

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

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

Die Rolle der Expression von CXCR 4, E-Cadherin, Midkin, Periostin  
und CD 45 bei Leber- und Lymphknotenmetastasierung  
von Patienten mit Adenokarzinomen des Ösophagus

## **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Timo Strohm aus Hamburg

Hamburg 2020

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 20.11.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Ronald Simon

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Jakob Izbicki

# Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung .....	1
2	Einleitung .....	2
2.1	Allgemeines über Karzinome des Ösophagus.....	2
2.1.1	Epidemiologie .....	3
2.1.2	Risikofaktoren.....	4
2.1.3	Tumorentstehung .....	5
2.1.4	Symptome und Diagnostik.....	6
2.1.5	Therapie und Prognose .....	6
2.2	Zelladhäsion .....	9
2.2.1	Zelladhäsion bei Tumoren .....	10
2.2.2	CXCR 4.....	13
2.2.3	Cadherin und E-Cadherin .....	13
2.2.4	Midkin.....	15
2.2.5	Periostin .....	16
2.2.6	CD45 .....	17
3	Material und Methoden .....	19
3.1	Probenmerkmale und Patientenkollektiv .....	19
3.2	TMA .....	20
3.3	Immunhistochemische Färbung .....	23
2.4	Vorbereitung und Färbung der Schnitte.....	24
2.5	Auswertung .....	28
2.6	Statistische Auswertung.....	29
3	Ergebnisse.....	30
3.1	CXCR4.....	30
3.1.1	Primärtumor .....	31
3.1.2	Leberbiopsie.....	32

3.1.3	Lymphknotenmetastase .....	33
3.1.3	Tumorfreie Lymphknoten.....	34
3.2	E-Cadherin .....	35
3.2.1	Primärtumor .....	35
3.2.2	Leberbiopsie.....	36
3.2.3	Lymphknotenmetastase .....	37
3.2.3	Tumorfreie Lymphknoten.....	38
3.3	Midkin.....	39
3.3.1	Primärtumor.....	40
3.3.2	Leberbiopsie .....	41
3.3.3	Lymphknotenmetastasen .....	42
3.3.4	Tumorfreie Lymphknoten .....	43
3.4	Periostin.....	44
3.4.1	Primärtumor.....	45
3.4.2	Leberbiopsie .....	46
3.4.3	Lymphknotenmetastase .....	47
3.4.4	Tumorfreie Lymphknoten .....	48
3.5	CD 45 .....	49
3.5.1	Primärtumor.....	50
3.5.2a	Leberbiopsie .....	51
3.5.2b	Leberbiopsie alternative Einteilung in 3 Farbstufen .....	52
3.5.3	Lymphknotenmetastase .....	53
3.5.4	Tumorfreie Lymphknoten .....	54
4	Diskussion .....	55
5	Zusammenfassung .....	65
6	Abkürzungsverzeichnis .....	67
7	Literaturverzeichnis .....	68
8	Abbildungsverzeichnis .....	78

9	Danksagung .....	79
10	Lebenslauf.....	80
11	Eidesstattliche Erklärung .....	81

# 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Adenokarzinom des Ösophagus ist ein äußerst aggressiver Tumor mit hohem Metastasierungspotential, der häufig in die Leber metastasiert. Diese Arbeit befasst sich mit der Frage: Was begünstigt das Homing bei Leber- und Lymphknotenmetastasen des Adenokarzinoms des Ösophagus?

Es werden die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4, des Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin, des Wachstumsfaktors Midkin, des Matrix Protein Periostin und des Oberflächenmolekül CD 45 untersucht. Aufgrund der heutigen Datenlage scheint jedes dieser Moleküle eine bestimmte Rolle im Metastasierungsprozess von Tumoren zu spielen.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die Hypothese, dass die Expression der Moleküle CXCR4, E-Cadherin, Midkin, Periostin und CD 45 im Primärtumor und den Zielorganen einer möglichen Metastasierung (im untersuchten Fall die Leber und die paraösophagealen Lymphknoten), einen Einfluss auf die Metastasierung und hierüber auf das Gesamtüberleben der Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus haben. Zum einen soll die Frage geklärt werden welchen Einfluss das Ausmaß der Expressionen oben genannter Moleküle im Primärtumor auf die Gesamtüberlebenszeit der nachverfolgten Patienten hat.

Ein besonderer Fokus liegt jedoch auf der Beurteilung des Einflusses der entsprechenden Molekülexpressionen in den Leberproben. Unter der Vermutung das eine Metastasierung mit einer Veränderung der Molekül Expression einhergeht oder sogar dieser vorausgeht.

Hierfür wurden zum einen Leberproben mit nachgewiesenen Metastasen als auch Leberproben ohne Metastasen untersucht.

Des Weiteren erfolgt eine Beurteilung ob eine veränderte Expression der untersuchten Moleküle in den Lymphknoten ebenfalls einen Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit haben könnte.

## 2 Einleitung

Die folgende experimentelle Arbeit aus dem Bereich der onkologisch chirurgischen Forschung beschäftigt sich mit der Metastasierung des Adenokarzinoms (im Folgenden AK) des Ösophagus in Leber und Lymphknoten. Es hat sich bereits gezeigt, dass kurativ operierte Patienten, denen 20 und mehr Lymphknoten entnommen wurden, eine bessere Überlebensrate aufweisen (Porschen et al. 2015). Genaue Kenntnisse über die Expression und Funktion der Adhäsions- und Zelloberflächenmoleküle im Ursprungsgewebe sowie im Zielgewebe möglicher Metastasen könnten die Therapie des AK optimieren. Aufbauend auf vorherige Studien, die gezeigt haben, dass die Zelladhäsions- und Oberflächenmoleküle E-Cadherin, CD45, Periostin, Midkin und der Chemokinerezeptor CXCR4 bei der Metastasierung von Tumoren eine Rolle spielen (Michaylira et al. 2010, Böcker 2004, Koide et al. 1998, Winter et al. 2008, Hong et al. 2013, Müller et al. 2001, Kaifi et al. 2005, DeVita et al. 2004, Wang et al. 2013, Rauser et al. 2010, Enomoto et al. 2012), soll nun der Einfluss unterschiedlich starker Expressionen dieser Moleküle auf die Gesamtüberlebenszeit von Patienten mit distalem AK der Speiseröhre untersucht werden. Ziel dieser Arbeit ist es, unterschiedliche Expressionsmuster oben genannter Moleküle im Leber- und Lymphknotengewebe nachzuweisen und zu überprüfen, ob es eine Korrelation zur Gesamtüberlebenszeit der Patienten gibt. Günstigenfalls ergeben sich hieraus diagnostische und therapeutische Konsequenzen, die zu einer Verbesserung der Therapie des AK des Ösophagus führen. Die Ergebnisse dieser Studie sind nach wissenschaftlicher Überprüfung auch auf weitere Organe und deren Krebserkrankungen anwendbar oder können bei der Konzeption weiterer experimenteller Forschungsvorhaben hilfreich sein.

### 2.1 Allgemeines über Karzinome des Ösophagus

Histologisch gesehen sind der Großteil (ca. 96%) der Karzinome der Speiseröhre entweder Plattenepithelkarzinome (57%) (im Folgenden kurz PK) oder Adenokarzinome (39%) (Siewert et al. 2006). PK finden sich über die gesamte Länge der Speiseröhre verteilt. Hingegen sind AK fast ausschließlich im distalen Anteil des Ösophagus vorzufinden, da sie in der Regel auf dem Boden einer erworbenen Zylinderzellmetaplasie entstehen (Dietel et al. 2012, Brown et al. 2008, Porschen et al. 2015). Nach der TNM Klassifikation von 2010 werden die Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs (im Folgenden AEG genannt), deren Tumorzentrum in einem Abstand von 5 cm

zum gastroösophagealen Übergang liegt, und welche in Richtung des Ösophagus wachsen, als Ösophaguskarzinome klassifiziert (Dietel et al. 2012). Adenokarzinome entstehen in typischer Weise in einem Endobrachyösophagus (Barrett-Ösophagus), machen heute in Nordamerika und Teilen Europas etwa 50% der Ösophaguskarzinome aus und zeigen im Gegensatz zu Plattenepithelkarzinomen eine ansteigende Inzidenz. Fast ausschließlich handelt es sich bei Adenokarzinomen um Barrett-Karzinome des distalen Ösophagus (Siewert et al. 2012). Obwohl die 5-Jahres-Prognose durch stetig weiterentwickelte Diagnostik und Therapieoptionen in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert wurde, ist die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit beim AK mit aktuell 20% im Vergleich zu den meisten anderen Tumoren weiterhin sehr schlecht. (Nimptsch 2015, Siewert et al. 2012). Das liegt vor allem daran, dass sich bei Diagnostikstellung beinahe 50% der Tumoren bereits in einem fortgeschrittenen kurativ inoperablen Zustand befinden (Siewert et al. 2012).

### **2.1.1 Epidemiologie**

Die Bedeutung des distalen Adenokarzinoms des Ösophagus ist, trotz relativ geringer Prävalenz, nicht zu unterschätzen, da es sich um einen der am schnellsten häufiger werdenden Tumoren der letzten Jahrzehnte handelt (Behrens et al. 2011). Es bestehen starke Schwankungen der Inzidenz zwischen verschiedenen Ländern, wobei das AK des Ösophagus besonders häufig bei der kaukasischen Bevölkerung Nordamerikas, Europas und Australiens auftritt. Die meisten Autoren (z.B. Brown et al.2008) geben für die USA einen Anteil der AK von über 50% an allen Ösophaguskarzinomen an. In den USA konnten (Pera et al. 1993) im Einzugsgebiet der Mayo Klinik eine im Zeitraum von 1970 - 1990 um das Fünffache gestiegene Inzidenz feststellen. Laut Harrisons sind bei der weißen Bevölkerung der USA über 70% der auftretenden Speiseröhrenkrebs Adenokarzinome. In Europa und Deutschland ist die Prävalenz geringer; Es handelt es sich bei ca. 20-40% der Ösophaguskarzinome um Adenokarzinome (Dietel et al. 2012, Brown et al.2008, Siewert et al. 2006). Es zeigt sich jedoch auch in Deutschland und Europa eine rasche Verschiebung der Verteilung mit starker Zunahme der AK (Bollschweiler et al. 2000).



### 2.1.2 Risikofaktoren

Risikofaktoren für die Entwicklung eines distalen Ösophaguskarzinoms sind Reflux, Adipositas (Nimptsch und Pischon 2015), Rauchen und Diabetes mellitus. Eine *Helicobacter pylorus* Infektion dagegen erscheint einen protektiven Effekt zu haben (Aaltonen und Hamilton 2000, Chow et al. 1998). Die steigende Inzidenz in weiten Teilen der Welt ist vermutlich am stärksten mit der raschen Zunahme von Adipositas in der Bevölkerung vergesellschaftet, sowie mit dem dadurch bedingten Reflux (Dietel et al. 2012, Corley et al. 2006). In den USA ist die weiße Bevölkerung deutlich häufiger vom AK betroffen als die afroamerikanische Population, obwohl diese Diskrepanz nicht durch andere Risikofaktoren (z. B. durch den BMI) zu erklären ist. Dies legt eine genetische Disposition nahe. Ösophaguskarzinome, sowohl Plattenepithel- als auch Adenokarzinome, treten deutlich häufiger bei Männern mit einer Geschlechterverteilung von ca. 8:1 auf (Bollschweiler et al. 2000). Beim Adenokarzinom wird für die USA ein Geschlechterverhältnis von 7:1 bis 6:1 angenommen (Dietel et al. 2012, Brown et al.). Das AK des distalen Ösophagus ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters mit einem Häufigkeitsgipfel um das 65. Lebensjahr (Aaltonen und Hamilton 2000). Der wichtigste Risikofaktor für das Auftreten eines ösophagealen Adenokarzinoms ist die gastroösophageale Refluxkrankheit (im Folgenden kurz GERD). Diese wird z.B. verursacht durch eine Hiatushernie, erhöhten intraabdominellen Druck, eine Kardiainsuffizienz oder die Einnahme von Sphinktertonus senkenden Medikamenten. „Bei einer Vielzahl anderer Medikamente, die in der Lage sind, den Druck im unteren Ösophagus-Sphinkter zu senken, wie Anticholinergika,  $\beta$ -Mimetika, -Rezeptor-Antagonisten, Bronchodilatoren, Calciumkanalblocker, Narkotika und Antihistaminika, ist der Verbrauch innerhalb der letzten 30 bis 40 Jahre stark angestiegen. Dieser Mechanismus könnte auch an der steigenden Inzidenz des Adenokarzinoms ursächlich beteiligt sein “ (Bollschweiler et al. 2000). Zahlreiche Studien (z.B. Chak 2009, McTiernan 2006, Wu et al. 2001) weisen darauf hin, dass Übergewicht, welches definiert ist als ein BMI über  $30 \text{ kg/m}^2$ , als Risikofaktor für die Entwicklung eines Barrett-Ösophagus sowie eines Adenokarzinoms im Bereich des Ösophagus oder der Kardia gilt. Zu diskutieren ist, ob es sich bei dem Übergewicht um einen eigenständigen Risikofaktor handelt, oder ob die GERD als Folge der Adipositas der eigentliche Risikofaktor ist. Das Risiko steigt mit der Schwere und Dauer des Übergewichts. Auch gilt eine ungesunde Ernährung, welche häufig in einem Übergewicht resultiert, als mögli-

cher eigenständiger Risikofaktor für die Entstehung eines AK des Ösophagus. So begünstigen insbesondere eine späte und übermäßige Nahrungsaufnahme und der Konsum von Kaffee den nächtlichen Reflux. Obst- und gemüsereiche Ernährung scheint hingegen einen protektiven Effekt zu haben (McTiernan 2006). Zudem scheint eine Infektion mit *Helicobacter pylori* einen protektiven Effekt bezüglich des Adenokarzinoms des Ösophagus zu haben (Chow et al. 1998). Ursächlich hierfür ist vermutlich ein neuroimmunologischer Effekt, der zu einer Reduktion des GERD führt (Shahabi et al. 2008). Rauchen und Alkoholabusus spielen im Vergleich zum PK eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung des AK (El-Serag 2009).

### **2.1.3 Tumorentstehung**

Durch wiederholte Schädigung des Plattenepithels des unteren Ösophagus, z.B. im Rahmen einer GERD sowie eines Refluxes von Sekret aus dem Duodenum mit biliären und pankreatischen Enzymen kommt es zu einer Umwandlung des Plattenepithels in ein Zylinderepithel. Diese intestinale Metaplasie, auch Barrettmetaplasie, ist die Grundlage der Karzinomentstehung (Aaltonen und Hamilton 2000). Je länger und wiederholter die Schädigung des Epithels auftritt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines AK der Speiseröhre. Bei schwerer GERD ist das Risiko bis zu 43,5-mal höher im Vergleich zu einer Person ohne GERD, die bei moderatem Reflux ein ca. 7-8-mal höheres Risiko hat (Aaltonen und Hamilton 2000). Patienten mit einer Barrettmetaplasie haben ein ca. 0,5-1%iges jährliches Risiko für die Entwicklung eines AK der Speiseröhre (Shaheen und Ransohoff 2002, Siewert et al. 2012). Bei ca. 10% der Barrettmetaplasien findet man intraepitheliale Neoplasien, also neoplastische Prozesse, die sich auf die Epithelschicht beschränken. Es zeigt sich, dass sich bereits frühzeitig in der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz Veränderungen an den Tumorsuppressorgenen P53 und CDKN2A zeigen, wobei P53 häufig von Transitions-Mutationen betroffen ist und CDKN2A von Hypermethylation des P16-Promotors (Aaltonen und Hamilton 2000). Beim invasiven AK des Ösophagus findet sich eine reduzierte Expression vom Cadherin/Catenin-Komplex (Siewert et al. 2012).

#### **2.1.4 Symptome und Diagnostik**

Die Barrettmetaplasien oder AK im Frühstadium machen selten Symptome, eventuell kann es zu einer oberen GI Blutung kommen. Der Reflux hingegen, der der Metaplasie zugrunde liegt, kann Beschwerden verursachen. Hierbei können zum Leitsymptom Sodbrennen außerdem retrosternale und epigastrische Schmerzen hinzukommen. Patienten mit regelmäßigen und andauernden Refluxbeschwerden sollten deshalb, insbesondere ab einem Alter über 50 Jahren, eine diagnostische Endoskopie erhalten. Begründen lässt sich dieses Vorgehen damit, dass frühzeitig entdeckte AK gute therapeutische Ergebnisse aufweisen. Leider wird weiterhin ein Großteil der Tumoren erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt, weil es erst in diesem Stadium zum Leitsymptom der Dysphagie kommt (Behrens et al. 2011). In Rahmen der Dysphagie kann es dann auch zur Gewichtsabnahme und Mangelernährung kommen (Wagner und Müller 2009). Die Diagnosestellung sowohl eines Barrett-Ösophagus als auch eines AK erfolgt über eine Endoskopie mit Biopsieentnahme und histologischer Untersuchung. Weitere wichtige Diagnostik im Rahmen des Tumorstaging ist der endoskopische Ultraschall (im Folgenden kurz EUS) zur Beurteilung der lokalen Infiltrationstiefe sowie der lokalen Lymphknoten (im Folgenden kurz LK). Das nodale Staging ist ein wichtiger prognostischer Faktor beim AK und ist mitentscheidend für die Wahl des passenden Therapieschemas. Eine Sonographie des Abdomens erfolgt insbesondere zum Ausschluss von Lebermetastasen. Ein Multidetektor Computer Tomogramm (im Folgenden kurz CT) des Thorax und des Abdomens ist zum genauen Staging zwingend indiziert. Es sollte der Ösophagus in seiner gesamten Länge dargestellt werden. Ergänzend kann ein PET-CT, insbesondere bei fortgeschrittenen Tumorstadien, zur Verbesserung des Staging sinnvoll sein. Ein genaues Staging ist Grundvoraussetzung für eine evidenzbasierte Therapie, welche sich nach dem Tumorstadium, aber auch nach individuellen Faktoren wie Alter, Gesundheitszustand und Begleiterkrankungen richtet.

