1999b) The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl)*, 77, 699-712.

- BASAK, S., SPEICHER, D., ECK, S., WUNNER, W., MAUL, G., SIMMONS, M. S. & HERLYN, D. (1998) Colorectal carcinoma invasion inhibition by CO17-1A/GA733 antigen and its murine homologue. *J Natl Cancer Inst*, 90, 691-7.
- BOHMIG, M. & ROSEWICZ, S. (2004) [Pancreatic carcinoma]. *Z Gastroenterol*, 42, 261-8.
- BRAND, R. E., LERCH, M. M., RUBINSTEIN, W. S., NEOPTOLEMOS, J. P., WHITCOMB, D. C., HRUBAN, R. H., BRETNALL, T. A., LYNCH, H. T., CANTO, M. I. & PARTICIPANTS OF THE FOURTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF INHERITED DISEASES OF THE, P. (2007) Advances in counselling and surveillance of patients at risk for pancreatic cancer. *Gut*, 56, 1460-9.
- BROWN, L. M. (2005) Epidemiology of alcohol-associated cancers. *Alcohol*, 35, 161-8.
- BUMOL, T. F., MARDER, P., DEHERDT, S. V., BOROWITZ, M. J. & APELGREN, L. D. (1988) Characterization of the human tumor and normal tissue reactivity of the KS1/4 monoclonal antibody. *Hybridoma*, 7, 407-15.
- BUXBAUM, J. L. & ELOUBEIDI, M. A. (2010) Molecular and clinical markers of pancreas cancer. *JOP*, 11, 536-44.
- CANTO, M. I. (2007) Strategies for screening for pancreatic adenocarcinoma in high-risk patients. *Semin Oncol*, 34, 295-302.
- CAPUT, D., BEUTLER, B., HARTOG, K., THAYER, R., BROWN-SHIMER, S. & CERAMI, A. (1986) Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 1670-4.
- CHONG, J. M. & SPEICHER, D. W. (2001) Determination of disulfide bond assignments and N-glycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep-CAM). *J Biol Chem*, 276, 5804-13.
- CIOFFI, M. & HEESCHEN, C. (2012) Immuno-targeting of pancreatic cancer stem cells: A new therapeutic strategy against a devastating disease? *Oncoimmunology*, 1, 560-562.
- CIRULLI, V., CRISA, L., BEATTIE, G. M., MALLY, M. I., LOPEZ, A. D., FANNON, A., PTASZNIK, A., INVERARDI, L., RICORDI, C., DEERINCK, T., ELLISMAN, M., REISFELD, R. A. & HAYEK, A. (1998) KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. *J Cell Biol*, 140, 1519-34.
- CIRULLI, V., RICORDI, C. & HAYEK, A. (1995) E-cadherin, NCAM, and EpCAM expression in human fetal pancreata. *Transplant Proc*, 27, 3335.
- CRISTOFANILLI, M., BUDD, G. T., ELLIS, M. J., STOPECK, A., MATERA, J., MILLER, M. C., REUBEN, J. M., DOYLE, G. V., ALLARD, W. J., TERSTAPPEN, L. W. & HAYES, D. F. (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 351, 781-91.
- DAVIS, C. G. (1990) The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biol*, 2, 410-9.
- DE BOER, C. J., VAN KRIEKEN, J. H., JANSSEN-VAN RHIJN, C. M. & LITVINOV, S. V. (1999) Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol*, 188, 201-6.
- DRENCKHAHN D, F. K. (2004) *Benninghoff Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*, München.

- DUELL, E. J., HOLLY, E. A., BRACCI, P. M., LIU, M., WIENCKE, J. K. & KELSEY, K. T. (2002) A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *J Natl Cancer Inst*, 94, 297-306.