#### **2.1.5 Therapie und Prognose**

Zunächst sollte die Entstehung der GERD verhindert werden, z. B. durch Gewichtsreduktion sowie ggf. durch frühzeitige Refluxausschaltung mittels Fundoplikatio (Koop et al. 2014). Sollte bereits eine Barrett Dysplasie entstanden sein, besteht die Möglichkeit einer endoskopischen Entfernung des Barrettepithels. Endoskopische Kontrollen

bei Barrettmetaplasie sind indiziert, um eine maligne Transformation frühzeitig zu erkennen, da frühe Tumorstufen bei entsprechender Therapie eine gute Prognose aufweisen. Zeigt sich bereits ein Karzinom, richtet sich die Therapie nach der TNM/UICC Klassifikation. Hochgradige intraepitheliale Neoplasien (im Folgenden HGIEN) und mukosomale Adenokarzinome des Ösophagus können heutzutage zumeist mittels einer endoskopischen Resektion (im Folgenden ER) therapiert werden. Anhand des resezierten Präparates erfolgt eine genaue histologische Aufarbeitung. Bei einem auf die Mukosa beschränkten Lokalrezidiv ist eine erneute ER möglich (Porschen et al. 2015). Zeigt sich im Staging jedoch ein höhergradiges Tumorstadium, erfolgt eine Intensivierung der Therapie. Die operative kurative Versorgung des AK, sowie der Karzinome des gastro-ösophagealen Übergangs, ist bei operablen Patienten das Mittel der Wahl. Es handelt sich um einen Zweihöhlen-Eingriff (Thorax und Abdomen) und somit um einen Hochrisiko-Eingriff. Ziel einer operativen Therapie ist eine komplette Entfernung des Karzinoms. Ein proximaler und distaler Sicherheitsabstand von 2-4 cm sollte eingehalten werden (Wu et al. 2014). Zudem sollten möglichst viele regionale Lymphknoten mit entfernt werden, wobei das Ziel eine Entfernung von über 20 LK ist. Die Wahl des chirurgischen Verfahrens richtet sich vor allem nach der Lokalisation des Tumors und dem Tumorstadium. „Das Standardverfahren ist die subtotale transthorakale Ösophagektomie mit Resektion des proximalen Magens und Rekonstruktion mit Magenhochzug und hoch intrathorakaler Anastomose“ (Porschen et al. 2015, S. 73). Je nach lokalem Befund kann eine Erweiterung der Resektion z.B. auf die Vena azygos, den Ductus thoracicus, das Perikard oder aber Pleura und Lungenlappen zum Erreichen einer R0-Resektion indiziert sein. Bei erreichter R0-Resektion liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 40%, wird hingegen keine tumorfreie Resektion erreicht, versterben die Patienten in aller Regel innerhalb der nächsten 2 Jahre (Hölscher et al. 2010). Tumoren mit Infiltration der Pleura, des Zwerchfells oder des Perikards, entsprechend einem Tumorstadium T4a, gelten noch als resektabel. Hingegen gelten Tumoren mit Infiltration von Aorta, Wirbelkörpern oder Trachea, entsprechend T4b Karzinomen, als nicht mehr resezierbar. Bei der zeitgleich zu der Tumorresektion durchzuführenden Lymphadenektomie unterteilt man in drei Lymphknotenfelder, das zervikale, das thorakale und das abdominelle. Die Zweifeld-Lymphadenektomie beinhaltet die Ausräumung der thorakalen und abdominellen Lymphknoten. Bei dem AK wird in der Regel eine Zweifeld-Lymphadenektomie durchgeführt. Es ist das Ziel, möglichst alle Lymphknotenmetastasen zu entfernen, angestrebt wird dabei, über 20 LK

zu entnehmen. Verfahren der Wahl zur Rekonstruktion nach subtotaler Ösophagektomie ist der Magenhochzug. Beim Tumorstadium T2 des AK ist eine präoperative Chemotherapie, oder Radiochemotherapie in Erwägung zu ziehen, jedoch nicht eindeutig empfohlen. In der Regel kombiniert man ab einem Tumorstadium T3 bei prinzipiell kurabel therapierbarem ösophagealen Adenokarzinom ein operatives Verfahren mit einer prä- oder perioperativen Chemo- oder Radiochemotherapie. Im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf erfolgt regelhaft ab dem Tumorstadium T3 eine neoadjuvante Chemotherapie. Als Chemotherapie erfolgt in der Regel eine kombinierte Behandlung mit Cisplatin und Fluorouracil. Als alternatives Chemotherapie-Regime, kommt die Kombination von Carboplatin und Paclitaxel oder aber das Folfox Schema, aus Fluorouracil/Folinsäure und Oxaliplatin, in Frage (Conroy et al. 2014, Alderson et al 2015). Insbesondere ist der Lymphknoten Status prognostisch entscheidend (van Hagen et al. 2012); Durch eine neoadjuvante Chemotherapie oder Radiochemotherapie kann ein Downstaging erreicht werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass bislang das Basis Chemotherapie Verfahren mit einer Kombination von Cisplatin und 5-Fluorouracil bei AK des Ösophagus erfolgt, dass aber das Folfox Schema, Carboplatin und Paclitaxel und andere Chemotherapie Kombinationen ebenbürtig erscheinen (Conroy et al. 2014, Alderson et al 2015). Bei distalen AK des Ösophagus ist eine Chemotherapie bereits ab dem Tumorstadium T2 in Erwägung zu ziehen, ebenso in Einzelfällen eine kombinierte Radiochemotherapie. Ab dem Tumorstadium T3 ist eine prä- oder perioperative Chemotherapie oder Radiochemotherapie indiziert. Bei den kurativ inoperablen Patienten, die ca. 50% der Ösophaguskarzinom Patienten ausmachen, kann eine simultane Radiochemotherapie die Lebensqualität verbessern und eher geringfügig die Lebensdauer verlängern, da das Ansprechen auf kombinierte Chemotherapeutika bei fortgeschrittenem Ösophaguskarzinom schlecht ist und von einer medianen Lebenserwartung von unter 10 Monaten auszugehen ist. Eine primäre Radiochemotherapie ist die Therapie der Wahl bei aus anderen Gründen, wie z.B. kardiovaskulären Risiken oder allgemeinen Operationsrisiken, inoperablen Patienten. Die initial ungefähr gleichwertige 5 Jahres Überlebenszeit bei Operation und primärer Radiochemotherapie hat sich durch verbesserte OP-Technik mit reduzierter perioperativer Mortalität zugunsten der Operation verschoben (Enzinger und Mayer 2003). Es zeigt sich eine deutliche Überlegenheit einer kombinierten Radiochemotherapie im Vergleich zur isolierten Bestrahlung bei nicht operierten Patienten (Herskovic et al. 1992, al-Sarraf et al. 1997). Neben der etablierten Therapie wird derzeit an

verschiedenen neuen Therapieoptionen geforscht, um die weiterhin nicht zufriedenstellende Überlebenschancen zu verbessern. Die Erforschung der Rolle verschiedener Adhäsions- und Rezeptormoleküle bei der Tumorentstehung und Ausbreitung könnte mögliche neue diagnostische und therapeutische Wege aufzeigen.

## **2.2 Zelladhäsion**

Adhäsionsmoleküle sind strukturgebende Proteine, die für den Zusammenhalt zwischen den einzelnen Zellen eines Organs sorgen. Sie sind nicht nur für die dreidimensionale Struktur einer Zelle und somit des gesamten Gewebes verantwortlich, sondern auch als Rezeptoren tätig und können durch ihre Rezeptorfunktion in die Regulation verschiedener intrazellulärer Prozesse eingreifen, wie z.B. den Zellzyklus, die Genexpression und die Apoptose. Eine normale Funktion der Zelladhäsionsmoleküle ist somit Voraussetzung für eine normale Organfunktion.

„Adhäsionsmoleküle sind integrale Membranproteine mit extra- und intrazellulären Anteilen. Die intrazellulären Anteile stehen mit dem Zytoskelett und mit Signaltransduktionsmolekülen in Verbindung“ (Böcker et al. 2004, S44). Sie lassen sich in vier Hauptfamilien unterteilen, die Integrine, Selektine, Cadherine und die Rezeptoren der Immunglobulinen-Superfamilie. Die Integrine werden von den Zellen der Immunabwehr, wie Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten, exprimiert. Mit Hilfe dieser Zellen der Immunabwehr können Integrine an die extrazelluläre Matrix binden. Bei den Selektinen werden unter anderem das Endothelzell-Adhäsionsmolekül 1 (ELAM-1) und das Leukozyten Adhäsionsmolekül (LAM-1) unterschieden. Erstere bewirken eine Bindung neutrophiler Granulozyten an Endothelzellen, letztere dienen der Lymphozyten Adhäsion. Cadherine dienen der Zell-Zell Adhäsion, abhängig von dem Gewebe, in dem sie vornehmlich auftreten, unterscheidet man E-, N-, P-Cadherin, wobei E- für endotheliales, N- für neuronales und P- für plazentares-Cadherin stehen. Des Weiteren gehört Desmocollin, welches ein Bestandteil der Desmosomen ist, zu der Cadherinsuperfamilie. Zu der Immunglobulinen-Superfamilie gehören das (N-CAM) Neuralzelladhäsionsmolekül, (ICAM 1-3) Leukozyten- Endothel-Interaktion mit LFA-1 und das (VCAM-1) Leukozyten-Endothel-Interaktion.

Die Festigkeit eines Gewebes wird durch den Zusammenhalt einzelner Zellen erreicht. Verschiedenste Zellverbindungen dienen dabei den Zusammenhalt dieser Zellen. So versiegeln tight junctions die Epithelschichten benachbarter Zellen. Gap junctions hingegen sind Zellverbindungen, die den Austausch kleiner wasserlöslicher Moleküle erlauben. Desmosomen sind feste Verbindungen der Intermediärfilamente benachbarter Zellen. Hemidesmosomen wiederum verankern die Intermediärfilamente einer Zelle mit der Basallamina. Des Weiteren gibt es die Adhärenzverbindungen, welche ähnliche oder gleiche Actinbündel benachbarter Zellen verbinden (Alberts et al. 2005). Im Verbund dienen Adhärenzverbindungen und die Desmosomen der Verknüpfung von Epithelzellen untereinander, Hemidesmosomen binden die Epithelzellen an die Basallamina (Alberts et al. 2005).

Im Inneren sowohl der Adhärenzverbindungen als auch der Desmosomen befinden sich Transmembranproteine, die zur Familie der Cadherine gehören (Alberts et al. 2005). Cadherine erzeugen eine Haftverbindung zwischen zwei Zellen. Zwei gleichartige Cadherinmoleküle in der Plasmamembran benachbarter Zellen können extrazellulär aneinanderbinden. Intrazellulär sind sie über Proteinlinker an Cytoskelettfilamente gekoppelt. Da nur gleichartige Cadherinmoleküle aneinanderbinden, wird diese Art der Bindung als homophil beschrieben. Diese Eigenschaft verhindert ein chaotisches Mischungsverhältnis in einem Gewebe bestehend aus verschiedenen Zelltypen (Alberts et al. 2005). Die Bindung zweier Cadherine untereinander erfordert die Anwesenheit von Calcium im extrazellulären Raum, diese Eigenschaft der Moleküle war namensgebend (Alberts et al. 2005).

### **2.2.1 Zelladhäsion bei Tumoren**

Bedenkt man die Funktion der Adhäsionsmoleküle im gesunden Gewebe, so erscheint ein Funktionsverlust bzw. eine Veränderung der Funktion dieser strukturgebenden Rezeptoren im tumorös veränderten Gewebe zwangsläufig notwendig, um das Tumorgewebe loszulösen von den natürlichen Regulationsmechanismen des gesunden Gewebes. Die Eigenschaft des unkontrollierten Wachstums des Tumors ist nur möglich durch eine Ausschaltung des Zellzyklus und der Apoptose. Bei der Metastasierung, sowohl lokal, als auch der Fernmetastasierung via Lymphe oder Blut, ist eine Überwindung der Gewebearrrieren bzw. Lösung einzelner Tumorzellen aus dem Gewebeverband notwendig. Dies kann nur erreicht werden, indem die Funktion

der Adhäsionsmoleküle gestört wird. Eine Einnistung von Tumorzellen in spezifischen Geweben im Rahmen der Metastasierung bedarf jedoch auch funktionierender intrazellulärer Bindungen. Dies ist kein wahlloser Vorgang, sondern erfolgt nach festen Regeln (Alberts et al. 2005, Sokeland und Schumacher 2019). In verschiedenen Studien konnte eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen in unterschiedlichsten Tumoren nachgewiesen werden (Winter et al. 2008, Bremnes et al 2002, Li et al. 2016).

Die Bildung von Metastasen besteht aus einer Vielzahl hoch komplexer Abläufe. An jedem dieser einzelnen in der metastatischen Kaskade beschriebenen Schritte, kann es zum Abbruch der Metastasenentwicklung kommen. Somit ist es nicht überraschend, dass nur wenige der von dem Primärtumor ausgeschwemmten Krebszellen tatsächlich Metastasen bilden. Das Verständnis der zugrundeliegenden molekularbiologischen Schritte ist essentiell, um geeignete diagnostische und therapeutische Mittel zu entwickeln (DeVita et al. 2004). Die Metastasierung ist ein komplexer Prozess, der auf drei verschiedenen Wegen erfolgt: 1) als Streuung in präformierte Höhlen, 2) als lymphatische Metastasierung und 3) als hämatogene Metastasierung. Es gibt jedoch große Unterschiede in der Häufigkeit des metastatischen Befalles unterschiedlicher Organe. Lunge und Leber, die durch den cavalen und portalen Blutfluss gut durchblutet sind, werden häufig metastatisch befallen, das Muskelgewebe und die Nieren, die ebenfalls gut durchblutet sind, sind jedoch selten von Metastasen befallen. Diese Tatsache führte dazu, dass Paget im Jahr 1989 postulierte, dass die Metastasierung eine Konsequenz der Interaktion der Tumorzelle (Saat) mit einem geeigneten Organ Umwelt (Nährboden) ist (Bronchud et al. 2000).

Auf dem Weg zur Bildung einer Metastase muss die Tumorzelle zahlreiche Schritte durchlaufen:

- sich vom soliden Tumor lösen,
- das benachbarte normale Gewebe infiltrieren,
- in den Blutfluss eindringen (Intravasation),
- im Blutfluss entweder als einzelne Zelle oder als Zellklumpen überleben,
- in Kapillarbett des neuen Ortes anhalten,
- durch die Gefäßwand austreten (Extravasation),
- das umliegende Gewebe infiltrieren,
- in dem neu besiedelten Gewebe als solider Tumor wachsen,



- und anschließend den Prozess von neuem starten  
(Bronchud et al. 2000)

Da der erste Schritt der Metastasierungskaskade das Loslösen der Tumorzelle vom Tumor umfasst, wird eine Metastasierung durch die Auflockerung des Zellverbundes (Epithelial mesenchymale Transition) gefördert (Kalluri et al. 2009). Im epithelialen Gewebe ist die Zell-zu-Zelladhäsion maßgeblich durch E-Cadherin vermittelt. Zwischen einer deregulierten Funktion von E-Cadherin und der Invasivität eines Tumors besteht ein Zusammenhang. So konnte für eine Vielzahl von Tumoren, wie z.B. für Brust-, Lungen-, Speiseröhren- und Darmkrebs (Bremnes et al. 2002, Li et al. 2016, Buda et al. 2011, Siitonen et al. 1996), ein Zusammenhang zwischen aufgehobener oder erniedrigter E-Cadherin Expression und dem klinischen Stadium oder Differenzierungsgrad festgestellt werden. Im Umkehrschluss konnte gezeigt werden, dass eine Tamoxifen Behandlung bei Brustkrebs die E-Cadherin Expression wiederherstellen konnte und einen invasiven Phänotyp unterdrückte (Bracke et al. 1994). Jedoch ist die Zellkohäsion nicht ausschließlich von der Cadherin Expression abhängig; Auch Veränderungen in der Catenin Expression können zu gestörter Zelladhäsion führen, da diese durch einen Komplex aus Cadherin und Catenin erreicht wird. Das Level an freiem Catenin wird durch das APC Protein reguliert, welches an Catenin binden kann. Ist das APC Protein hingegen mutiert, bindet es nicht mehr an Catenin. Das freie Catenin kann nun mit Transkriptionsfaktoren wie LEF-1 (Lymphoid enhancer factor) und TCF (T-cell factor) interagieren und zur vermehrter Gen Expression führen.

Cadherin und Catenin haben folgende Einflüsse auf den Zellzusammenhang:

- 1) direkt über homophile Zelladhäsionskomplexe,
- 2) Catenin hat direkte Wirkung auf den Zellkern über den Wingless Integration 1 Signalweg (Wnt-Signalweg),
- 3) Eine aufgehobene E-Cadherinfunktion führt zur ansteigenden Regulation von u-PA (urokinase plasminogen activator), einer Protease, die Matrix abbauen kann, davon unabhängig aber auch mitotische Signalwege der Zelle aktiviert und die zelluläre Migration erhöht (Bronchud et al. 2000).

### **2.2.2 CXCR 4**

Chemokin Rezeptor 4, abgekürzt CXCR 4, gehört zu der Familie der Chemokin Rezeptoren und wird besonders auf Stammzellen und Blutzellen exprimiert. Es handelt sich um ein transmembranöses G Protein. CXCR 4 wird durch den Liganden CXCL 12 aktiviert, was zu einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade führt. CXCR 4 ist besonders bei der Angiogenese, der Wundheilung und der Organreparatur beteiligt. Eine Expression von funktionstüchtigem CXCR 4 ist, zum Beispiel bei Mamakarzinom bekannt (Müller et al. 2001). CXCR4 und CXCR7 werden in Brustkrebs Tumorzellen stark exprimiert, diese Chemokine binden an die Rezeptoren CXCL12 und CXCL21, welche man im hohen Maße in der Leber, in LK und im Knochenmark findet. Dies sind Orte, an denen man häufig Metastasen vom Mamakarzinom antrifft (DeVita et al. 2004). Hieraus ergibt sich ein therapeutischer Ansatz. Wenn es gelingen sollte, entweder CXCR 4 oder seine Liganden zu blockieren, könnte möglicherweise eine Metastasierung des Tumors verhindert werden. Auch für das Ösophaguskarzinom (hier keine Differenzierung zwischen AK und PK) wurde eine deutliche Assoziation einer CXCR 4 Expression und einer schlechten Prognose festgestellt (Kaifi et al. 2005).

### **2.2.3 Cadherin und E-Cadherin**

Zur Superfamilie der Cadherine gehören über 100 verschiedene Glykoproteine mit sowohl extrazellulären, transmembranösen als auch zytoplasmatischen Domänen. Über die extrazelluläre Domäne erfolgt Calcium abhängig die Zelladhäsion. Diese Eigenschaft war namensgebend für die Cadherine. Der Name Cadherin entstand durch die Zusammenziehung des Begriffs Calcium abhängiges Adherin (Wagener und Müller 2009).

Epitheliales Cadherin (im Folgenden kurz E-Cadherin) ist ein klassisches Mitglied der Cadherin Molekülfamilie. Es handelt sich um ein transmembranöses Protein, welches Calcium abhängig die Zell-zu-Zell-Adhäsion vermittelt. E-Cadherin findet sich in der Zonula adherens der Zellen. Der Großteil der Tumoren, etwa 80-90%, entstammt epithelialelem Gewebe. Bei der Entwicklung und dem Progress maligner Tumoren spielt E-Cadherin eine bedeutende Rolle, da es das wichtigste Cadherin der Epithelien ist. E-Cadherin ist das Produkt des CDH1-Gens, welches in vielen Tumoren durch verschiedenen Mechanismen vermindert exprimiert wird, z.B. durch verminderte

Transkription (Wagener und Müller 2009). Eine Vielzahl von Studien (z.B. Winter et al. 2008) haben gezeigt, dass ein fortgeschrittenes Stadium der Tumorgenese bzw. ein schlechter Differenzierungsgrad mit dem Verlust der Expression von E-Cadherin einhergeht. Es zeigt sich auch ein unterschiedliches Ausmaß der E-Cadherin Expression bei verschiedenen Tumorentitäten. So zeigt sich beim undifferenzierten nicht kohäsiven Tumor des Pankreas ein kompletter E-Cadherin Verlust, während das solide duktales Adenokarzinom des Pankreas E-Cadherin exprimiert (Winter et al. 2008). Bei der Transformation eines benignen Tumors in einen malignen spielt der Verlust der E-Cadherin Expression eine entscheidende Rolle. Dieser Verlust und der dadurch gestörte Zellzusammenhalt führen zu Entdifferenzierung, invasivem Wachstum und Bildung von Metastasen (Schwab 2001). Die Funktion des E-Cadherin geht über die rein physikalische Stabilisierung benachbarter Zellen hinaus, es hat ebenfalls Auswirkung auf die Differenzierung, die Proliferation und die Migration von Zellen. Die Regulation der Cadherin Wirkung erfolgt nicht nur auf der Ebene der Genexpression, sondern auch durch Regelung des E-Cadherin Adhäsionskomplexes, bedingt durch das Recruitment bereits bestehender Cadherin Moleküle, des Calciumspiegels und die für die Zelladhäsion wichtige Bildung des Cadherin-Catenin Komplexes. Bei den Catenin Molekülen unterscheidet man in  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und p120-Catenin. Sie verbinden die extrazellulären Cadherin Moleküle mit dem intrazellulären Aktinzytoskelett. Die Wirkung der Catenine, besonders des p120-Catenins, können durch Rezeptor-Tyrosinkinase über eine Phosphorylierung beeinflusst werden. Die Phosphorylierung bewirkt eine Lösung des Catenins vom zyttoplasmatischen Adhäsionskomplex. Diese Eigenschaft der Catenine kann bei Behandlung der Zellen mit Wachstumsfaktoren, wie z.B. mit Hepatocyte Growth Factor (im Folgenden kurz HGF), Epidermal Growth Factor (im Folgenden kurz EGF) oder Platelet-Derived Growth Factor (im Folgenden kurz PDGF), beobachtet werden (Schwab 2001). Für das nicht differenzierte Pankreaskarzinom zeigte sich in Studien ein Fehlen des  $\beta$ -Catenins, welches mit einem Verlust der Funktion der Zonula Adhärens einherging. Mögliche Ursache der gestörten E-Cadherin Funktion ist die Hypermethylierung des E-Cadherin Promotors (Winter et al. 2008). E-Cadherin, bzw. der Cadherin-Catenin-Komplex mit seinen multiplen Interaktionen auf zellulärer Ebene ist somit auch ein Ansatzpunkt für neue Therapieformen. Für das Ösophaguskarzinom befinden sich verschiedene Therapieformen in einer frühen Entwicklungsphase. Erfolgsversprechende Aussichten gibt es bei der Therapie mit Antikörpern gegen den

Epidermal Growth Factor Receptor und den Vascular Endothelial Growth Factor Liganden, sowie bei der oralen Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (Tew et al. 2005).

#### 2.2.4 Midkin

Midkin (im Folgenden kurz MK), auch bekannt als neurite growth-promoting factor2 wird auf dem MDK Gen kodiert und ist ein Heparin bindender Wachstumsfaktor, der für die Regulation zellulärer Vorgänge zuständig ist und zu den Zytokinen gehört. MK wird während der Embryogenese, insbesondere im zweiten Trimenon, stark exprimiert. Beim Erwachsenen wird MK jedoch nur in speziellen Fällen, z. B. bei Verletzung, Entzündung und Tumorbildung, exprimiert. Dieses limitierte Vorkommen, und dass es sich um ein lösliches Zytokin handelt, welches bei erhöhter Expression häufig in Serum und anderen Körperflüssigkeiten nachzuweisen ist (Jones 2014), macht MK zu einem passenden Ziel bei der Entwicklung neuer diagnostischer Methoden und spezifischer Therapien (Muramatsu 2011). An den Zielzellen bewirkt es eine Proliferation sowie ein Überleben der Zelle, des Weiteren ist MK an der Differenzierung und Migration der Zielzellen beteiligt. Im Rahmen seiner Funktion spielt er auch bei zahlreichen Tumorerkrankung eine wesentliche Rolle. MK verstärkt das Tumorwachstum, indem es das Überleben, die Angiogenese, die Proliferation und die Metastasierung von Tumoren fördert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Midkin-Überexpression bei verschiedenen Tumoren mit einer Tumorprogression und einer schlechten Prognose einhergeht, so z.B. beim Magenkarzinom (Rawnaq et al. 2011) und dem hepatozellulären Karzinom (Koide et al. 1998).

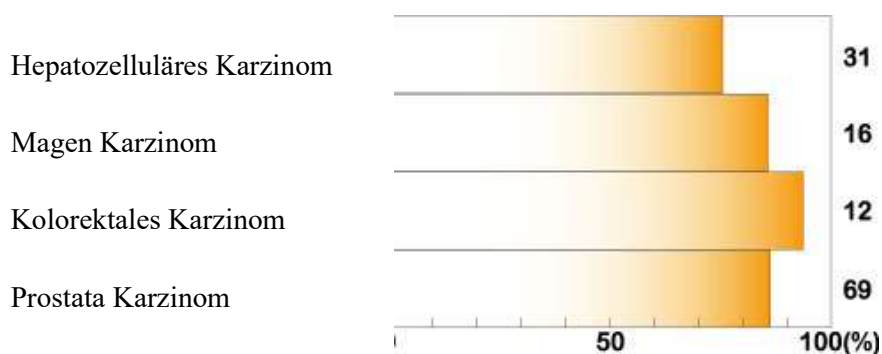


Abb. 1: Erhöhte Midkin Expression in humanen Tumoren. Die X-Achse zeigt den prozentualen

Anteil der Tumoren mit erhöhter Midkin Expression. Die Y-Achse zeigt die verschiedenen Tumorentitäten und die Anzahl der Untersuchten Fälle. (Modifiziert nach Muramatsu 2002).

Eine hohe MK Expression wurde mit einem schlechten Ansprechen auf Chemotherapie assoziiert (Mirkin et al. 2005). Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass mit auf MK adressierter antisense-oligo-DNA oder siRNA das Tumorwachstum gehemmt werden konnte, woraus in Zukunft eine Therapieoption bei Tumoren entwickelt werden könnte (Takei et al. 2001). Derzeit wird an verschiedenen möglichen MK Inhibitoren geforscht, z.B. an multi- oder monoklonalen Antikörpern oder Inhibitoren auf Chondroitinsulfat E- oder Heparinbasis. Es konnten bei Betroffenen verschiedener Krebserkrankungen erhöhte MK Werte in Serum, Plasma oder auch Urin gefunden werden. Dies macht MK zu einem viel untersuchten Tumormarker, so z.B. beim alpha-Fetoprotein negativen hepatozellulären Tumor (Jia et al. 2007). MK wird jedoch auch bei entzündlichen, nicht malignen Prozessen wie z.B. rheumatoider Arthritis exprimiert. Dies verringert die Spezifität, daher wird aktuell nach tumorspezifischen MK Formen, z.B. mit durch alternatives Splicing gekürztem MK gesucht (Kaname et al. 1996).

### **2.2.5 Periostin**

Periostin, auch Osteoblast Specific Factor 2 genannt, ist ein extrazellulär von mesenchymalen Zellen, unter anderem von Fibro- und Osteoblasten, exprimiertes Matrixprotein. Periostin wird auf dem POSTN Gen kodiert. Es ist in der Narbenbildung und dem Remodeling beteiligt, z.B. nach Myokardinfarkt. Über die Bindung zu Integrinen ist Periostin an der Zelladhäsion und Zellmigration beteiligt. Eine Überexpression von Periostin wurde in verschiedenen Karzinomen nachgewiesen. So zum Beispiel im nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (Hong et al. 2013), im Kolonkarzinom (Li et al. 2015) und auch im PE des Ösophagus (Michaylira et al. 2010). In vielen Karzinomen ist Periostin durch die Bindung an Integrine und hierdurch bedingte Aktivierung verschiedener Signalwege unter anderem des PI3-K/Akt und Akt/PKB- und FAK- vermittelten Signalweg an dem Zellüberleben, Invasion, Angiogenese und Metastasierung beteiligt (Ruan, K. et al. 2009). Für das orale Plattenepithelkarzinom des Mundes konnte ein Zusammenhang zwischen vermehrter Periostin Expression und frühzeitiger lymphogener Metastasierung festgestellt werden (Kudo et al. 2006). Für das cholangiozelluläre

Karzinom erscheint der Periostin Nachweis ein geeignetes bioptisches diagnostisches Verfahren und zur Früherkennung nützlich zu sein (Riener 2011); Dies scheint auch für das kolorektale Karzinom zu gelten (Li et al. 2015).

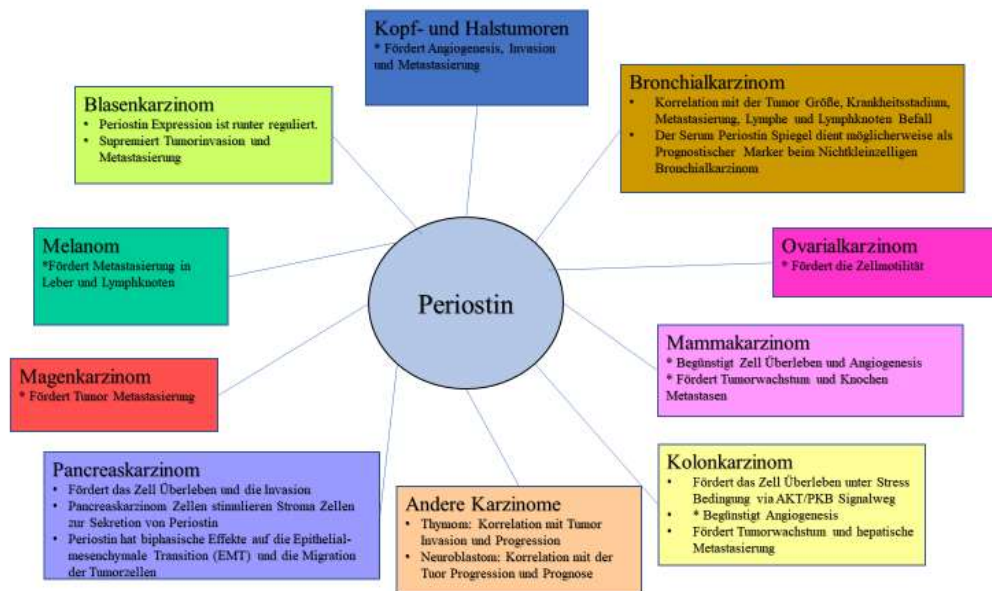


Abb. 2: Funktion und Expression von Periostin in humanen Karzinomen Übersetzt und Modifiziert von der Vorlage (Ruan K et al. 2009)

## 2.2.6 CD45

Es handelt sich um ein „Cluster of differentiation“ Molekül, welches insbesondere auf Leukozyten exprimiert wird. CD 45 ist ein Glykoprotein mit einer bedeutenden Funktion bei der intrazellulären Signaltransduktion. Der intrazelluläre Abschnitt von CD 45 weist Tyrosin-Phosphatase-Aktivität auf. CD 45 wird durch alternatives Splicing der Exone 4-6 in verschiedenen Isoformen exprimiert (Pinna und Cohen 2005), unter anderem CD 45 RA und RO. CD 45 RO hat eine hohe Assoziation zum T-Zell Rezeptor. CD45 R0 scheint spezifisch für T-Zell Gedächtniszellen und Effektorzellen zu sein, CD45RA wird auf naiven (nicht aktivierten) T-Zellen exprimiert (Mackay 1999). CD45RO positive T-Zellen wandern, Antikörper vermittelt, durchs Gewebe. CD 45 hat in der immunhistochemischen Diagnostik eine große Bedeutung, da es als Pan-Leukozytenmarker fungiert. Über monoklonale Antikörper können CD45 exprimierende Zellen markiert werden. Das

Expressionsmuster ist z.B. wichtig bei der Klassifikation und Therapie der Leukämien (Behm et al 1992, Borowitz et al 1993). Folgende Studie konnte zeigen, dass beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (Wang et al. 2013) eine hohe CD 45 Expression für eine gute Prognose spricht. Beim AK (Rauser et al. 2010) und PK (Enomoto et al. 2012) des Ösophagus konnte in vorausgehenden Studien bereits eine bessere Prognose für Tumoren mit einer hohen Anzahl an CD 45 positiven T-Lymphozyten gezeigt werden. „In multivariate analysis, a low density of intratumoral CD45RO+ immune cells was an independent unfavorable factor for disease-free survival in stages I-IIA patients” (Rauser et al. 2010). Dies spricht dafür, dass unter anderem auch CD 45 positive T-Zellen eine wichtige Rolle in der Immunantwort auf Tumoren spielen und bietet möglicherweise einen Therapieansatz mit Induktion von T-Zellen in Tumoren zur Verhinderung insbesondere der Tumor Metastasierung (Enomoto et al. 2012). CD 45 Antikörper werden bereits bei der myeloablativen Radio-Immun-Therapie maligner Erkrankungen, z.B. beim multiplen Myelom (weist hohe CD45 Expression auf) erforscht und eingesetzt (Buchmann 2008).

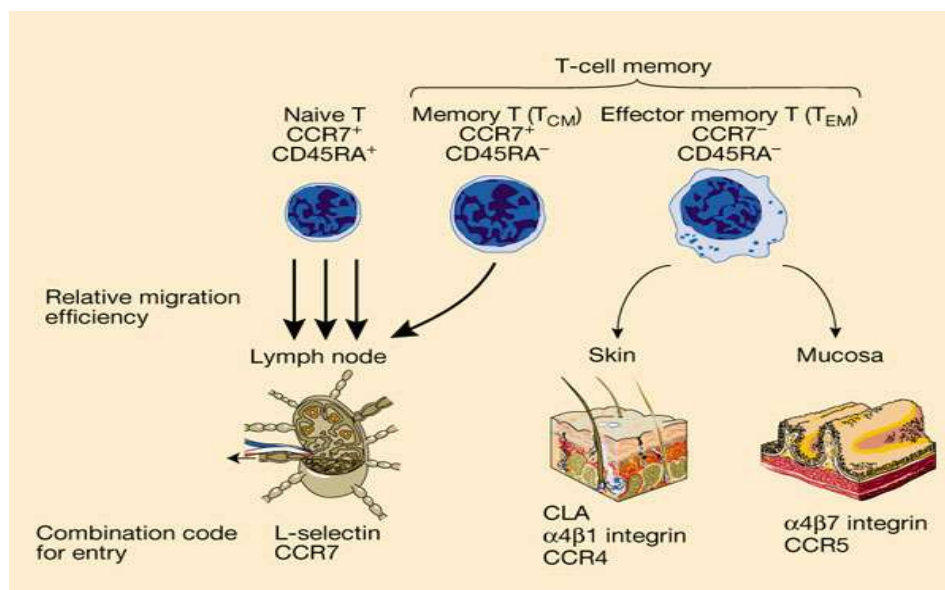


Abb. 3: Expression von CCR7 und CD45RA auf Lymphozyten und ihre Rezeptor vermittelte Migration durch die Gewebe (Makay 1999).

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Probenmerkmale und Patientenkollektiv**

In der Chirurgie des Universitätskrankenhauses Eppendorf werden jährlich 70 bis 90 onkologische Patienten an der Speiseröhre operiert. Es war das Ziel, eine möglichst große Stichprobenanzahl zu untersuchen, um ein signifikantes Ergebnis zu erlangen. Es wurden zunächst alle seit 1992 bis November 2009 am Ösophaguskarzinom operierten Patienten, als Untersuchungskollektiv in Erwägung gezogen. Anschließend wurde dieses Kollektiv nach den Kriterien, Vorliegen eines Adenokarzinoms des distalen Ösophagus und zusätzliches Vorliegen einer Leberprobe, spezifiziert. Bei ca. 20% der Proben, der in dem Zeitraum von 1992 - 2009 operierten malignen Erkrankungen des Ösophagus, handelte es sich um AK. AK der Kardia wurden eingeschlossen, sofern der Ursprung des Tumors im ösophagealen Anteil der Kardia lag, definitionsgemäß oberhalb der Z-Linie. Neben dem histologisch gesicherten und durch einen Pathologen klassifizierten Vorliegen eines distalen AK des Ösophagus, war das Vorliegen einer Leberprobe ein notwendiges Einschlusskriterium.

Das Untersuchungsdesign sah vor, die entsprechenden Leberproben, die Lymphknoten und den Primärtumor auf Veränderungen der Expression von Adhäsions- und Oberflächenmolekülen, speziell die Moleküle E-Cadherin, Periostin, Midkin, CD 45 und den Chemokinrezeptor CXCR4, zu untersuchen. Als Verfahren der Wahl wurde das Tissue Microarray gewählt, welches den Vorteil bietet, mehrere Proben gleichzeitig zu färben und anschließend unter dem Mikroskop auswerten zu können. Primäres Untersuchungsziel war die Begutachtung der Expression der jeweiligen Moleküle im Lebergewebe, zusätzlich wurde Lymphknoten- und Primärtumor-Gewebe beurteilt. Bei den Leberproben handelte es sich, sowohl um synchron, also zusammen mit dem Primärtumor, als auch um metachron, das heißt zu einem anderen Zeitpunkt, entnommene Proben. Bei einem Teil der Patienten lagen sowohl synchrone als auch metachrone Proben vor. Bei den Lymphknoten handelte es sich in der Regel um synchrone Proben. Wenn sowohl infiltrierte, als auch gesunde Lymphknoten vorhanden waren, so wurde von beiden Gruppen jeweils ein Lymphknoten untersucht. Es wurden alle Tumorstadien, von Karzinoma in situ bis hin zu fortgeschrittenen Tumorstadien mit Fernmetastasen, eingeschlossen. Es wurden Gewebeproben von insgesamt 65 Patienten mit AK untersucht. Bei 21 Patienten lag eine gesicherte hepatische Metastasierung vor, bei den übrigen 44 Patienten waren keine



Lebermetastasen bekannt. Von 58 Patienten waren vollständige Follow-up-Daten bekannt. Ein Überblick über die Patienten Charakteristika verschafft die folgende Tabelle.

Tab.1. Merkmale des Patientenkollektivs

	<b>Männlich</b>	<b>Weiblich</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Anzahl</b>	<b>56 (86%)</b>	<b>9 (14%)</b>	<b>65</b>
<b>Altersdurchschnitt</b>	63,7 Jahre	61,8 Jahre	63,4 Jahre
<b>Patienten mit Lebermetastasen</b>	17 (63,1 Jahre)	4 (61,5 Jahre)	21 (62,7 Jahre)
<b>Patienten ohne Lebermetastasen</b>	39 (64 Jahre)	5 (62 Jahre)	44 (63,7 Jahre)
<b>Patienten ohne vollständige Nachsorgedaten</b>	6	1	7

Alle Proben stammten von Patienten mit einem sicher diagnostizierten und klassifizierten adenoiden Primärtumor im distalen Ösophagus. Auf den Schnittpräparaten der untersuchten Gewebe wurden die Areale der Primärtumoren, Leber- und Lymphknotenmetastasen abgrenzend gekennzeichnet. Diese gekennzeichneten Schnittpräparate dienten dann als Stanzvorlage für die Bohrung in den Gewebeparaffinblöcken. Es wurde ein Tissue Microarray (im Folgenden kurz TMA) Plan angelegt, so dass nachvollziehbar blieb, welche Probe zu welchem Präparat gehört. Durch spezielle immunhistochemische Färbung wurden die Adhäsionsmoleküle sichtbar gemacht.

### **3.2 TMA**

Tissue Microarrays werden hergestellt, indem man mit einer Hohlnadel Biopsien aus den zu untersuchenden, herkömmlichen, histologischen Gewebelöcken entnimmt und dann in die Bohr-/Stanzlöcher auf dem Empfänger „Master“ Block transferiert. Diese Technik wurde ursprünglich von Wan, Fortuna und Furmanski 1987 im Journal of Immunological Methods beschrieben. Populär wurde die Methode nach einer Veröffentlichung von Kononen und Kollegen im Journal Nature Medicine im Jahre 1998. Auf den heutigen TMA Blocks, die mit den von Kononen et al. entwickelten Techniken und Geräten hergestellt werden, kann Gewebe von über 600 Proben auf einem Paraffinblock vereinigt werden. Dies bietet viele Vorteile. So können

zeitsparend viele unterschiedliche Gewebeproben, ganze Kohorten, gleichzeitig z.B. gefärbt und begutachtet werden. Die Vergleichbarkeit ist besser, da alle Gewebeproben exakt gleich vorbehandelt werden (Reagenzkonzentration, Inkubationszeit, Temperatur, etc.). Zudem werden Materialien und teure Reagenzien gespart, da nicht alle Gewebeproben einzeln behandelt werden müssen. Die ursprünglichen Gewebeblöcke werden kaum zerstört, da nur sehr kleine Stenzen mit einer Oberfläche von etwa  $0.3 \text{ mm}^2$  entnommen werden. Von einem üblichen Tumorgewebeblock können mehrere hundert Stanzbiopsien entnommen werden, wobei jede einzelne auf einen TMA Block platziert und untersucht werden kann. Zudem werden von den TMA Blöcken deutlich dünnere Schnitte als von herkömmlichen Präparaten angefertigt, sodass die wertvollen Gewebeproben optimal genutzt werden können. Inzwischen bestehen Verfahren, die es ermöglichen, bis zu 2000 Proben auf einem TMA Block zu vereinen. Das TMA ist, genauso wie die herkömmlichen mit Formalin fixierten Paraffin Gewebeblöcke, geeignet für eine große Anzahl von verschiedenen Untersuchungsmethoden, unter anderem für histochemische oder immunologische Färbungen. Ein Nachteil des TMA Verfahrens ist, dass jeweils nur kleine Ausschnitte eines Gewebes beurteilt werden, dies ist z.B. problematisch hinsichtlich der intratumoralen Heterogenität.