- DUFFY, M. J., STURGEON, C., LAMERZ, R., HAGLUND, C., HOLUBEC, V. L., KLAPDOR, R., NICOLINI, A., TOPOLCAN, O. & HEINEMANN, V. (2010) Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report. *Ann Oncol*, 21, 441-7.
- FONG, D., STEURER, M., OBRIST, P., BARBIERI, V., MARGREITER, R., AMBERGER, A., LAIMER, K., GASTL, G., TZANKOV, A. & SPIZZO, G. (2008) Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance. *J Clin Pathol*, 61, 31-5.
- FORSMARK, C. E., LAMBIASE, L. & VOGEL, S. B. (1994) Diagnosis of pancreatic cancer and prediction of unresectability using the tumor-associated antigen CA19-9. *Pancreas*, 9, 731-4.
- GASTL, G., SPIZZO, G., OBRIST, P., DUNSER, M. & MIKUZ, G. (2000) Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet*, 356, 1981-2.
- GEER, R. J. & BRENNAN, M. F. (1993) Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg*, 165, 68-72; discussion 72-3.
- GOGGINS, M. (2005) Molecular markers of early pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, 23, 4524-31.
- GOLD, P. & FREEDMAN, S. O. (1965) Demonstration of Tumor-Specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques. *J Exp Med*, 121, 439-62.
- GORGES, T. M., TINHOFER, I., DROSCH, M., ROSE, L., ZOLLNER, T. M., KRAHN, T. & VON AHSEN, O. (2012) Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 12, 178.
- GOSENS, M. J., VAN KEMPEN, L. C., VAN DE VELDE, C. J., VAN KRIEKEN, J. H. & NAGTEGAAL, I. D. (2007) Loss of membranous Ep-CAM in budding colorectal carcinoma cells. *Mod Pathol*, 20, 221-32.
- GRIFFIN, J. F., SMALLEY, S. R., JEWELL, W., PARADELO, J. C., REYMOND, R. D., HASSANEIN, R. E. & EVANS, R. G. (1990) Patterns of failure after curative resection of pancreatic carcinoma. *Cancer*, 66, 56-61.
- HEISS, M. M., MURAWA, P., KORALEWSKI, P., KUTARSKA, E., KOLESNIK, O. O., IVANCHENKO, V. V., DUDNICHENKO, A. S., ALEKNAVICIENE, B., RAZBADAUSKAS, A., GORE, M., GANEA-MOTAN, E., CIULEANU, T., WIMBERGER, P., SCHMITTEL, A., SCHMALFELDT, B., BURGESS, A., BOKEMEYER, C., LINDHOFER, H., LAHR, A. & PARSONS, S. L. (2010) The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: Results of a prospective randomized phase II/III trial. *Int J Cancer*, 127, 2209-21.
- HERMANN, P. C., HUBER, S. L., HERRLER, T., AICHER, A., ELLWART, J. W., GUBA, M., BRUNS, C. J. & HEESCHEN, C. (2007) Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 1, 313-23.
- HIGH, A. S., ROBINSON, P. A. & KLEIN, C. E. (1996) Increased expression of a 38kd cell-surface glycoprotein MH99 (KS 1/4) in oral mucosal dysplasias. *J Oral Pathol Med*, 25, 10-3.

- HOPKINS, C. R. (1992) Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter. *Trends Biochem Sci*, 17, 27-32.
- HRUBAN, R. H., TAKAORI, K., KLIMSTRA, D. S., ADSAY, N. V., ALBORES-SAAVEDRA, J., BIANKIN, A. V., BIANKIN, S. A., COMPTON, C., FUKUSHIMA, N., FURUKAWA, T., GOGGINS, M., KATO, Y., KLOPPEL, G., LONGNECKER, D. S., LUTTGES, J., MAITRA, A., OFFERHAUS, G. J., SHIMIZU, M. & YONEZAWA, S. (2004) An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 28, 977-87.
- JEMAL, A., SIEGEL, R., XU, J. & WARD, E. (2012) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 60, 277-300.