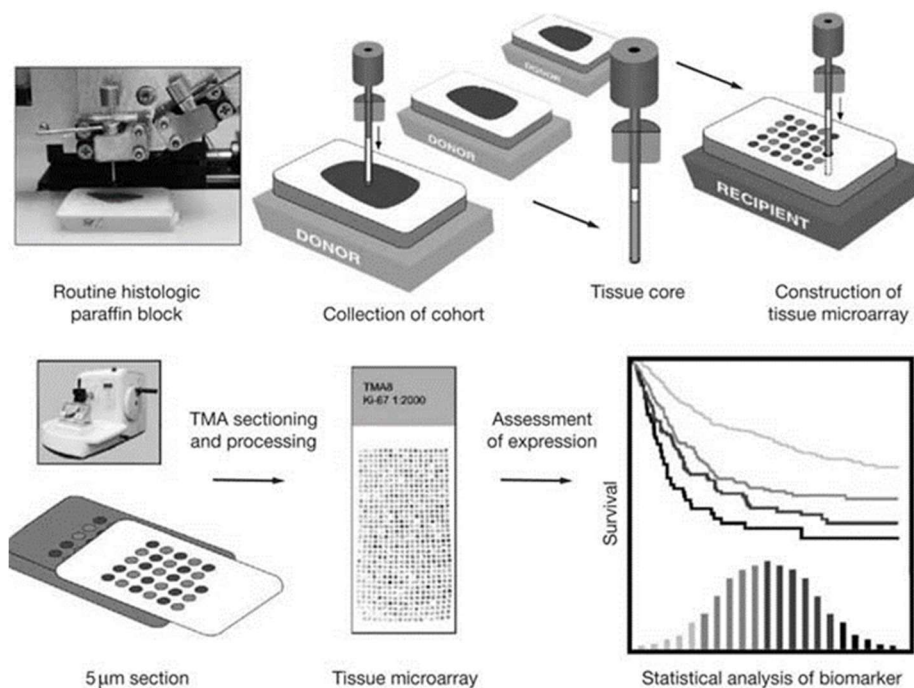


Abb. 4: Bild einer TMA Anfertigung (Giltane und Rimm 2004).

Abbildung 5 zeigt den Ablauf einer TMA Anfertigung. Der TMA wurde wie folgt geplant: Er enthält zwei Anteile: Teil A mit den zu untersuchenden Gewebeprobe, Teil B mit Referenzgewebe.

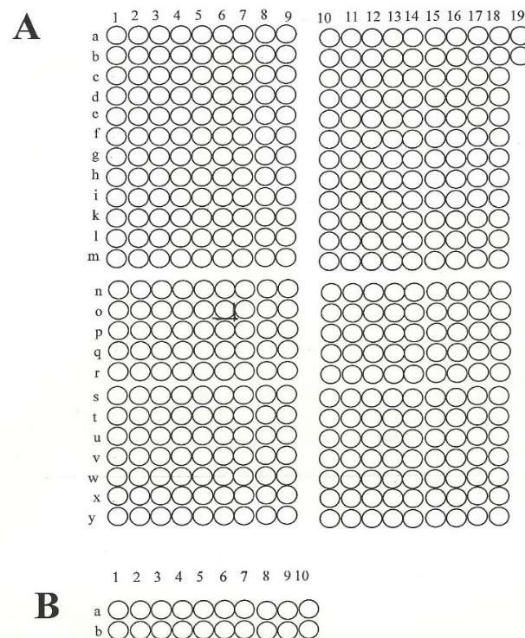


Abb. 5: Vorlage für das angefertigte TMA.

Es wurden von jedem untersuchten Gewebe jeweils 2 Proben entnommen und auf den Empfängerblock transferiert. Bis zur markierten Position A6O handelt es sich um Proben von Patienten mit nachgewiesener Lebermetastase. Nachfolgend handelt es sich um Gewebeprobe von Patienten ohne Lebermetastasen. Insgesamt wurden 434 Gewebeprobe in den TMA Block integriert. Im B-Teil des TMA-Blocks befinden sich 20 Kontrollproben von gesundem Referenzgewebe.

In der a-Reihe (B1a bis B10a) wurde normales Ösophagusgewebe verwendet.

Die b-Reihe ist wie folgt aufgeteilt:

B1b und B2b = Leber

B3b und B4b = Lunge

B5b und B6b = Haut

B7b und B8b = Lymphknoten

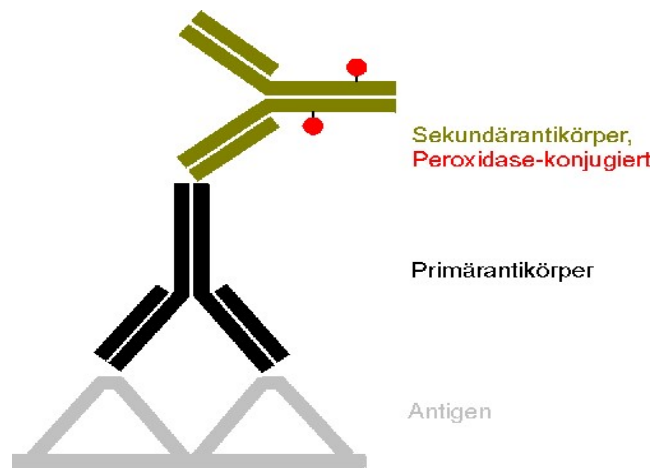
B9b und B10b = Prostata

### 3.3 Immunhistochemische Färbung

Zunächst wurden mit Hilfe eines Mikrotoms dünne Schnitte vom TMA-Block hergestellt. Ein Mikrotom ist ein Schneidegerät, mit dem man sehr dünne Schnitte gleichbleibender Schnittdicke herstellen kann. Hierin liegt der Vorteil im Vergleich zum Handschnitt mittels eines Rasiermessers. Es gibt zwei Mikrotom Typen, das Schlittenmikrotom und das Rotationsmikrotom nach Minot. In diesem Fall wurde ein Rotationsmikrotom der Firma MICROM (Modell HM 355 E) verwendet. Rotationsmikrotome eignen sich besonders für das Schneiden weicher Materialien wie z.B. Paraffinblöcken (Henkel 2016). Das Mikrotom wurde so eingestellt, dass Schnitte mit einer Schnittdicke von 4 µm erhalten werden konnten. Die Herstellung der TMA Schnitte und die Fixierung auf den Objektträgern erfolgte durch die Kollegen des pathologischen Institutes an der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Färbung der TMA Schnitte.

Hierbei werden spezifische Proteine in einer Zelle durch Farbstoffe sichtbar gemacht. Der Farbstoff bindet mit hoher Affinität und Spezifität an das gewünschte Protein. Dies erreicht man, indem der Farbstoff an einen Antikörper, der an das gewünschte Protein bindet, gekoppelt wird. Es sollte möglichst keine Kreuzreaktion mit ähnlichen Proteinen erfolgen.

Man unterscheidet eine direkte und eine indirekte Methode. Bei der direkten Methode wird der spezifische Antikörper direkt an das Enzym gebunden und bindet dann an das Epitop an dem zu färbenden Gewebe. Bei der indirekten Methode bindet zunächst der noch nicht mit einem Farbstoff markierte primäre Antikörper an das zu färbende Gewebe, in einem zweiten Schritt wird dann ein zweiter z.B. mit einem Enzym markierter (sekundärer) Antikörper auf dem Gewebe aufgebracht. Dieser zweite Antikörper bindet dann an den ersten Antikörper. Die indirekte Methode bietet den Vorteil einer stärkeren Färbung (Signalverstärkung), da mehrere Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden können.



## Indirekte Methode

Abb. 6: Skizze des Antigen-Antikörper-Komplexes bei der indirekten immunhistochemischen Färbung (Herbst und Hübner 2016).

Wir wählten das Verfahren der indirekten immunhistochemischen Färbung. Die Färbungen wurden mit der Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode (LSAB) durchgeführt (R&D Systems: HRP-AEC System, Minneapolis, MN, USA).

Diese Technik bedient sich der starken Affinität zwischen Biotin und Avidin bzw. Streptavidin. Der Sekundärantikörper ist ein mehrfach biotinylierter Antikörper, an den sich Enzym-konjugiertes Avidin/Streptavidin bindet. An jeder Biotin Bindungsstelle des Antikörpers kann eine Bindung erfolgen; Dies führt zu einer Amplifikation (Lang 2013). Der Sekundärantikörper bindet an das FC-Fragment des Primärantikörpers. Letztendlich erfolgt die Färbung durch das Enzym Peroxidase, welches an den Avidin-Biotin Komplex gebunden ist. Die Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) wandelt den ebenfalls zugefügten Indikatorstoff 3-Amino-9 Ethylcarbazol (AEC, K3464, Dako Deutschland GmbH, Hamburg) in einen roten Farbstoff um.

### 2.4 Vorbereitung und Färbung der Schnitte

Am Beispiel von E-Cadherin erfolgt die ausführliche Beschreibung der Vorbereitung und Färbung der Schnitte. Das Vorgehen bei der Färbung der anderen

Oberflächenmoleküle unterscheidet sich von E-Cadherin in der Wahl des jeweiligen Primärantikörpers sowie der Temperatur und der Zeit bei der Inkubation.

Zunächst mussten die angefertigten Schnitte mit Xylol und Ethanol vom Paraffin bereinigt werden. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur zweimal für 5 Minuten mit Xylol, anschließend in absteigender Alkoholreihe mit Ethanol zu je 3 Minuten (2 x 100 %, 2 x 96 %, 2 x 80 %, 1 x 70 %) behandelt. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte in destilliertem Wasser rehydriert und anschließend zweimal 5 Minuten in den Waschpuffer getaucht (TBS pH 7,4). Darauffolgend wurden die Schnitte in der Mikrowelle über 10 Minuten bei 600 Watt erhitzt, wodurch das durch das Paraffin entstandene Crosslinking (die Vernetzung der Proteine) rückgängig gemacht wurde. Währenddessen wurden die Schnitte mit Dako Target Retrieval Lösung behandelt. Im Falle von E-Cadherin betrug der pH-Wert 9,0 (S2367). Im nächsten Schritt erfolgte eine Ausschaltung der endogenen Peroxidase, indem die Schnitte für 5 Minuten mit Peroxidase Blocking Reagent behandelt wurden. Daraufhin erfolgte eine dreimalige Waschung im Puffer. Anschließend wurden die Schnitte über 15 Minuten mit Serum Blocking Reagent G (R&D Systems: HRP-AEC System, Minneapolis, MN, USA) behandelt und danach nur abgeklopft. Darauf folgte die Behandlung mit Avidin Blocking Reagent, ebenfalls über 15 Minuten mit anschließendem dreimaligem Waschen im Puffer. Die gleiche Behandlung erfolgte mit dem Biotin Blocking Reagent.

Nach der Vorbehandlung erfolgte die Inkubation der vorbereiteten Schnitte mit den jeweiligen Primärantikörpern. Im nächsten Schritt erfolgte die 45-minütige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, mit anschließender dreimaliger Waschung im Puffer. Hierauf folgte die Behandlung der Objektträger für 30 Minuten mit HSS-HRP (High Sensitivity Streptavidin). Hierbei handelt es sich um chemisch optimiertes Streptavidin mit minimaler, unspezifischer Bindung an Phospholipid, Nukleinsäure, und Kohlenhydrat bindende Proteine (rndsystems 2016). Nach dreimaliger Waschung (2 Minuten) im Puffer erfolgte die Chromogenfärbung, hierfür wurden die Objektträger mit 5 Tropfen AEC Chromogen auf 10ml Chromogen Puffer behandelt. Die Einstellung der Farbreaktion wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach einem 5-minütigen Tauchbad in destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylin Lösung (3 Minuten). Nach 3 - 5 Minuten Waschen der Objektträger mit Leitungswasser wurden die Schnitte in destilliertem Wasser

gesammelt. Abschließend erfolgte das Eindecken der gefärbten auf Objektträger gebundenen Schnitte; Hierfür wurde Aquatex der Firma MERCK verwendet. Zudem wurden zur besseren Gewährleistung valider Färbungsergebnisse Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt. Als Positivkontrollen dienten die Referenzgewebe, die sich unter Teil B auf dem TMA-Block befanden sowie mit gefärbte Gewebeschnitte mit bekannter Expression des untersuchten Moleküls, z.B. bei E-Cadherin aus der Ösophagsmukosa. Neben den Positivkontrollen erfolgten Negativkontrollen, in denen der Primärantikörper durch MOPC 21, einem unspezifischen Antikörper, der ein aus Mäusen gewonnenes IgG I Kappa Isotyp Immunglobulin ist, ersetzt wurde.

Tab.2. Vorbehandlung und Färbungsprotokoll am Beispiel E-Cadherin

1. Xylol 2 mal 5 Min.
2. Absteigende Alkoholreihe
100 % Ethanol 2 mal 3 Min.
96 % Ethanol 2 mal 3 Min.
80 % Ethanol 2 mal 3 Min.
70 % Ethanol 1 mal 3 Min.
3. Aqua dest. Kurz
5. 10 Min. Mikrowelle bei 600 Watt in DAKO Retrieval Solution, PH 9,00
6. Abkühlen auf Raumtemperatur
7. Waschen in TBS
8. Blockierung der endogenen Peroxidase mit Peroxidase Blocking Reagent 5min
9. Waschen in TBS 3 mal 3 min
10. Abblocken unspez. Antikörper mit Serum Blocking Reagent G 15min. Anschließend abklopfen.
11. Abblocken der endogenen Avidin Rezeptoren mit Avidin Blocking Reagent 15 Min.
12. Waschen in TBS 3 mal 3 Min.
13. Abblocken der endogenen Biotin Rezeptoren mit Biotin Blocking Reagent 15 Min.
14. Waschen in TBS 3 mal 3 Min.

15. Inkubation des Primärantikörpers, im Falle von E-Cadherin (Code S0809) mit einer Verdünnung von 1:100 mit Diluent bei 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur.
16. Ausführliches Waschen in TBS
17. 45-minütige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper
18. Waschen in PBS/TBS 3 mal 3 Min.
19. Behandlung mit HSS-HRP 30 Min.
20. Waschen in PBS/TBS 3 mal 2 Min.
21. Chromogenfärbung (5 Tropfen AEC Chromogen auf 10 ml Chromogen Puffer)
22. Tauchbad in destilliertem Wasser 5 Min.
23. Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylin Lösung 3 Min.
24. Waschen der Objektträger mit Leitungswasser 3-5 Min.
25. Lagerung im destillierten Wasser
26. Eindecken mit Aquatex der Firma MERCK.

Obige Tabelle fasst den Ablauf der Färbung für E-Cadherin zusammen. Es wurde der Antikörper der Firma Dako (Clone NCH-38) verwendet. Die Vorbereitungen der Gewebeschnitte für die anderen Oberflächen- oder Zelladhäsionsmoleküle entsprechen dem Vorgehen, das am Beispiel von E-Cadherin beschrieben wurde.

Für den Nachweis des Oberflächenmoleküls CXCR 4 wurde das Zell- und Gewebefärbekit von *R&D Systems* mit dem Primärantikörperklon *Clone 44716* verwendet. Für den Nachweis von Midkin wurde der Primärantikörper der Firma Abcam (ab52637) verwendet. Der Nachweis von Periostin erfolgte mit einem Antikörper der Firma Abcam (ab14041). Für CD 45 wurde der primäre Antikörper *Anti-CD45 Antibody (ab10558)* der Firma Abcam verwendet. Alle Präparate wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert.



## 2.5 Auswertung

Es erfolgte eine lichtmikroskopische Auswertung (Mikroskop Olympus BH-2, Olympus, Hamburg, Vergrößerungen 1:100, 1:200, 1:400, 1:1000) der Farbintensität der einzelnen Spots auf den gefärbten TMA Schnitten. Folgende Farbintensitäten wurden unterschieden: Nicht gefärbt = nicht positiv (0), schwach gefärbt = leicht positiv (1), moderat gefärbt = mäßig positiv (2) und stark gefärbt = hoch positiv (3). Es erfolgte für jeden Schnitt auch eine Gruppenanalyse, indem moderat und stark gefärbte Spots zusammen betrachtet wurden und somit nur 3 Abstufung vorlagen (0,1,2). Aufgrund der eingeschränkten Probenzahlen bot die Unterteilung in drei Gruppen Vorteile, da hierdurch die Gruppe der stark gefärbten Proben vergrößert wurde und die teilweise schwere Unterscheidung von moderat und stark gefärbten Proben nicht notwendig wurde. Beim Lebergewebe zeigte die Zusammenführung der moderat und stark gefärbten Proben in der Auswertung auch Nachteile, da sich das Lebergewebe zumeist stark gefärbt zeigte. Hierdurch wurde eine Unterscheidung zwischen mäßig und stark gefärbten Gewebe notwendig. Da von jedem untersuchten Gewebe auf dem TMA Block zwei Proben enthalten waren, wurde bei Differenz der jeweiligen Farbintensität der Mittelwert gebildet und aufgerundet. Beispielhaft: Probe 1 schwach gefärbt (1), Probe 2 moderat gefärbt (2),  $1+2=3:2=1,5$ , in der statistischen Auswertung aufgerundet auf 2. Die Auswertung am Lichtmikroskop erfolgte durch zwei Untersucher ohne Kenntnis der Patientendaten, bei indifferenter Meinung bezüglich einer Farbintensität der Färbung wurde bei erneuter Beurteilung ein Konsens gebildet.

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über das Ausmaß der Proteinexpressionen in gesunden Referenzproben der untersuchten Gewebe.

Tab.3. Überblick über die Protein Expression der untersuchten Moleküle im jeweiligen Gewebe (im Falle von CXCR4 handelt es sich um RNA Expression, die nicht identisch mit der Proteinexpression ist). Die Tabelle ist erstellt nach den Angaben im The Human Protein Atlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org), besucht 04/2019).

Ausmaß der Proteinexpression im gesunden Gewebe	Ösophagus	Leber	Lymphknoten
E Cadherin	Hoch	intermediär	keine
Midkin	Keine	keine	keine
Periostin	Gering	intermediär	gering
PTPRC (CD 45)	Keine	keine	hoch
CXCR4 (in diesem Falle RNA Expression)	Gering	gering	hoch

## 2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Statistikprogramm SPSS 13 von IBM. Es wurde die Gesamtüberlebenszeit aus Follow-up-Daten, in Abhängigkeit von der jeweiligen Molekülexpression in den untersuchten Geweben errechnet. Untersucht wurden der Primärtumor, das Lebergewebe und die Lymphknoten mit und ohne Metastasen. Aus den Follow-up-Daten, welche für einen Großteil der Patienten vorhanden waren, wurden mit der Kaplan-Meier-Methode Überlebenskurven berechnet und die Verläufe durch den Log-Rank Test verglichen. Es wurden der Mittelwert sowie der Median der Gesamtüberlebenszeit bei jedem Patienten ermittelt und mit dem Ausmaß der Molekülexpression korreliert. Des Weiteren erfolgten Subgruppen Analysen, in denen die Daten von den Patienten mit gesicherten Lebermetastasen und die Daten von den Patienten ohne Lebermetastasen getrennt voneinander ausgewertet wurden. Hierbei zeigten sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse, folglich wurden diese Auswertungen im folgenden Ergebnisteil nicht aufgeführt. In dem Ergebnisteil wurde der Einfachheit halber nur der Median der Überlebenszeit präsentiert. Von einem statistisch signifikanten Unterschied wurde bei einem p-Wert  $p < 0,05$  ausgegangen. Dabei war der primäre Endpunkt das Gesamtüberleben der Patienten, gemessen zwischen Zeitpunkt der initialen Tumoroperation und den letzten Überlebensdaten aus dem Follow-up oder dem Tod der Patienten. Patienten, die aus anderen Gründen ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr nachverfolgt wurden, wurden ab diesem Zeitpunkt zensiert.

### 3 Ergebnisse

Im folgenden Teil werden, unterteilt nach untersuchtem Molekül und Gewebe, die Ergebnisse präsentiert.

#### 3.1 CXCR4

Die statistische Auswertung der CXCR4 Färbung erfolgte von 54 Primärtumoren (im folgenden PT), 49 Leberproben (im folgenden LP), 33 LK Metastasen und 50 metastasenfremen LK. 16 LP stammten von Lebermetastasen, 33 aus metastasenfremen Gewebe.

Das metastasenfrem Lebergewebe färbte sich fast ausschließlich stark an (bei 32 von 33 Proben), bei den Lebermetastasen trat eine starke Färbung weniger häufig auf (8 von 16 Proben).

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Gesamtüberlebenszeit der Patienten abhängig von dem Ausmaß der CXCR 4 Expression in der Leber. Patienten mit hoher Expression von CXCR 4 lebten im Median (21,93 Monate) im Vergleich zu Patienten mit mäßiger Expression (4,66 Monate) signifikant länger (p-Wert < 0.001). Ein Vergleich mit leichter oder keiner Expression war nicht möglich, da es keine Präparate mit geringer Färbung und nur ein Präparat ohne Färbung gab.