- JOJOVIC, M., ADAM, E., ZANGEMEISTER-WITTKE, U. & SCHUMACHER, U. (1998) Epithelial glycoprotein-2 expression is subject to regulatory processes in epithelial-mesenchymal transitions during metastases: an investigation of human cancers transplanted into severe combined immunodeficient mice. *Histochem J*, 30, 723-9.
- KASPER, M., BEHRENS, J., SCHUH, D. & MULLER, M. (1995) Distribution of E-cadherin and Ep-CAM in the human lung during development and after injury. *Histochem Cell Biol*, 103, 281-6.
- KATOH, S., MIYAGI, T., TANIGUCHI, H., MATSUBARA, Y., KADOTA, J., TOMINAGA, A., KINCADE, P. W., MATSUKURA, S. & KOHNO, S. (1999) Cutting edge: an inducible sialidase regulates the hyaluronic acid binding ability of CD44-bearing human monocytes. *J Immunol*, 162, 5058-61.
- KIM, J. E., LEE, K. T., LEE, J. K., PAIK, S. W., RHEE, J. C. & CHOI, K. W. (2004) Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population. *J Gastroenterol Hepatol*, 19, 182-6.
- KIMURA, H., KATO, H., FARIED, A., SOHDA, M., NAKAJIMA, M., FUKAI, Y., MIYAZAKI, T., MASUDA, N., FUKUCHI, M. & KUWANO, H. (2007) Prognostic significance of EpCAM expression in human esophageal cancer. *Int J Oncol*, 30, 171-9.
- KLEIN, C. A. (2009) Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*, 9, 302-12.
- KLÖPPEL G., S. E., LONGNECKER D.S., CAPELLA C., SOBIN L.H (1996) *Histological typing of tumors of the exocrine pancreas. World Health Organization. International Histological Classification of Tumors.*
- KOPROWSKI, H., STEPLEWSKI, Z., MITCHELL, K., HERLYN, M., HERLYN, D. & FUHRER, P. (1979) Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet*, 5, 957-71.
- LAPIDOT, T., SIRARD, C., VORMOOR, J., MURDOCH, B., HOANG, T., CACERES-CORTES, J., MINDEN, M., PATERSON, B., CALIGIURI, M. A. & DICK, J. E. (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367, 645-8.
- LI, C., HEIDT, D. G., DALERBA, P., BURANT, C. F., ZHANG, L., ADSAY, V., WICHA, M., CLARKE, M. F. & SIMEONE, D. M. (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 67, 1030-7.
- LINNENBACH, A. J., SENG, B. A., WU, S., ROBBINS, S., SCOLLON, M., PYRC, J. J., DRUCK, T. & HUEBNER, K. (1993) Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol*, 13, 1507-15.
- LINNENBACH, A. J., WOJCIEROWSKI, J., WU, S. A., PYRC, J. J., ROSS, A. H., DIETZSCHOLD, B., SPEICHER, D. & KOPROWSKI, H. (1989) Sequence

- investigation of the major gastrointestinal tumor-associated antigen gene family, GA733. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 27-31.
- LITVINOV, S. V., BALZAR, M., WINTER, M. J., BAKKER, H. A., BRIAIRE-DE BRUIJN, I. H., PRINS, F., FLEUREN, G. J. & WARNAAR, S. O. (1997) Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol*, 139, 1337-48.
- LITVINOV, S. V., VAN DRIEL, W., VAN RHIJN, C. M., BAKKER, H. A., VAN KRIEKEN, H., FLEUREN, G. J. & WARNAAR, S. O. (1996) Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol*, 148, 865-75.
- LITVINOV, S. V., VELDERS, M. P., BAKKER, H. A., FLEUREN, G. J. & WARNAAR, S. O. (1994) Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, 125, 437-46.
- MAETZEL, D., DENZEL, S., MACK, B., CANIS, M., WENT, P., BENK, M., KIEU, C., PAPIOR, P., BAEUERLE, P. A., MUNZ, M. & GIRES, O. (2009) Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol*, 11, 162-71.
- MAHESHWARI, G., BROWN, G., LAUFFENBURGER, D. A., WELLS, A. & GRIFFITH, L. G. (2000) Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J Cell Sci*, 113 (Pt 10), 1677-86.
- MANI, S. A., GUO, W., LIAO, M. J., EATON, E. N., AYYANAN, A., ZHOU, A. Y., BROOKS, M., REINHARD, F., ZHANG, C. C., SHIPITSIN, M., CAMPBELL, L. L., POLYAK, K., BRISKEN, C., YANG, J. & WEINBERG, R. A. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133, 704-15.
- MANN, K., DEUTZMANN, R., AUMAILLEY, M., TIMPL, R., RAIMONDI, L., YAMADA, Y., PAN, T. C., CONWAY, D. & CHU, M. L. (1989) Amino acid sequence of mouse nidogen, a multidomain basement membrane protein with binding activity for laminin, collagen IV and cells. *EMBO J*, 8, 65-72.
- MCWILLIAMS, R. R., RABE, K. G., OLSWOLD, C., DE ANDRADE, M. & PETERSEN, G. M. (2005) Risk of malignancy in first-degree relatives of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer*, 104, 388-94.
- MIMURA, Y., SONDERMANN, P., GHIRLANDO, R., LUND, J., YOUNG, S. P., GOODALL, M. & JEFFERIS, R. (2001) Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding. *J Biol Chem*, 276, 45539-47.
- MOMBURG, F., MOLDENHAUER, G., HAMMERLING, G. J. & MOLLER, P. (1987) Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res*, 47, 2883-91.
- MUNZ, M., BAEUERLE, P. A. & GIRES, O. (2009) The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res*, 69, 5627-9.
- MUNZ, M., FELLINGER, K., HOFMANN, T., SCHMITT, B. & GIRES, O. (2008) Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM. *Front Biosci*, 13, 5195-201.
- NEOPTOLEMOS, J. P., STOCKEN, D. D., FRIESS, H., BASSI, C., DUNN, J. A., HICKEY, H., BEGER, H., FERNANDEZ-CRUZ, L., DERVENIS, C., LACAINE, F., FALCONI, M., PEDERZOLI, P., PAP, A., SPOONER, D., KERR, D. J. & BUCHLER, M. W. (2004) A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 350, 1200-10.

- NI, X. G., BAI, X. F., MAO, Y. L., SHAO, Y. F., WU, J. X., SHAN, Y., WANG, C. F., WANG, J., TIAN, Y. T., LIU, Q., XU, D. K. & ZHAO, P. (2005) The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol*, 31, 164-9.
- NOVINEC, M., KORDIS, D., TURK, V. & LENARCIC, B. (2006) Diversity and evolution of the thyroglobulin type-1 domain superfamily. *Mol Biol Evol*, 23, 744-55.
- NUBEL, T., PREOBRASCHENSKI, J., TUNCAY, H., WEISS, T., KUHN, S., LADWEIN, M., LANGBEIN, L. & ZOLLER, M. (2009) Claudin-7 regulates EpCAM-mediated functions in tumor progression. *Mol Cancer Res*, 7, 285-99.
- OETTL, H., POST, S., NEUHAUS, P., GELLERT, K., LANGREHR, J., RIDWELSKI, K., SCHRAMM, H., FAHLKE, J., ZUELKE, C., BURKART, C., GUTBERLET, K., KETTNER, E., SCHMALENBERG, H., WEIGANG-KOEHLER, K., BECHSTEIN, W. O., NIEDERGETHMANN, M., SCHMIDT-WOLF, I., ROLL, L., DOERKEN, B. & RIESS, H. (2007) Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, 297, 267-77.