Für die anderen untersuchten Gewebe zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Gesamtüberlebenszeit abhängig von der CXCR 4 Expression. So zeigt sich z. B. für den PT bei mäßiger Färbung ein höherer Median (21,9 Monate) der Überlebenszeit, im Vergleich zu geringer (Median 19,5 Monate) oder hoher (Median 17,8 Monate) CXCR4 Expression. Diese Unterschiede in der Überlebenszeit abhängig von der CXCR4 Expression sind jedoch statistisch nicht signifikant. Auf Einzelheiten zur statistischen Auswertung wird in den folgenden Tabellen und Grafiken eingegangen.

### 3.1.1 Primärtumor

Tab.4. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der CXCR 4 Expression

CXCR4 - PT	Median (in Monaten)		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Negativ	20,79	.	.
Leicht Positiv	19,48	14,20	24,76
Mäßig Positiv	21,93	14,78	29,08
Hoch Positiv	17,87	5,25	30,49
Gesamt	20,52	16,92	24,12

Tab.5. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der CXCR4 Expression

CXCR4 - PT	Negativ	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Negativ		,81	,65	,74
Leicht Positiv	,81		,77	,46
Mäßig Positiv	,65	,77		,25
Hoch Positiv	,76	,46	,25	

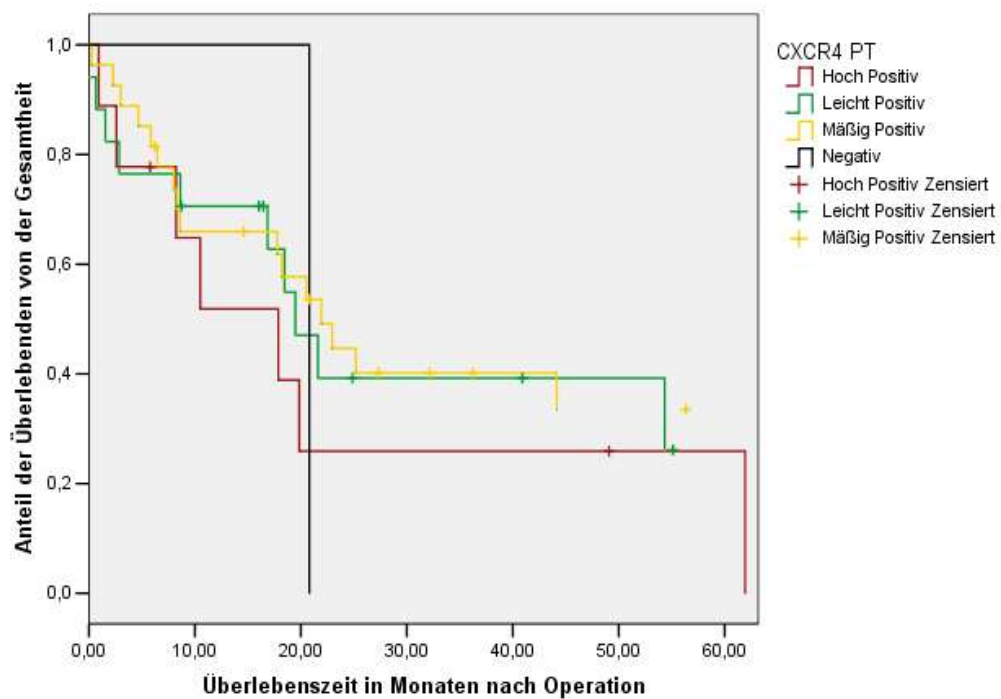


Abb. 9: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CXCR 4 Expression im PT

### 3.1.2 Leberbiopsie

Tab.6. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der CXCR 4 Expression

CXCR4 - Leber	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Negativ	22,95	.	.
Mäßig Positiv	4,66	,00	10,44
Hoch Positiv	21,93	,00	50,47
Gesamt	20,52	16,18	24,86

Tab.7. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der CXCR4 Expression

CXCR4 - Leber	Negativ	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Negativ		,19	,74
Mäßig Positiv	,19		,00
Hoch Positiv	,74	,00	

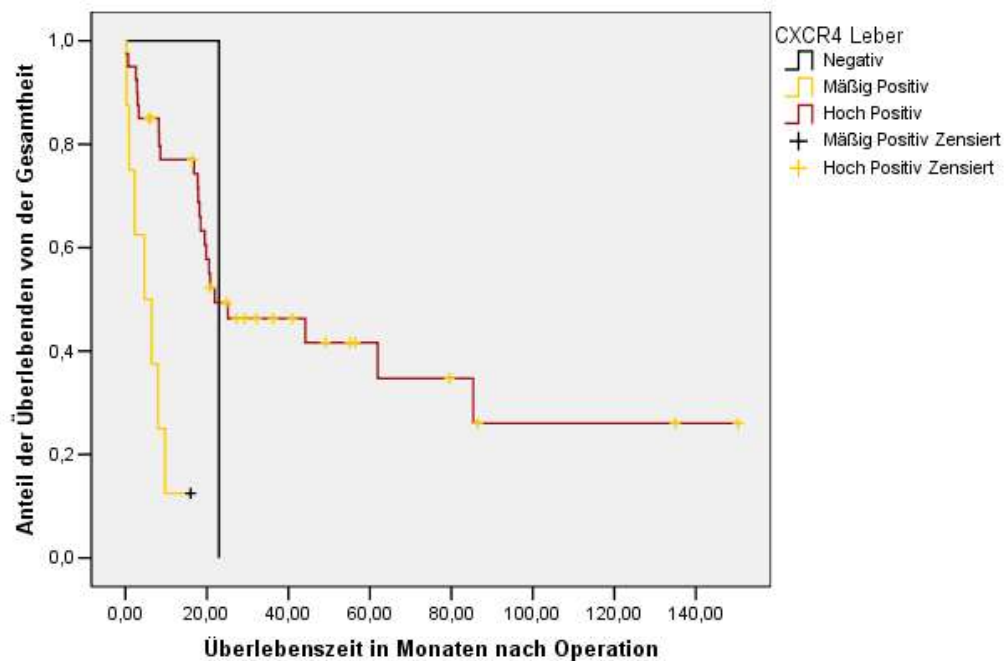


Abb. 10: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CXCR 4 Expression in der Leber

### 3.1.3 Lymphknotenmetastase

Tab.8. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der CXCR 4 Expression

CXCR4 - LK Metastase	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Negativ	18,46	,00	45,54
Leicht Positiv	8,00	,00	23,05
Mäßig Positiv	17,87	5,14	30,60
Hoch Positiv	17,77	,00	36,47
Gesamt	17,77	5,43	30,11

Tab.9. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der CXCR4 Expression

CXCR4 - LK Metastase	Negativ	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Negativ		,36	,59	,83
Leicht Positiv	,36		,47	,12
Mäßig Positiv	,59	,47		,30
Hoch Positiv	,83	,12	,30	

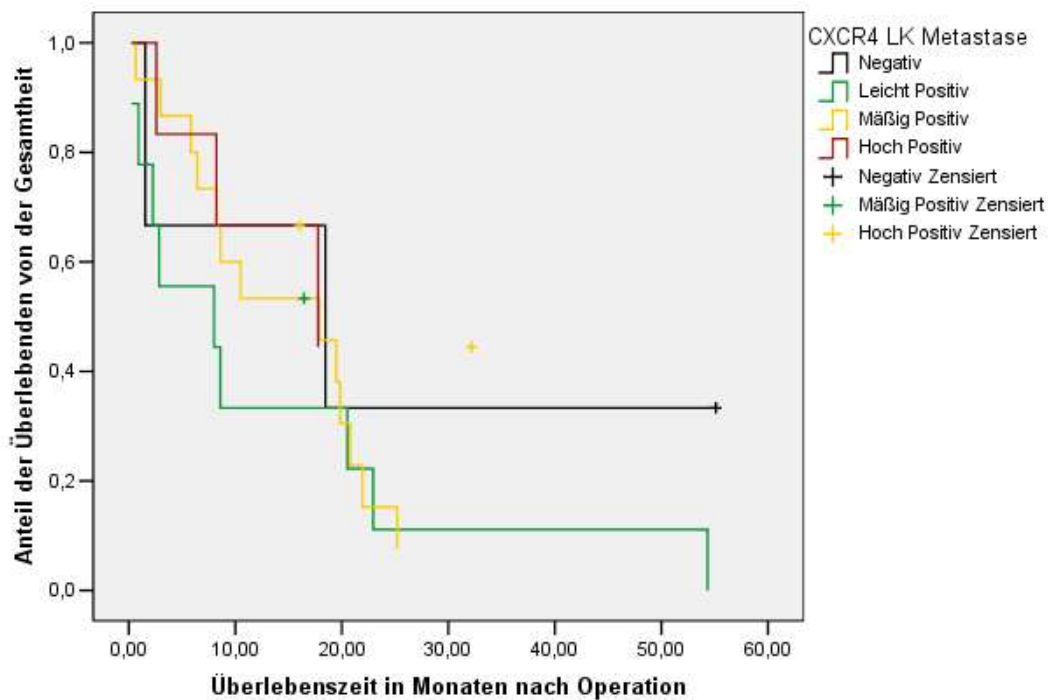


Abb. 11: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CXCR 4 Expression in der LK Metastase

### 3.1.3 Tumorfreie Lymphknoten

Tab.10. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der CXCR 4 Expression

CXCR4 – LK ohne Metastase	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Negativ	19,84	17,63	22,05
Leicht Positiv	25,18	,00	53,81
Mäßig Positiv	20,79	15,93	25,65
Hoch Positiv	19,48	.	.
Gesamt	21,61	17,78	25,44

Tab.11. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der CXCR4 Expressionen

CXCR4 – LK Ohne Metastase	Negativ	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Negativ		,94	,80	,50
Leicht Positiv	,94		,85	,47
Mäßig Positiv	,80	,85		,77
Hoch Positiv	,50	,47	,77	

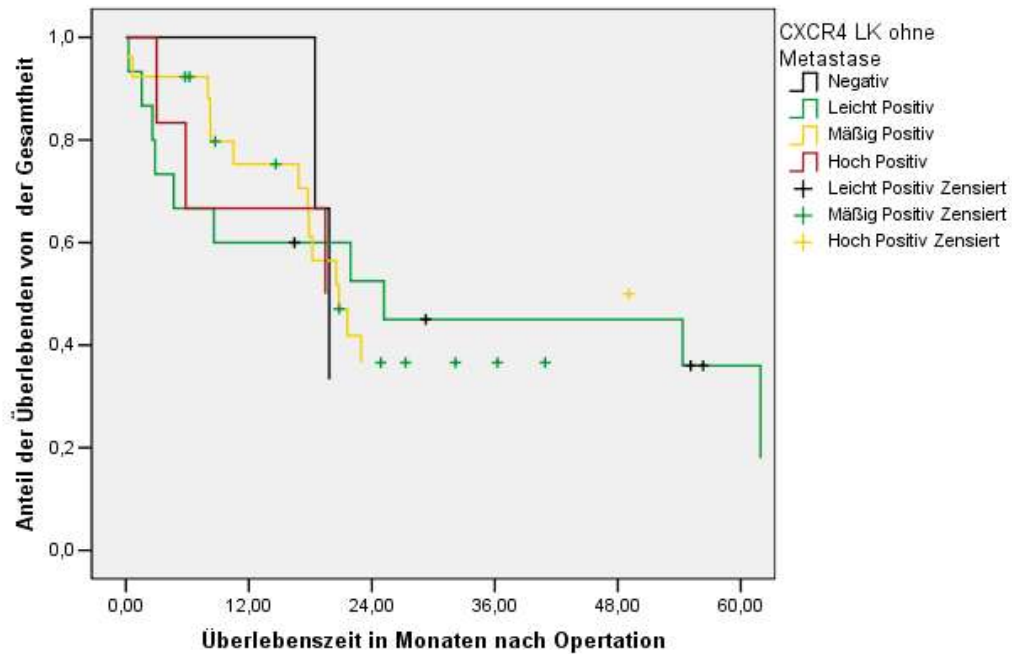


Abb. 12: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CXCR 4 Expression im Tumorfreien LK

## 3.2 E-Cadherin

Die statistische Auswertung der E-Cadherin Färbung erfolgte von 54 PT, 50 LP, 33 LK Metastasen und 47 metastasenfremen LK. 17 LP stammten von Lebermetastasen, 33 aus metastasenfremem Gewebe.

Das metastasenfremes Lebergewebe färbte sich ausschließlich stark an, bei den Lebermetastasen trat eine starke Färbung weniger häufig auf (12 von 17 Proben).

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Gesamtüberlebenszeit abhängig von dem Ausmaß der E-Cadherin Expression in der Leber. Patienten mit hoher Expression von E-Cadherin lebten im Median (20,79 Monate) im Vergleich zu Patienten mit mäßiger Expression (6,43 Monate) signifikant länger (p-Wert 0.033). Für die anderen untersuchten Gewebe zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Gesamtüberlebenszeit abhängig von der E-Cadherin Expression.

### 3.2.1 Primärtumor

Tab.12. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expression

E-Cadherin PT	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Leicht Positiv	16,85	,00	65,18
Mäßig Positiv	21,61	14,23	28,99
Hoch Positiv	19,48	15,50	23,46
Gesamt	20,52	16,91	24,12

Tab.13. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expressionen

E-Cadherin PT	Leicht positiv p-Wert	Mäßig positiv p-Wert	Hoch Positiv p-Wert
Leicht Positiv		,39	,63
Mäßig Positiv	,39		,469
Hoch Positiv	,63	,469	



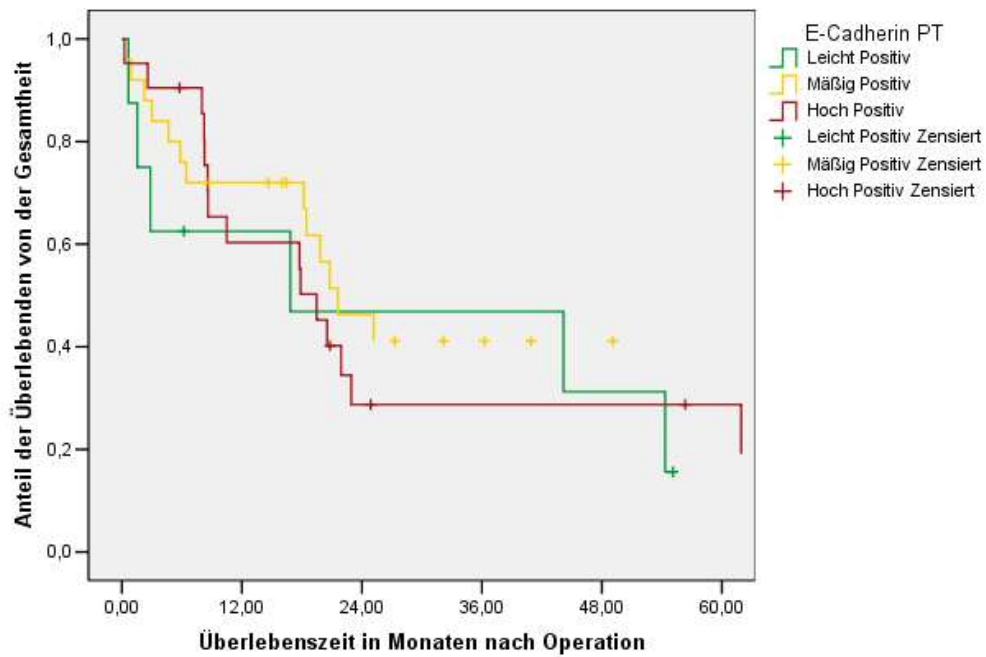


Abb. 13: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expression im Primär Tumor

### 3.2.2 Leberbiopsie

Tab.14. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expression

E-Cadherin Leber	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Mäßig Positiv	6,43	,000	18,260
Hoch Positiv	20,79	14,117	27,463
Gesamt	20,52	16,526	24,514

Tab.15. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expressionen

E-Cadherin Leber	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert
Mäßig Positiv		0,033
Hoch Positiv	0,033	

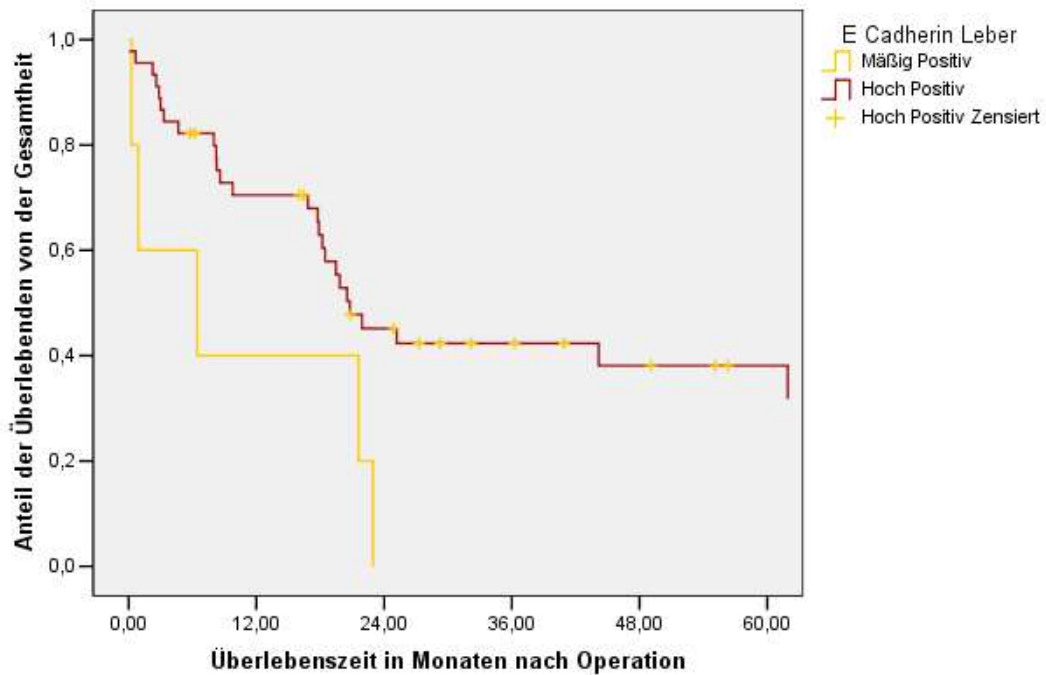


Abb. 14: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expression im Primär Tumor

### 3.2.3 Lymphknotenmetastase

Tab.16. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expression

E-Cadherin LK Metastase	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Leicht Positiv	8,59	,00	22,18
Mäßig Positiv	10,49	,00	29,21
Hoch Positiv	22,95	.	.
Gesamt	17,77	5,43	30,11

Tab.17. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expressionen

E-Cadherin LK Metastase	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv		,294	,023
Mäßig Positiv	,294		,016
Hoch Positiv	,023	,016	

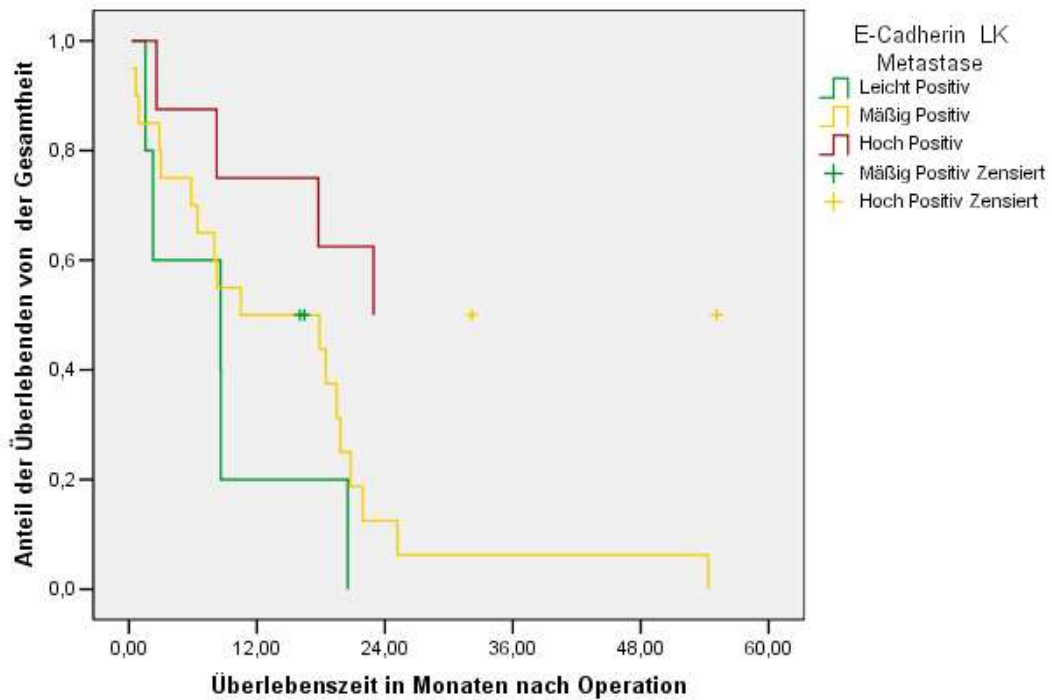


Abb. 15: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expression im LK mit Metastase