- OKEGAWA, T., PONG, R. C., LI, Y. & HSIEH, J. T. (2004) The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol*, 51, 445-57.
- PALAGANI, V., EL KHATIB, M., KOSSATZ, U., BOZKO, P., MULLER, M. R., MANNS, M. P., KRECH, T., MALEK, N. P. & PLENTZ, R. R. (2012) Epithelial Mesenchymal Transition and Pancreatic Tumor Initiating CD44+/EpCAM+ Cells Are Inhibited by gamma-Secretase Inhibitor IX. *PLoS One*, 7, e46514.
- PATEL, A. V., RODRIGUEZ, C., BERNSTEIN, L., CHAO, A., THUN, M. J. & CALLE, E. E. (2005) Obesity, recreational physical activity, and risk of pancreatic cancer in a large U.S. Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14, 459-66.
- PAULI, C., MUNZ, M., KIEU, C., MACK, B., BREINL, P., WOLLENBERG, B., LANG, S., ZEIDLER, R. & GIRES, O. (2003) Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett*, 193, 25-32.
- PEREZ, M. S. & WALKER, L. E. (1989) Isolation and characterization of a cDNA encoding the KS1/4 epithelial carcinoma marker. *J Immunol*, 142, 3662-7.
- PETRUZZELLI, L., TAKAMI, M. & HUMES, H. D. (1999) Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med*, 106, 467-76.
- PETSCH, S., GIRES, O., RUTTINGER, D., DENZEL, S., LIPPOLD, S., BAEUERLE, P. A. & WOLF, A. (2011) Concentrations of EpCAM ectodomain as found in sera of cancer patients do not significantly impact redirected lysis and T-cell activation by EpCAM/CD3-bispecific BiTE antibody MT110. *MAbs*, 3, 31-7.
- RADAEV, S. & SUN, P. D. (2001) Recognition of IgG by Fc gamma receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *J Biol Chem*, 276, 16478-83.
- RAO, C. G., CHIANESE, D., DOYLE, G. V., MILLER, M. C., RUSSELL, T., SANDERS, R. A., JR. & TERSTAPPEN, L. W. (2005) Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int J Oncol*, 27, 49-57.
- ROSEN, J. M. & JORDAN, C. T. (2009) The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science*, 324, 1670-3.
- RUDZKI, Z. & JOTHY, S. (1997) CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *Mol Pathol*, 50, 57-71.

- RUF, P., GIRES, O., JAGER, M., FELLINGER, K., ATZ, J. & LINDHOFER, H. (2007) Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *Br J Cancer*, 97, 315-21.
- SAIF, M. W. (2007) Controversies in the adjuvant treatment of pancreatic adenocarcinoma. *JOP*, 8, 545-52.
- SAIF, M. W. (2011) Pancreatic neoplasm in 2011: an update. *JOP*, 12, 316-21.
- SCHIECHL, H. & DOHR, G. (1987) Immunohistochemical studies of the distribution of a basolateral-membrane protein in intestinal epithelial cells (GZ1-Ag) in rats using monoclonal antibodies. *Histochemistry*, 87, 491-8.
- SCHIECHL, H., DOHR, G. & EHERER, A. (1986) Immunohistochemical localization and characterization of a protein from the basolateral membrane of rat small intestine epithelium using monoclonal antibody GZ-1. *J Histochem Cytochem*, 34, 1659-65.
- SCHIMA, W., BA-SSALAMAH, A., KOLBLINGER, C., KULINNA-COSENTINI, C., PUESPOEK, A. & GOTZINGER, P. (2007) Pancreatic adenocarcinoma. *Eur Radiol*, 17, 638-49.
- SCHISTERMAN, E. F., PERKINS, N. J., LIU, A. & BONDELL, H. (2005) Optimal cut-point and its corresponding Youden Index to discriminate individuals using pooled blood samples. *Epidemiology*, 16, 73-81.