### 3.2.3 Tumorfreie Lymphknoten

Tab.18. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expression

E-Cadherin LK ohne Metastase	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Leicht Positiv	17,87	10,89	24,85
Mäßig Positiv	25,18	,00	67,83
Hoch Positiv	22,95	.	.
Gesamt	21,93	15,28	28,58

Tab.19. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expressionen

E-Cadherin LK ohne Metastase	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv		,658	,943
Mäßig Positiv	,658		,694
Hoch Positiv	,943	,694	

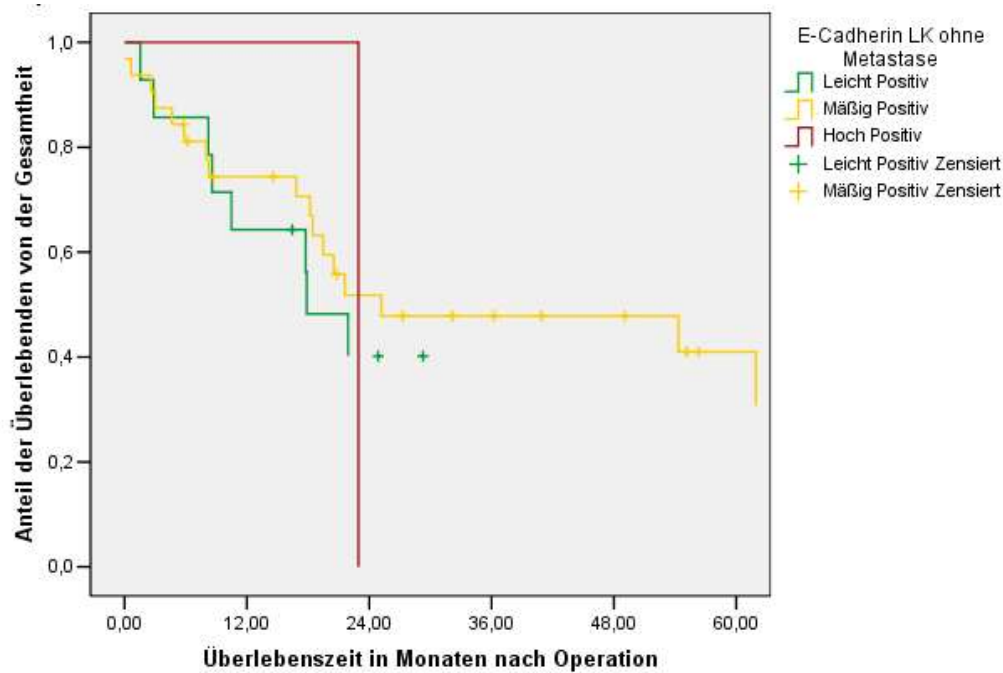


Abb. 16: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der E-Cadherin Expression im Tumorfreen LK

### 3.3 Midkin

Die statistische Auswertung der Midkin Färbung erfolgte von 51 PT, 47 LP, 32 LK Metastasen und 45 metastasenfreen LK. 15 LP stammten von Lebermetastasen, 32 aus metastasenfreen Gewebe.

Das metastasenfreen Lebergewebe färbte sich häufiger stark an (24 von 32 Proben), bei den Lebermetastasen trat eine starke Färbung weniger häufig auf (9 von 15 Proben).

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Gesamtüberlebenszeit der Patienten abhängig von dem Ausmaß der Midkin Expression in der Leber. Patienten mit hoher Expression von Midkin lebten im Median (22,95 Monate) im Vergleich zu Patienten mit geringer Expression (6,43 Monate) signifikant länger (p-Wert 0.005).

In der alternativen Gruppierung, in der mäßige und hohe Midkin Expression in der Leber in einer Gruppe zusammengefasst wurden, zeigte sich im Vergleich zur geringen Expression ebenfalls eine statistisch signifikant unterschiedliche Überlebenszeit (p-Wert 0,012).

Für die übrigen untersuchten Gewebe konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Gesamtüberlebenszeit abhängig von der Midkin Expression gefunden werden. Bei den LK ohne Metastasen erfolgte keine Beurteilung der medianen Überlebenszeit, da alle Fälle mit hoher Midkin Expression zensiert wurden.

### 3.3.1 Primärtumor

Tab.20. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der Midkin Expression

Midkin PT	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Negativ	19,84	3,03	36,65
Leicht Positiv	19,48	15,94	23,02
Mäßig Positiv	22,95	17,57	28,33
Hoch Positiv	20,52	16,93	24,11
Gesamt	21,61	17,78	25,44

Tab.21. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Midkin Expressionen

Midkin PT	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv		,48	,43
Mäßig Positiv	,48		,37
Hoch Positiv	,44	,37	

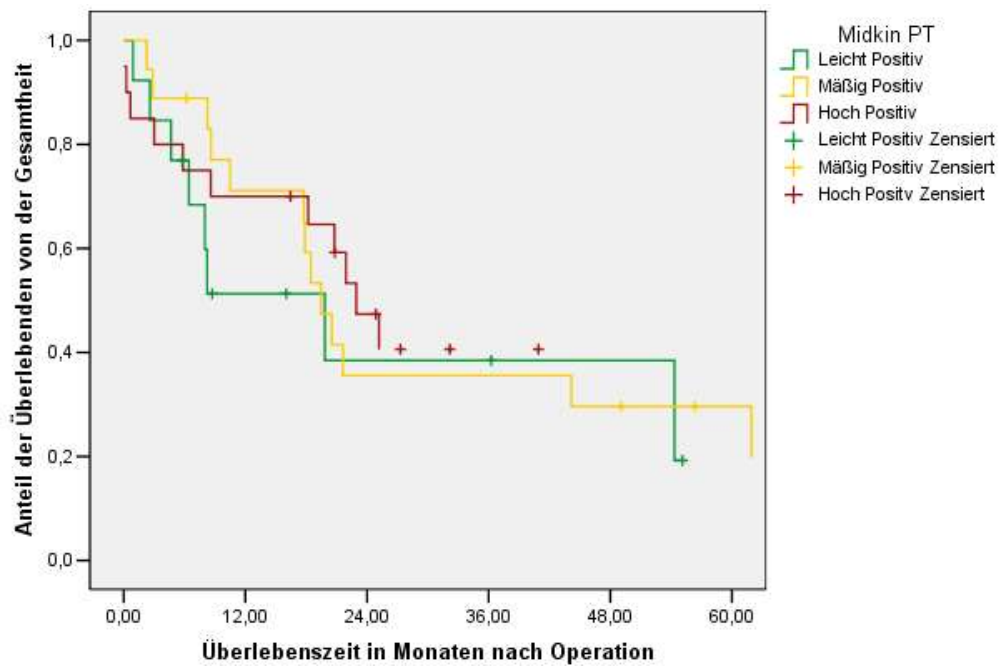


Abb. 17: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Midkin Expression im Primär Tumor

### 3.3.2 Leberbiopsie

Tab.22. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der Midkin Expression

Midkin Leber	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Leicht Positiv	6,43	0	15,38
Mäßig Positiv	21,93	0	57,46
Hoch Positiv	22,95	15,71	30,19
Gesamt	20,79	15,36	26,22

Tab.23. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Midkin Expressionen

Midkin Leber	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv		,212	,005
Mäßig Positiv	,212		,742
Hoch Positiv	,005	,742	

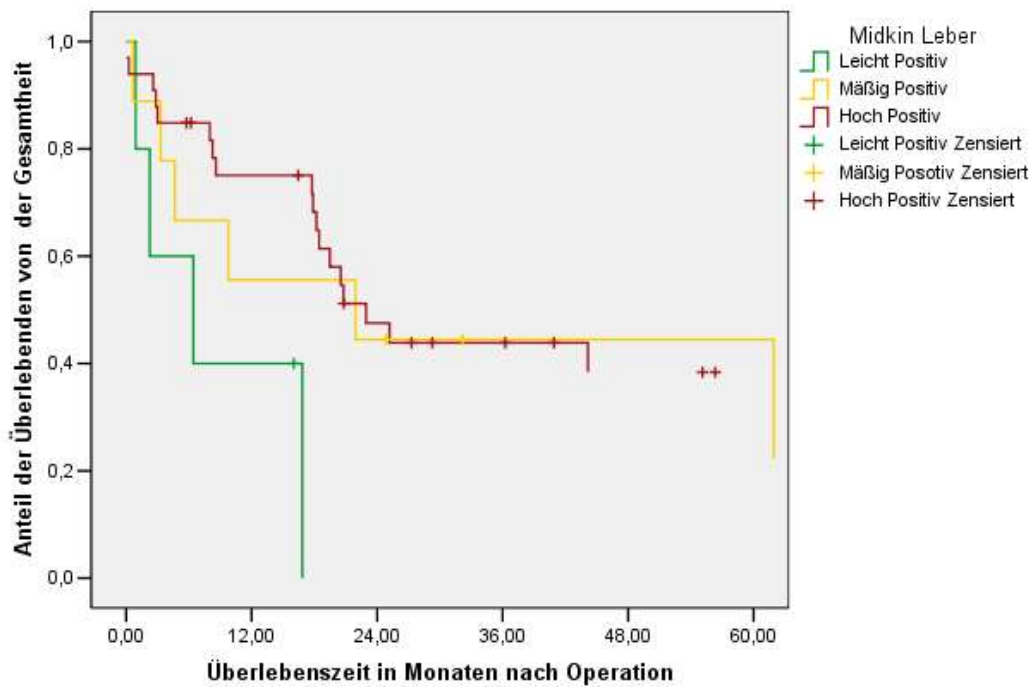


Abb. 18: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Midkin Expression in der Leber

### 3.3.3 Lymphknotenmetastasen

Tab.24. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der Midkin Expression

Midkin - LK Metastase	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Leicht Positiv	8,590	4,575	12,605
Mäßig Positiv	20,790	17,159	24,421
Hoch Positiv	3,000	,000	20,908
Gesamt	17,770	5,226	30,314

Tab.25. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Midkin Expressionen

Midkin - LK Metastase	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv		,12	,81
Mäßig Positiv	,12		,39
Hoch Positiv	,81	,39	

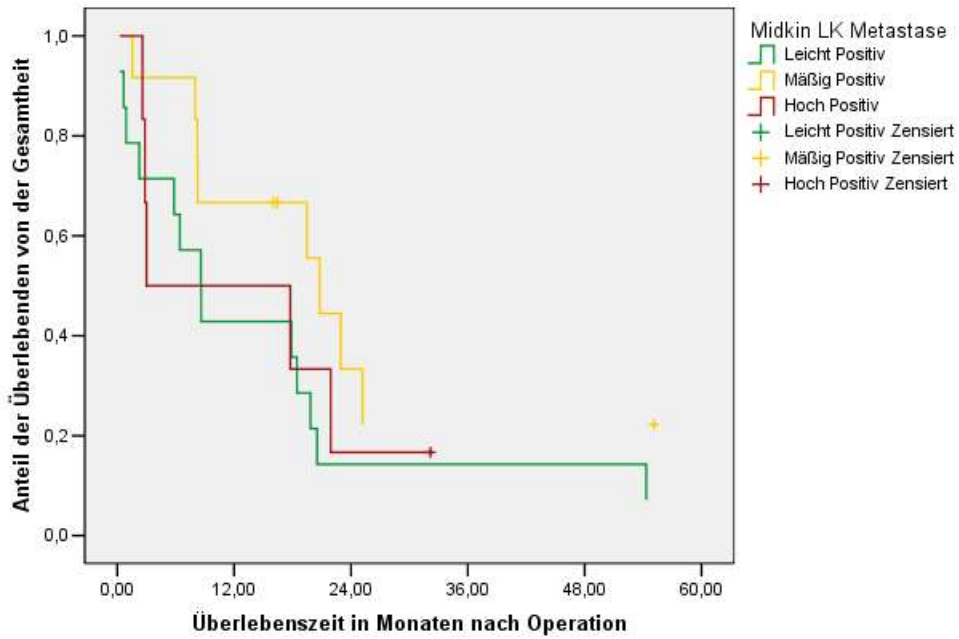


Abb. 19: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Midkin Expression in der LK Metastase

### 3.3.4 Tumorfreie Lymphknoten

Tab.26. Übersicht über die Farbverteilung bei Midkin LK, sowie die Zahl der Ereignisse (Tod) und Zensurierung. Alle Fälle mit hoher Midkin Expression wurden zensiert.

Midkin LK Ohne Metastase	Zahl der PT Proben	Zahl der Er- eignisse	Zensiert	
			N	Prozent
Leicht Positiv	31	19	12	38,7%
Mäßig Positiv	10	8	2	20,0%
Hoch Positiv	4	0	4	100,0%
Gesamt	45	27	18	40,0%

Tab.27. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Midkin Expressionen

Midkin LK Ohne Metastase	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv		,111	,102
Mäßig Positiv	,111		,033
Hoch Positiv	,102	,033	



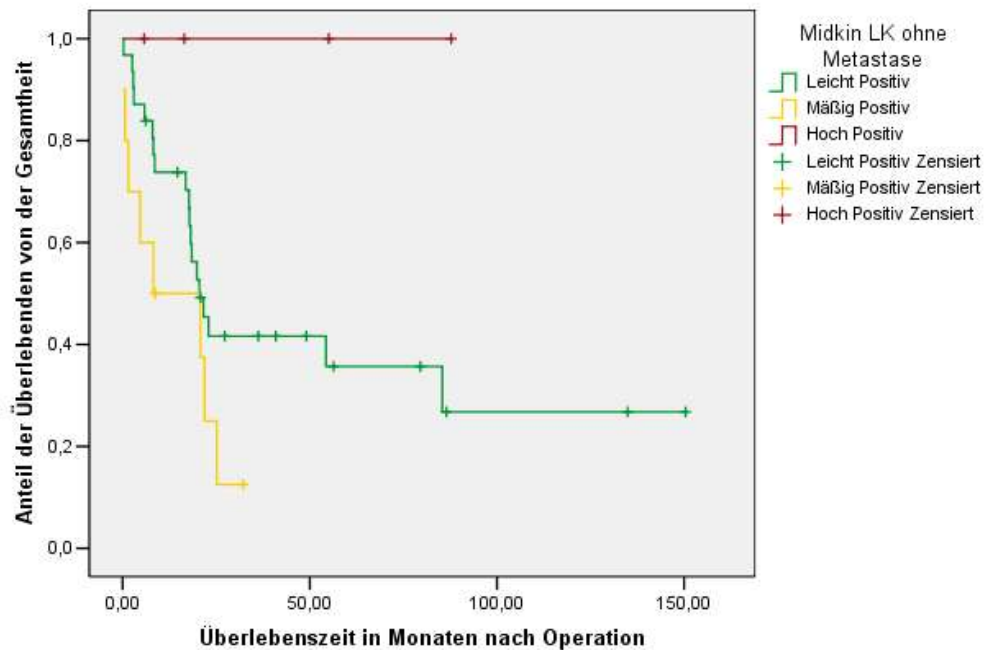


Abb. 20: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Midkin Expression im Tumorfreen LK

### 3.4 Periostin

Die statistische Auswertung der Periostin Färbung erfolgte von 51 PT, 51 LP, 32 LK Metastasen und 46 metastasenfreen LK. 17 LP stammten von Lebermetastasen, 34 aus metastasenfreen Gewebe.

Das metastasenfreen Lebergewebe färbte sich ausschließlich stark an, bei den Lebermetastasen trat eine starke Färbung weniger häufig auf (11 von 17 Proben).

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Gesamtüberlebenszeit der Patienten abhängig von dem Ausmaß der Periostin Expression in der Leber. Patienten mit hoher Expression von Periostin lebten im Median (20,79 Monate) im Vergleich zu Patienten mit geringer Expression (6,43 Monate) signifikant länger (p-Wert 0.021).

### 3.4.1 Primärtumor

Tab.28. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der Periostin Expression

Periostin- PT	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Leicht Positiv	16,85	,00	34,74
Mäßig Positiv	20,79	11,98	29,60
Hoch Positiv	20,52	15,34	25,70
Gesamt	19,84	16,65	23,03

Tab.29. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Periostin Expressionen

Periostin- PT	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv		,20	,30
Mäßig Positiv	,20		,80
Hoch Positiv	,30	,80	

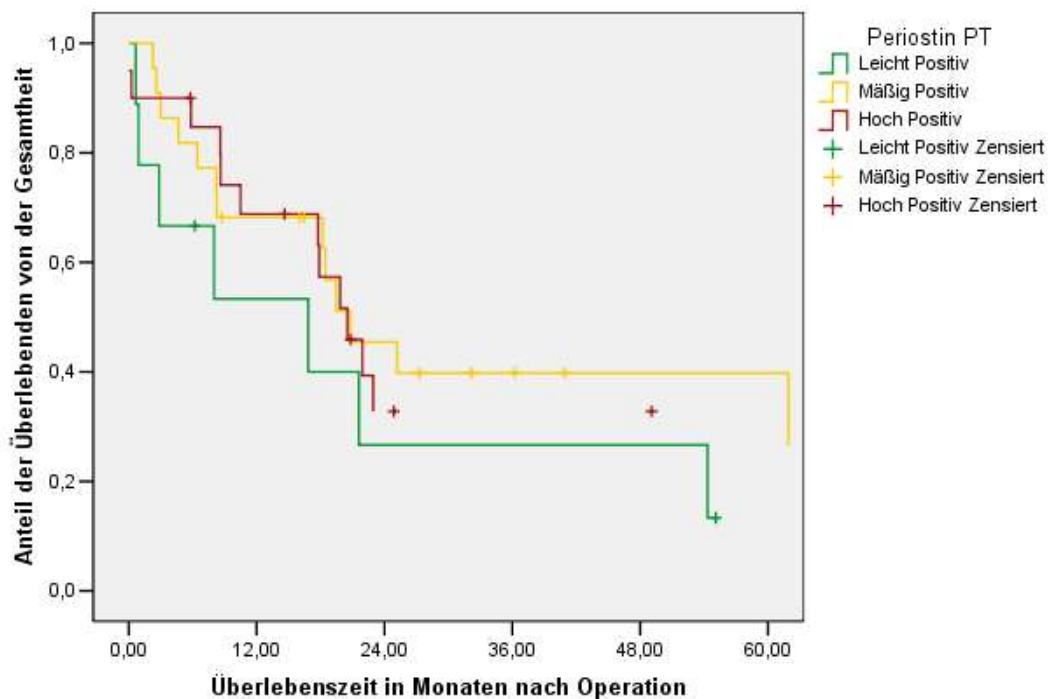


Abb. 21: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Periostin Expression im Primär Tumor

### 3.4.2 Leberbiopsie

Tab.30. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der Periostin Expression

Periostin Leber	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Mäßig Positiv	6,43	,25	12,61
Hoch Positiv	20,79	14,12	27,46
Gesamt	20,52	16,49	24,55

Tab.31. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Periostin Expressionen

Periostin Leber	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert
Mäßig Positiv		,021
Hoch Positiv	,021	

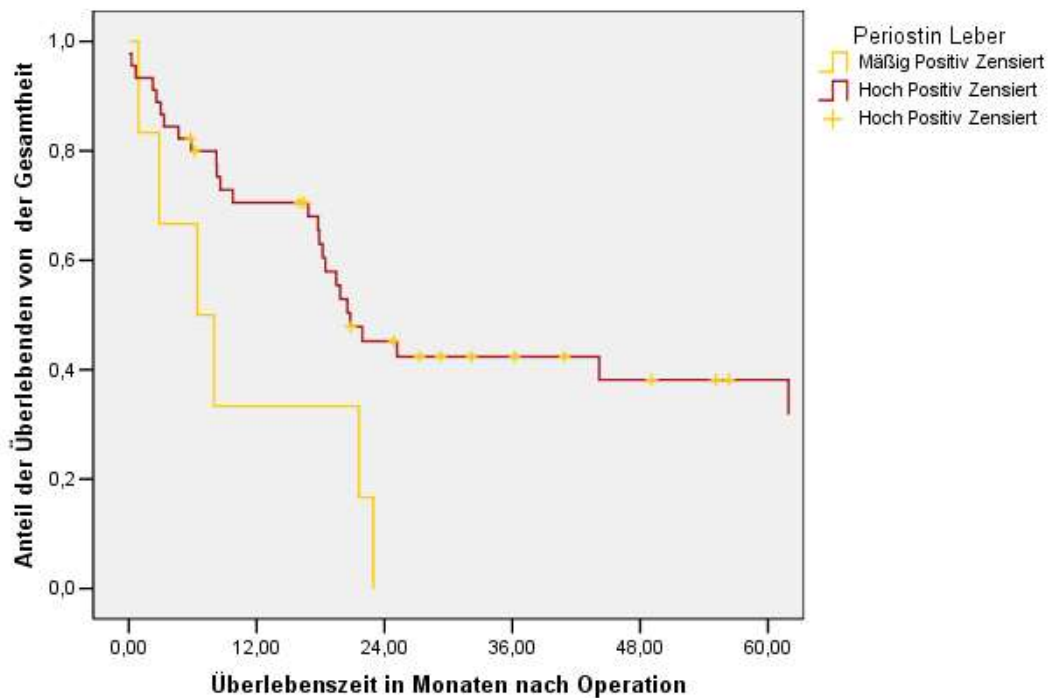


Abb. 22: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Periostin Expression in der Leber

### 3.4.3 Lymphknotenmetastase

Tab.32. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der Periostin Expression

Periostin LK Metastase	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Leicht Positiv	20,52	15,45	25,59
Mäßig Positiv	8,26	4,25	12,28
Hoch Positiv	19,84	13,39	26,29
Gesamt	17,87	6,63	29,11

Tab.33. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Midkin Expressionen

Periostin LK Metastase	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv		,027	
Mäßig Positiv	,027		,567
Hoch Positiv	,567	,027	,027

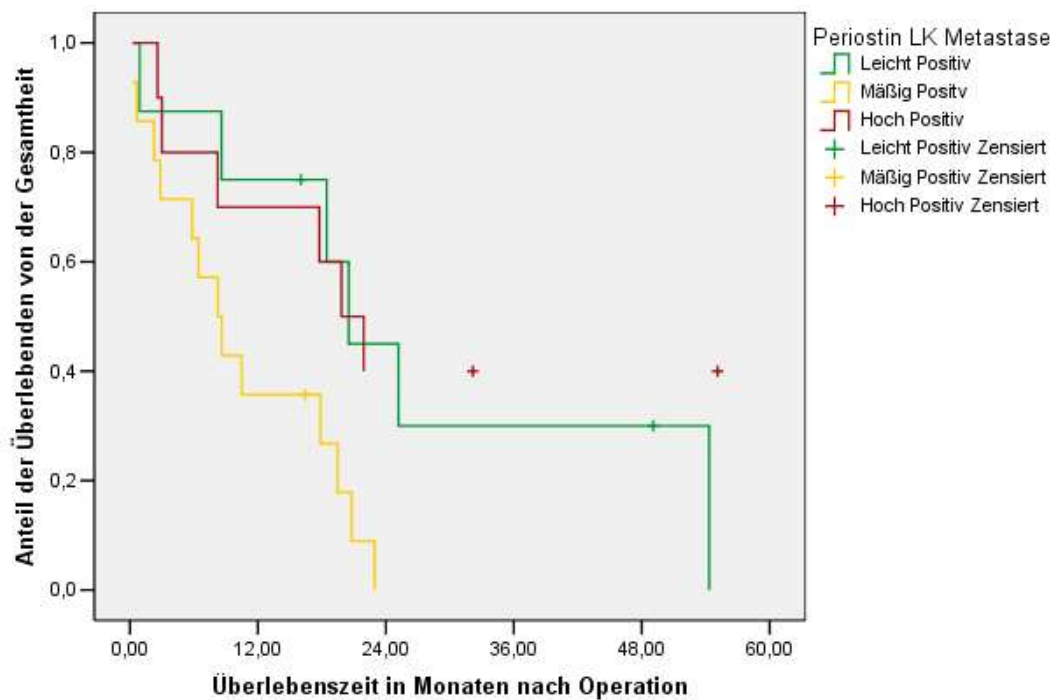


Abb. 23: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Periostin Expression in der LK Metastase

### 3.4.4 Tumorfreie Lymphknoten

Tab.34. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der Periostin Expression

Periostin LK Ohne Metastase	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Leicht Positiv	20,79	15,34	26,24
Mäßig Positiv	22,95	0,00	67,70
Hoch Positiv	2,59	.	.
Gesamt	21,93	16,55	27,31

Tab.35. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Periostin Expressionen

Periostin LK Ohne Metastase	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv		,35	
Mäßig Positiv	,35		,001
Hoch Positiv	,001	,011	,011

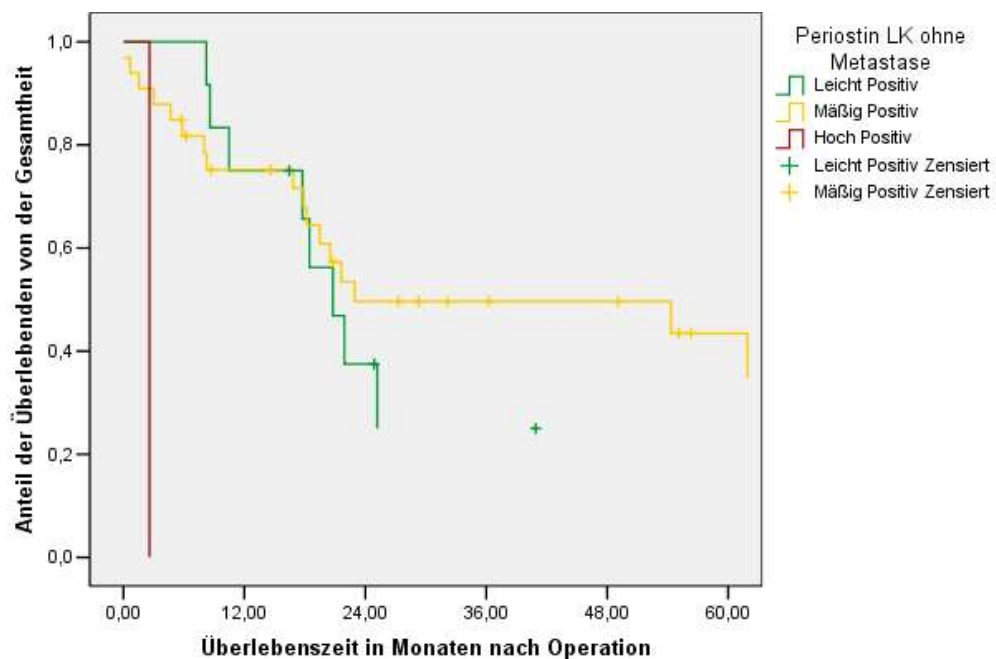


Abb. 24: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Periostin Expression im Tumorfreien LK

### 3.5 CD 45

Die statistische Auswertung der CD 45 Färbung erfolgte von 53 PT, 50 LP, 34 LK Metastasen und 49 metastasenfremen LK. 17 LP stammten von Lebermetastasen, 33 aus metastasenfremem Gewebe.

Das metastasenfremes Lebergewebe färbte sich überwiegend stark an (26 von 33 Proben), bei den Lebermetastasen trat nur eine starke Färbung auf.

Bei der alternativen Gruppierung, in der die Patienten mit mäßiger und hoher CD 45 Expression zusammengefasst wurden, zeigte sich das gesunde Lebergewebe ausschließlich stark gefärbt (33 von 33), während bei den Lebermetastasen nur 5 von 17 Proben stärker gefärbt waren. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Gesamtüberlebenszeit der Patienten abhängig von dem Ausmaß der CD 45 Expression in der Leber. Patienten mit hoher Expression von CD 45 lebten im Median (20,79 Monate) im Vergleich zu Patienten mit geringer Expression (6,43 Monate) signifikant länger (p-Wert 0.015). Auch Patienten mit mäßiger CD 45 Expression hatten im Vergleich zu den Patienten mit geringer CD 45 Expression ein deutlich signifikant längeres Gesamtüberleben (p-Wert 0.004). Zwischen einer mäßigen und starken CD 45 Expression konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit gefunden werden (p-Wert 0.18). Bei der alternativen Gruppierung, in der Patienten mit mäßiger und hoher CD 45 Expression in der Leber zusammengefasst wurden und mit Patienten mit geringer CD 45 Expression in der Leber verglichen wurden, zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Das Gesamtüberleben der Patienten mit starker CD 45 Expression war im Median (25,18 Monate) im Vergleich zu den Patienten mit geringer CD 45 Expression (6,43 Monaten) signifikant länger (p-Wert 0.001). Für die übrigen untersuchten Gewebe konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Gesamtüberlebenszeit abhängig von der CD 45 Expression gefunden werden. In der Subgruppen Analyse, bei der die Daten der Patienten ohne nachgewiesene Lebermetastasen untersucht wurden, zeigte sich ein deutlicher Trend zur besseren Prognose (gemessen in der Gesamtüberlebenszeit) bei mittelgradiger CD 45 Expression im Vergleich zu hoher CD 45 Expression. Eine statistische Signifikanz wurde knapp verfehlt (p-Wert 0,056). Ein Vergleich mit den Patienten mit niedriger CD 45 Expression war nicht möglich, da in diesem Kollektiv nur ein Patient vertreten war.

### 3.5.1 Primärtumor

Tab.36. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der CD 45 Expression

CD45 – PT	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Leicht Positiv	19,84	16,82	22,86
Mäßig Positiv	18,2	11,27	25,13
Gesamt	19,84	16,30	23,39

Tab.37. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der CD 45 Expression

CD45 - PT	Leicht positiv	Mäßig positiv
	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv		,95
Mäßig Positiv	,95	

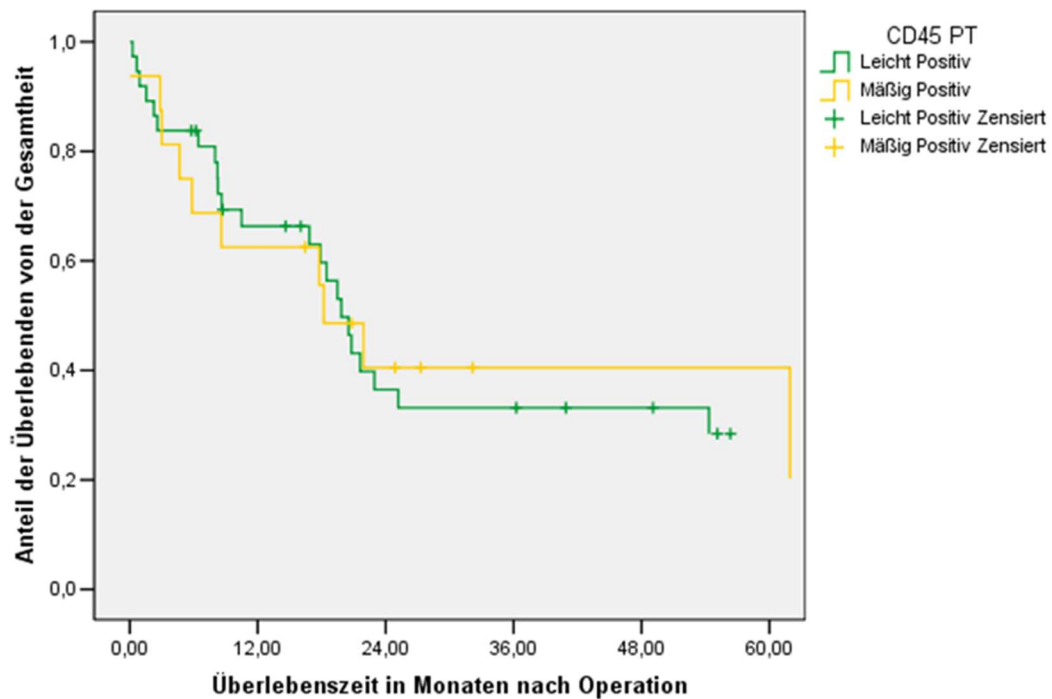


Abb. 25: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CD 45 Expression im Primär Tumor

### 3.5.2a Leberbiopsie

Tab.38. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der CD 45 Expression

CD45 Leber	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Leicht Positiv	6,43	0	15,03
Mäßig Positiv	.	.	.
Hoch Positiv	20,79	12,19	29,39
Gesamt	20,52	16,53	24,51

Tab.39. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der CD 45 Expression

CD45 Leber	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv		,004	,015
Mäßig Positiv	,004		,175
Hoch Positiv	,015	,175	

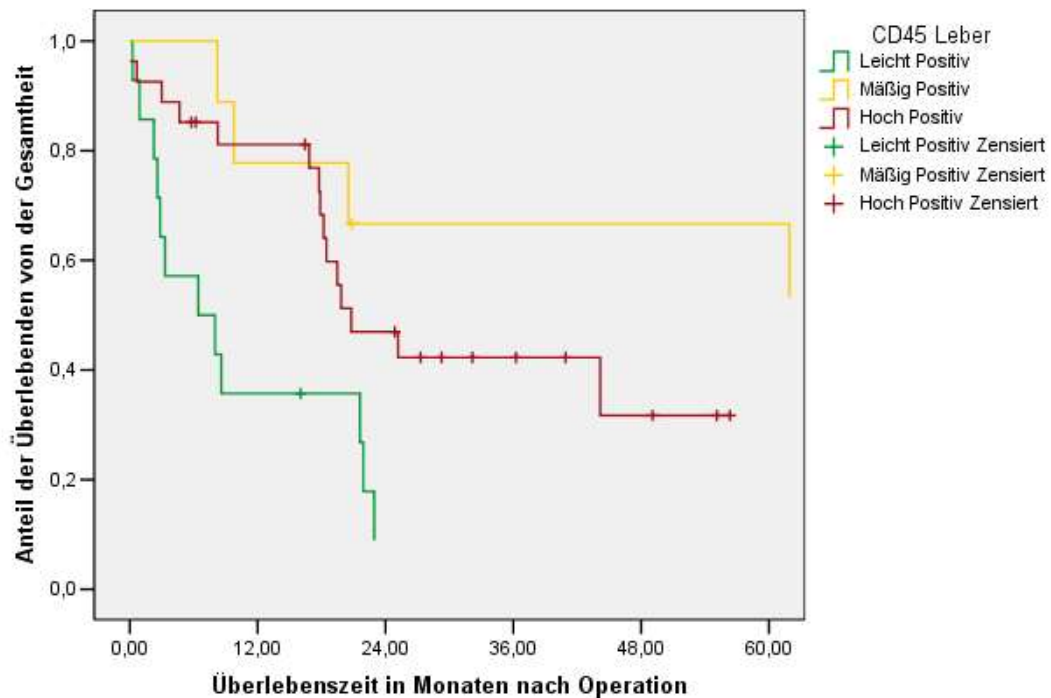


Abb. 26: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CD 45 Expression in der Leber



### 3.5.2b Leberbiopsie alternative Einteilung in 3 Farbstufen

Tab.40. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der CD 45 Expression

CD45 Leber	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Leicht Positiv	6,430	,000	15,029
Hoch Positiv	25,180	,000	59,091
Gesamt	20,520	16,526	24,514

Tab.41. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der CD 45 Expression

CD45 Leber	Leicht positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv Hoch Positiv	,001	,001

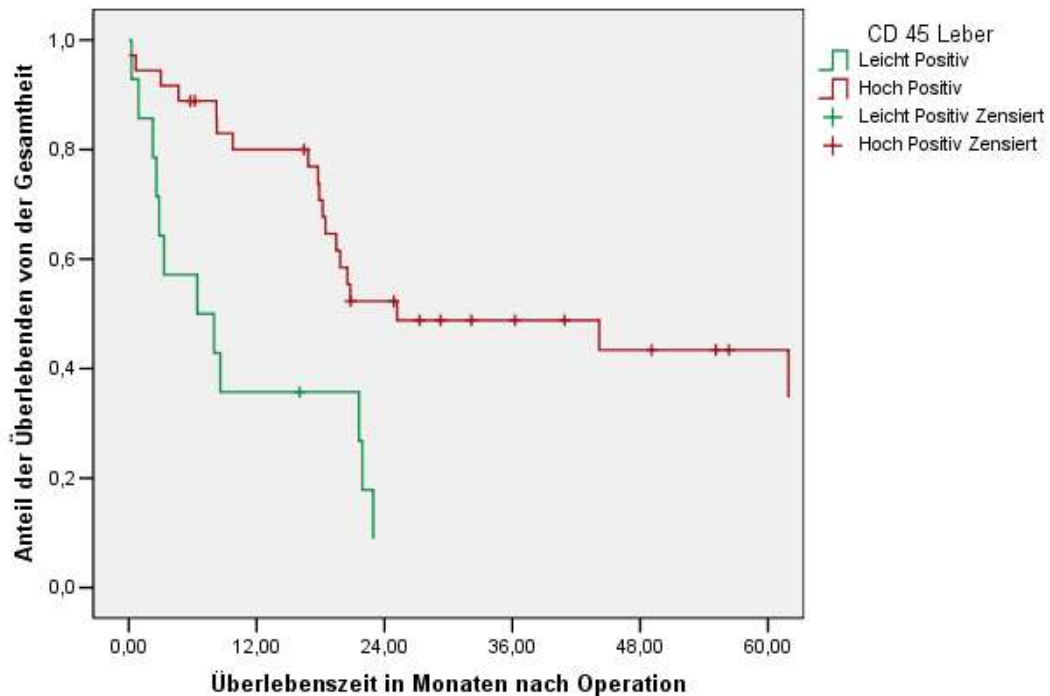


Abb. 27: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CD 45 Expression in der Leber

### 3.5.3 Lymphknotenmetastase

Tab.41. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der CD 45 Expression

CD45 LK Metastase	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Leicht Positiv	8,62	4,98	12,26
Mäßig Positiv	18,46	15,73	21,19
Hoch Positiv	3,00	.	.
Gesamt	17,77	4,82	30,72

Tab.42. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der CD 45 Expression

CD45 LK Metastase	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv		,74	,20
Mäßig Positiv	,74		,09
Hoch Positiv	,20	,09	

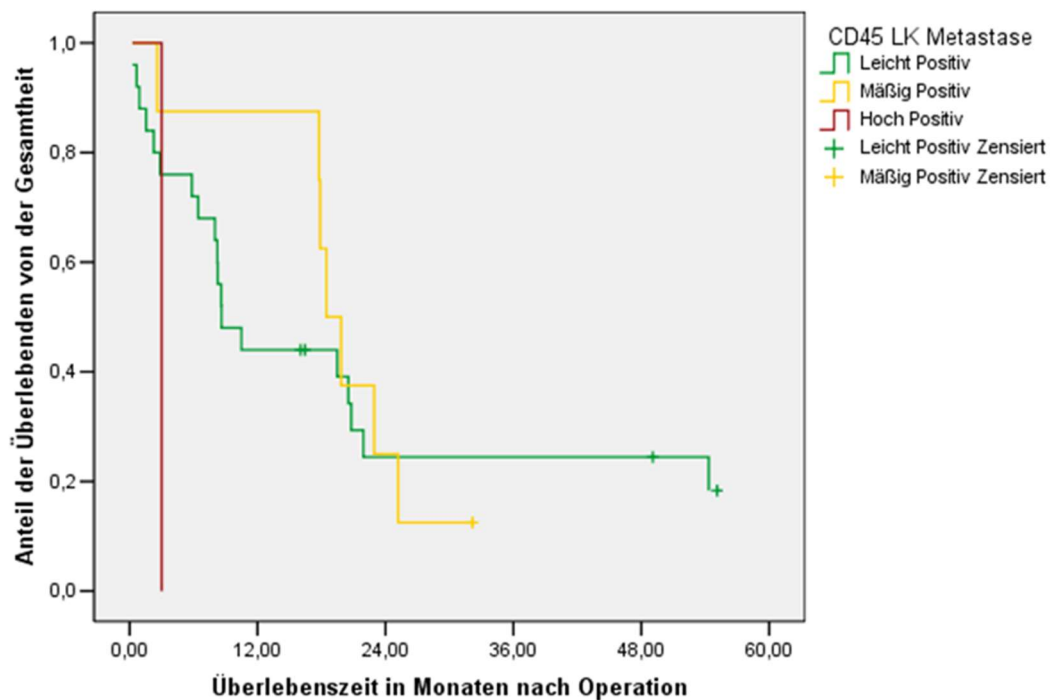


Abb. 28: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CD 45 Expression in der LK Metastase