- SCHLIEMAN, M. G., HO, H. S. & BOLD, R. J. (2003) Utility of tumor markers in determining resectability of pancreatic cancer. *Arch Surg*, 138, 951-5; discussion 955-6.
- SCHMETZER, O., MOLDENHAUER, G., NICOLAOU, A., SCHLAG, P., RIESENBERG, R. & PEZZUTTO, A. (2012) Detection of circulating tumor-associated antigen depends on the domains recognized by the monoclonal antibodies used: N-terminal trimmed EpCAM-levels are much higher than untrimmed forms. *Immunol Lett*, 143, 184-92.
- SCHMIDT, M., HASENCLEVER, D., SCHAEFFER, M., BOEHM, D., COTARELO, C., STEINER, E., LEBRECHT, A., SIGGELKOW, W., WEIKEL, W., SCHIFFER-PETRY, I., GEBHARD, S., PILCH, H., GEHRMANN, M., LEHR, H. A., KOELBL, H., HENGSTLER, J. G. & SCHULER, M. (2008) Prognostic effect of epithelial cell adhesion molecule overexpression in untreated node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 5849-55.
- SELIGSON, D. B., PANTUCK, A. J., LIU, X., HUANG, Y., HORVATH, S., BUI, M. H., HAN, K. R., CORREA, A. J., EEVA, M., TZE, S., BELLDEGRUN, A. S. & FIGLIN, R. A. (2004) Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10, 2659-69.
- SHAW, G. & KAMEN, R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, 46, 659-67.
- SIMON, B., PODOLSKY, D. K., MOLDENHAUER, G., ISSELBACHER, K. J., GATTONI-CELLI, S. & BRAND, S. J. (1990) Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 2755-9.
- SOHN, T. A., YEO, C. J., CAMERON, J. L., KONIARIS, L., KAUSHAL, S., ABRAMS, R. A., SAUTER, P. K., COLEMAN, J., HRUBAN, R. H. & LILLEMOR, K. D. (2000) Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg*, 4, 567-79.

- SONGUN, I., LITVINOV, S. V., VAN DE VELDE, C. J., PALS, S. T., HERMANS, J. & VAN KRIEKEN, J. H. (2005) Loss of Ep-CAM (CO17-1A) expression predicts survival in patients with gastric cancer. *Br J Cancer*, 92, 1767-72.
- SPIZZO, G., WENT, P., DIRNHOFER, S., OBRIST, P., SIMON, R., SPICHTIN, H., MAURER, R., METZGER, U., VON CASTELBERG, B., BART, R., STOPATSCHINSKAYA, S., KOCHLI, O. R., HAAS, P., MROSS, F., ZUBER, M., DIETRICH, H., BISCHOFF, S., MIRLACHER, M., SAUTER, G. & GASTL, G. (2004) High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 86, 207-13.
- STEINBERG, W. (1990) The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol*, 85, 350-5.
- STINGL, J., EAVES, C. J., ZANDIEH, I. & EMERMAN, J. T. (2001) Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*, 67, 93-109.
- STOECKLEIN, N. H., SIEGMUND, A., SCHEUNEMANN, P., LUEBKE, A. M., ERBERSDOBLER, A., VERDE, P. E., EISENBERGER, C. F., PEIPER, M., REHDERS, A., ESCH, J. S., KNOEFEL, W. T. & HOSCH, S. B. (2006) Ep-CAM expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker. *BMC Cancer*, 6, 165.
- STUBKE, K., WICKLEIN, D., HERICH, L., SCHUMACHER, U. & NEHMANN, N. (2012) Selectin-deficiency reduces the number of spontaneous metastases in a xenograft model of human breast cancer. *Cancer Lett*, 321, 89-99.
- SZALA, S., FROELICH, M., SCOLLON, M., KASAI, Y., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H. & LINNENBACH, A. J. (1990) Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA733-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 3542-6.