### 3.5.4 Tumorfreie Lymphknoten

Tab.43. Median der Überlebenszeit in Monaten in Abhängigkeit von der CD 45 Expression

CD45 - LK Ohne Metastase	Median		
	Schätzung	95%Konfidenz- Intervall	
		Untere Grenze	Obere Grenze
Leicht Positiv	6,43	0	15,03
Mäßig Positiv	.	.	.
Hoch Positiv	20,79	12,19	29,39
Gesamt	20,52	16,53	24,51

Tab.44. Paarweiser Vergleich der medianen Überlebenszeit in Abhängigkeit von der CD 45 Expression

CD45 - LK Ohne Metastase	Leicht positiv	Mäßig positiv	Hoch Positiv
	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Leicht Positiv		,38	,30
Mäßig Positiv	,38		,40
Hoch Positiv	,30	,40	

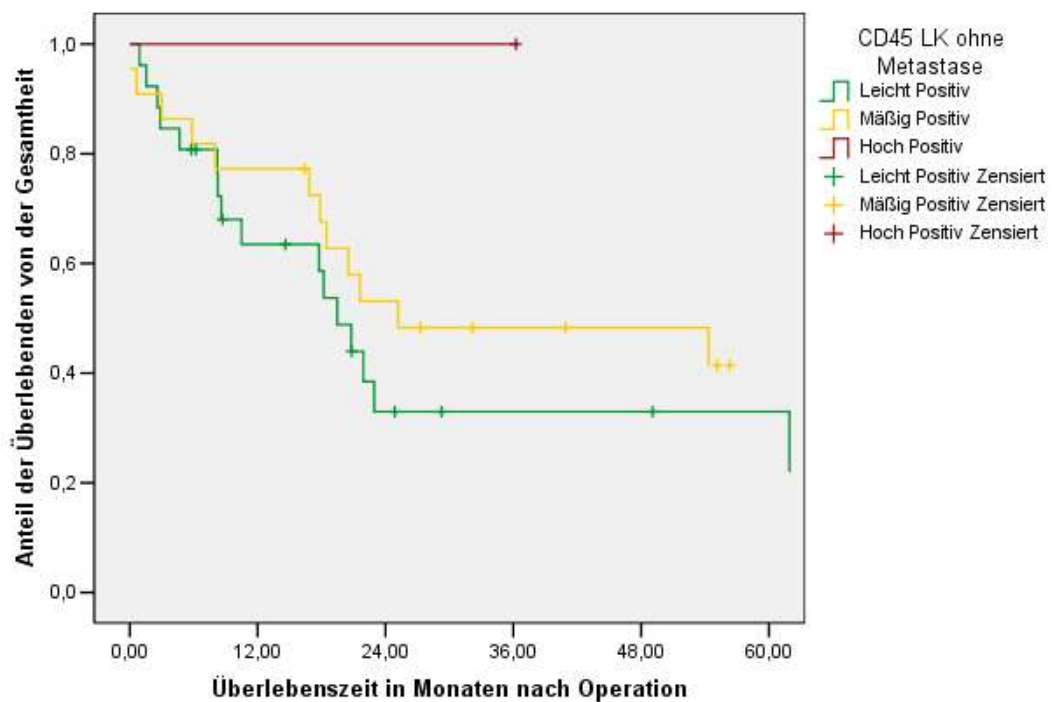


Abb. 29: Kaplan Meier Kurven der Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der CD 45 Expression im Tumorfreien LK

## 4 Diskussion

In diesem Abschnitt der Dissertation wird sich kritisch mit der Methodik und den Ergebnissen dieser Arbeit auseinandergesetzt. Zudem wird ein Bezug zu vergleichbaren Studienergebnissen hergestellt und in Zusammenhang mit den eigenen Ergebnissen gesetzt, um das Verständnis der molekularen Grundlagen der Metastasierung des Ösophaguskarzinoms zu verbessern.

Es konnten statistisch signifikante Korrelationen zwischen der Expression verschiedener Moleküle in der Leber und der Gesamtüberlebenszeit der nachverfolgten Patienten gefunden werden. Wenn sich bestätigt, dass hierfür ein ursächlicher Zusammenhang besteht, könnte dies zukünftige Diagnostik- und Therapieregime maßgeblich beeinflussen. Bei keinem der untersuchten Moleküle zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der Molekülexpression im Primärtumor und der Gesamtüberlebenszeit. Dieses Ergebnis war überraschend, in Hinblick auf vorherige Studien, die bei unterschiedlichen Tumorentitäten einen Einfluss der Expression der untersuchten Moleküle auf das Tumorwachstum, Progress und Differenzierung und der hiermit verbundenen Prognose der Patienten nachweisen konnten. Für die jeweiligen Moleküle wird dies im Folgenden näher erläutert. Bei den untersuchten Lymphknoten, sowohl mit als auch ohne Metastasen, zeigte sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Molekülexpressionen und der Gesamtüberlebenszeit. In der Studienplanung waren die LK Färbungen von untergeordneter Bedeutung. Da die Ergebnisse der Färbungen zudem keine statistisch signifikanten Ergebnisse brachten, werden diese in vorliegender Arbeit nicht weiter diskutiert.

Patienten mit hoher Expression von CXCR 4 in der Leber überlebten im Vergleich zu Patienten mit mäßiger Expression statistisch signifikant länger ( $p$ -Wert  $< 0.001$ ). Dieses Ergebnis erscheint plausibel, da gesundes Lebergewebe CXCR 4 stärker als krankes Lebergewebe exprimiert.

Entsprechend zeigt sich, z.B. in der Studie von Shibuta et al. (2002), eine verminderte CXCL12/CXCR4 Expression im kranken Lebergewebe, in diesem Fall beim hepatzellulären Karzinom. Dem zufolge erscheint eine hohe CXCR4 Expression in der Leberprobe ein positiver prädiktiver Faktor bei Patienten mit distalem Adenokarzinom

der Speiseröhre zu sein. Die hohe Dichte an CXCR4 exprimierenden Zellen in den Leberproben von Patienten mit längerer Gesamtüberlebenszeit kann möglicherweise auch durch eine Infiltration der Leber mit Lymphozyten verursacht sein, welche bekanntlich CXCR 4 exprimieren. Das Ausmaß der CXCR 4 Expression im Primärtumor des AK zeigte keinen Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit.

Auf der Grundlage vorheriger Studien, z.B. von Kaifi et al. (2005), hätte man davon ausgehen können, dass eine hohe CXCR4 Expression im PT mit einer negativen Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens vergesellschaftet ist. Dies zeigte sich in unserer Studie nicht, es fand sich jedoch auch kein konträres Ergebnis.

Die hohe E-Cadherin Expression im Lebergewebe stellt einen positiven prädiktiven Faktor (p-Wert 0.033) für die Gesamtüberlebenszeit der Patienten dar.

Im Tierexperiment konnte von Nakagawa et al. (2014), beobachtet werden, dass ein E-Cadherin Funktionsverlust in der Leber die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen begünstigt. Vergleichbare Studien, die den Einfluss der E-Cadherin Expression im Lebergewebe beim AK des Ösophagus auf die Überlebenszeit der Patienten untersuchen, scheinen bisher nicht erfolgt zu sein.

In der Untersuchung konnte kein signifikanter Einfluss der E-Cadherin Expression im PT auf die Gesamtüberlebenszeit des Patientenkollektivs gefunden werden, obwohl aufgrund der allgemeinen Forschungslage davon auszugehen war, dass eine erhaltene/hohe E-Cadherin Expression im PT sich günstig auf die Gesamtüberlebenszeit auswirken würde.

Eine Vielzahl von Studien (z.B. Winter et al. 2008, Nakagawa et al. 2014, Kim et al. 2016) haben gezeigt, dass ein Verlust der E-Cadherin Expression bei verschiedenen Tumorentitäten mit der Genese, dem Progress und der Metastasierung von Tumoren einhergeht. Die epitheliale mesenchymale Transition (EMT) scheint hierbei eine herausragende Rolle zu spielen. Die EMT ist eine komplexe Veränderung der Zelle, bei der epitheliale Eigenschaften verloren gehen und die Epithelzelle mesenchymale Eigenschaften entwickelt. Hierzu gehört, dass die Epithelzelle ihre Zellkontakte auflöst und die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Cadherin herunter reguliert. EMT kann in drei Typen unterteilt werden, Typ I tritt in der Embryogenese auf, Typ II bei Wundheilung und Geweberegeneration, Typ III findet in neoplastischen Zellen

statt (Kalluri et al. 2009). Über oben genannte Mechanismen spielt EMT eine wichtige Rolle bei der Tumorinvasion und Metastasierung (Guarino 2007).

Bereits 1995 konnte in der Studie von Swami et al. ein zunehmender Verlust der E-Cadherin Expression im Laufe einer Barrett Transformation der Ösophagus Schleimhaut bis hin zum AK festgestellt werden. Eine große Metaanalyse (Xu et al. 2014) gibt Hinweise für eine schlechtere Prognose und einen geringeren Differenzierungsgrad bei Patienten mit E-Cadherin Verlust beim Ösophaguskarzinom, dies scheint jedoch besonders für das PE zu gelten. Die Studie von Li et al. von 2016 zeigte, dass metastasierte PE Ösophaguskarzinome im Vergleich zu nicht metastasierten Karzinomen eine erniedrigte E-Cadherin Expression aufweisen. Eine Studie von Kato et al. (2003) zeigt ebenfalls eine vermehrte Metastasierung bei Ösophaguskarzinomen mit reduzierter E-Cadherin Expression.

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Gesamtüberlebenszeit abhängig von dem Ausmaß der Midkin Expression in der Leberprobe, wobei die Patienten mit hoher Midkin Expression eine statistisch längere Überlebenszeit (p-Wert. 0,012) hatten. Die Studie von Tackels-Horne et al. (2001) zeigt, dass im gesunden Lebergewebe kein Midkin exprimiert wird, hingegen im hepatozellulären Karzinom und auch bei Lebermetastasen des Kolonkarzinoms eine verstärkte Genexpression vorliegt. Hiernach wäre zu erwarten, dass möglicherweise auch eine Lebermetastasierung des AK des Ösophagus zu einer höheren Midkin Expression führen könnte, bzw. dass die hohe Expression einer Metastasierung vorausgehen könnte. Das konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Es besteht jedoch keine direkte Vergleichbarkeit mit der Arbeit von Tackels-Horne et al., da in dieser zum einen Metastasen vom Kolonkarzinom untersucht wurden und zum anderen ein direkter Nachweis der Genexpression erfolgte, indem die RNA nachgewiesen wurde. In vorliegender Arbeit hingegen erfolgte der indirekte Nachweis des exprimierten Moleküls über eine immunhistochemische Färbung.

Für die Midkin Expression im PT konnte kein Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit der Patienten festgestellt werden. Für andere Tumorentitäten konnte in bereits erfolgten Studien, z.B. von Rawnaq et al. (2011) oder von Koide et al. (1998) ein Einfluss von hohen Midkin Serumspiegeln oder einer hohen Midkin Genexpression im Tumor auf die Tumorprogression und der damit verbundenen schlechteren Prognose festgestellt werden.

In der Studie von Jono et al. (2010) zeigte sich eine erhöhte Midkin Expression, sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene im PT beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus im Vergleich zu gesundem Ösophagus Gewebe. In der Studie von Ruan et al. (2007) konnte ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Midkin Expression im oralen Plattenepithelkarzinom und der Prognose der Patienten gestellt werden. Es zeigten sich bei hoher Midkin Expression eine höhere Tumorangio-genese und schlechtere Prognose der Patienten. In dieser Arbeit konnten wir für das AK des Ösophagus keinen negativen Effekt auf die Prognose der Patienten abhängig von der Midkin Expression finden. Die oben genannte Studie von Jono et al. zeigte insbesondere eine erhöhte Midkin Konzentration im Serum. Die Bestimmung von Midkin als Tumormarker im Serum scheint sinnvoller als eine regelhafte Midkin Bestimmung im Gewebe, da Serum leicht und ohne invasive Diagnostik zugänglich ist (Shimada et al. 2003).

So kann Midkin z.B. als Tumormarker beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus dienen, wie die Studie von Ren et al. zeigt (2006). Vorteilhaft ist, dass es sich bei der in der Forschung gefundenen Midkin Überexpression um sogenannte „truncated midkine“ handelt. Diese unterscheiden sich von dem teilweise auch im Gesunden exprimierten Midkin und haben daher eine höhere Spezifität (Aridome et al. 1998, Shimada et al. 2003). Das Ausmaß der Midkin Expression in bestimmten Tumoren, z.B. im PE des Ösophagus, scheint auch mit dem Differenzierungsgrad zusammen zu hängen (Ren et al. 2006).

Eine statistisch signifikante längere Gesamtüberlebenszeit abhängig von der Molekülexpression in der Leber, konnte bei Periostin ermittelt werden (p-Wert 0,021). Es zeigte sich eine Vergesellschaftung von starker Periostin Expression und guter Prognose. Die Studie von Bao et al. (2004) konnte unter anderem auch durch eine immunhistochemische Färbung beim Kolonkarzinom und den zugehörigen Metastasen in der Leber feststellen, dass sowohl der Primärtumor als auch die Metastasen vermehrte Periostin Expression aufwiesen. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich in dieser Arbeit nicht, hingegen zeigte sich sogar eine bessere Prognose bei hoher Periostin Expression in der Leber. Das Ergebnis ist unterwartet, da nach jetzigem Forschungsstand davon auszugehen ist, dass eine hohe Periostin Expression in Tumoren deren Wachstum durch Angiogenese und die Verhinderung der Apoptose begünstigt. Möglicherweise ist die erhöhte Periostin Expression in dieser Untersuchung auf andere, als unmittelbare tumorspezifische Prozesse zurückzuführen. Eine Periostin Expression findet auch in

sehr unterschiedlichen Maßen im gesunden Gewebe statt, aber besonders stark in Fibroblasten reichen Geweben. In der Leber zeigt sich normalerweise eine mäßige bis geringe Periostin Expression (Tilman et al. 2007). Nimmt man keinen Fehler bei der Färbung an, könnten die stärker gefärbten Lebergewebe möglicherweise mehr Fibrozyten, z.B. im Rahmen einer zirrhotischen Umwandlung, enthalten.

Für die Periostin Expression im PT zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied, ein Trend zur besseren Prognose bei hoher Periostin Expression ist zu vermuten ( $p=0,067$ ). Die Studie von Michaylira et al. (2010) zeigt beim PE des Ösophagus einen Zusammenhang zwischen invasivem Verhalten der Tumorzellen und der Periostin Expression. Diese Untersuchungsergebnisse sind jedoch nicht unmittelbar vergleichbar, da zum einen eine andere Tumorentität untersucht wurde, zum anderen eine andere Methode der Periostin Expressionsdarstellung gewählt wurde.

Wahrscheinlich ist, dass Periostin eine wichtige Rolle in entzündlichen Prozessen und in der Tumorentwicklung spielt und möglicherweise auch Einfluss darauf nimmt, ob eine chronische Entzündung invasiv transformiert (Liu et al. 2014). Somit ließe sich die Vermutung aufstellen, dass eine erhöhte Periostin Expression im Barrett Ösophagus/ Adenokarzinom für einen chronisch entzündlichen Prozess sprechen könnte. In unserer Studie konnte keine erhöhte Periostin Expression bei den PT der Patienten, die eine schlechte Überlebenswahrscheinlichkeit hatten, gefunden werden.

Für CD 45 zeigte sich eine hochsignifikant längere Gesamtüberlebenszeit ( $p$ -Wert 0,001 in der Einteilung mit 3 Farbintensitäten) bei den Patienten mit einer hohen Expression des Moleküls in der Leber. Das deutlich positive Ergebnis bezüglich der guten Prognose bei hoher CD 45 Expression im Lebergewebe erscheint von allen durchgeführten Färbungen und Ergebnissen das vielversprechendste zu sein. Nicht nur zeigte sich hier eine hohe statistische Signifikanz, auch deckte sich das Ergebnis mit anderen Studien, z.B. von Tu et al. (2014) und Ralph et al. (2010).

Eine vertiefende Auseinandersetzung mit den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen der CD 45 Färbung erfolgte im Rahmen der wissenschaftlichen Untersuchung und der Veröffentlichung des Artikels von Kemper et al. (2019). Es konnte in einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse eine hohe CD 45 Expression in der Leber als unabhän-



giger prognostischer Parameter für eine längere Gesamtüberlebenszeit bestätigt werden (p-Wert 0.048). Zudem zeigte sich, dass eine hohe Dichte an CD 45 exprimierenden Zellen in der Leberprobe mit einer niedrigeren UICC Klassifikation vergesellschaftet war, und dass bei Patienten mit hoher Dichte von CD45 positiven Zellen in der Leberprobe seltener Fernmetastasen auftraten. Eine starke Anfärbung der Leberproben für CD 45 ist vermutlich Ausdruck einer Infiltration des Organs mit Lymphozyten, welche in hohem Maße CD 45 exprimieren. Die Korrelation zwischen der Dichte von Tumor infiltrierenden T-Lymphozyten (im folgenden TILs) und dem Ansprechen auf Immuntherapeutika ist von wachsendem Interesse, um Patienten, die von einer Immuntherapie profitieren, zu identifizieren und den richtigen Zeitpunkt für die Immuntherapie herauszufinden. Die Messung von CD45 positiven Zellen im Leberparenchym ist ein möglicher prognostischer Biomarker und kann als ein Kriterium für die Patientenauswahl, die auf eine Immuntherapie ansprechen, hilfreich sein. Studien mit einer gerichteten immunmodulatorischen Therapie zeigen erfolgversprechende Ansätze. So z.B. die Studie von Ralph et al. (2010), die eine Antikörpertherapie mit Tremelimumab, einem humanen monoklonalen Antikörper gegen CTLA-4, bei Patienten mit fortgeschrittenem Adenokarzinom des Ösophagus, des AEG und des Magens durchgeführt haben. In der Studie zeigte sich zumindest bei einem Patienten ein erstaunlich positives Ansprechen auf die Therapie. Unter der Therapie zeigte sich ein vorübergehender Anstieg der CD4+ Lymphozyten im Serum. Folglich könnte eine immunmodulierende Therapie mit Antikörpern, welche zur Erhöhung der CD 45 positiven Lymphozyten im Serum und konsekutiv im Tumor führt, eine therapeutische Option sein. Die nachgewiesene kürzere Gesamtüberlebenszeit der Patienten mit niedriger CD 45 Expression korreliert mit dem zeitgleichen Vorliegen von Lebermetastasen.

Für den PT (p-Wert 0,953) konnte kein Einfluss der CD45 Expression auf die Gesamtüberlebenszeit nachgewiesen werden. Mehrere andere Studien (Wang et al. 2013, Rauser et al. 2010 und Enomoto et al. 2012) konnten jedoch zeigen, dass eine hohe Konzentration an CD 45 positiven TILs im Primärtumor mit einer besseren Prognose der Patienten einhergeht. Für das AK des Ösophagus konnten dies Rauser et al. nachweisen. Ein Fallbeispiel (Tu et al. 2014) zeigte bei einem Patienten mit metastasiertem AK des Ösophagus, neben anderen veränderten Molekülen und zirkulierenden Tumorzellen, eine erniedrigte CD 45 Expression in Serum und Aszites.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, kongruent zu bisherigen Forschungen (z.B. Wang et al. 2013, Kaifi et al 2005, Xu et al. 2014, Li et al 2016,)), dass eine hohe Expression von CD 45, CX CR4 und E-Cadherin im Leberzellgewebe mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit einhergeht. Für die Gesamtüberlebenszeit statistisch besonders relevante Unterschiede zu der