- TALAMINI, G., BASSI, C., FALCONI, M., SARTORI, N., SALVIA, R., RIGO, L., CASTAGNINI, A., DI FRANCESCO, V., FRULLONI, L., BOVO, P., VAONA, B., ANGELINI, G., VANTINI, I., CAVALLINI, G. & PEDERZOLI, P. (1999) Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis Sci*, 44, 1303-11.
- THAMPOE, I. J., NG, J. S. & LLOYD, K. O. (1988) Biochemical analysis of a human epithelial surface antigen: differential cell expression and processing. *Arch Biochem Biophys*, 267, 342-52.
- THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. & NIETO, M. A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-90.
- TREBAK, M., BEGG, G. E., CHONG, J. M., KANAZIREVA, E. V., HERLYN, D. & SPEICHER, D. W. (2001) Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein GA733-2 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. *J Biol Chem*, 276, 2299-309.
- TRZPIS, M., MCLAUGHLIN, P. M., DE LEIJ, L. M. & HARMSSEN, M. C. (2007) Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol*, 171, 386-95.
- VAN DER GUN, B. T., MELCHERS, L. J., RUITERS, M. H., DE LEIJ, L. F., MCLAUGHLIN, P. M. & ROTS, M. G. (2010) EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis*, 31, 1913-21.
- VARGA, M., OBRIST, P., SCHNEEBERGER, S., MUHLMANN, G., FELGEL-FARNHOLZ, C., FONG, D., ZITT, M., BRUNHUBER, T., SCHAFFER, G., GASTL, G. & SPIZZO, G. (2004) Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin Cancer Res*, 10, 3131-6.

- WATANABE, I., SASAKI, S., KONISHI, M., NAKAGOHRI, T., INOUE, K., ODA, T. & KINOSHITA, T. (2004) Onset symptoms and tumor locations as prognostic factors of pancreatic cancer. *Pancreas*, 28, 160-5.
- WENT, P., DIRNHOFER, S., SALVISBERG, T., AMIN, M. B., LIM, S. D., DIENER, P. A. & MOCH, H. (2005) Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCam) in renal epithelial tumors. *Am J Surg Pathol*, 29, 83-8.
- WHITCOMB, D. C. & POGUE-GEILE, K. (2002) Pancreatitis as a risk for pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 31, 663-78.
- WINTER, M. J., NAGELKERKEN, B., MERTENS, A. E., REES-BAKKER, H. A., BRIAIRE-DE BRUIJN, I. H. & LITVINOV, S. V. (2003) Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res*, 285, 50-8.
- YAMASHITA, T., JI, J., BUDHU, A., FORGUES, M., YANG, W., WANG, H. Y., JIA, H., YE, Q., QIN, L. X., WAUTHIER, E., REID, L. M., MINATO, H., HONDA, M., KANEKO, S., TANG, Z. Y. & WANG, X. W. (2009) EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*, 136, 1012-24.
- ZORZOS, J., ZIZI, A., BAKIRAS, A., PECTASIDIS, D., SKARLOS, D. V., ZORZOS, H., ELEMENOGLOU, J. & LIKOURINAS, M. (1995) Expression of a cell surface antigen recognized by the monoclonal antibody AUA1 in bladder carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur Urol*, 28, 251-4.

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Maximilian Bockhorn, dem geschäftsführenden Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Eppendorf in Hamburg, für die freundliche Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und die zügige Begutachtung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Florian Gebauer für die motivierende Betreuung dieser Arbeit, die anregenden Diskussionen und außerordentliche Unterstützung. Lieber Florian, herzlichen Dank!

Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki, ärztlicher Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und der technischen Geräte seines Labors.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern des allgemeinchirurgischen und hepatobiliären Labors des UKE-Hamburg, welche mir mit technischem Rat und bei praktischen Fragen stets als Ansprechpartner zur Verfügung standen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung danken.

9 LEBENSLAUF

10 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: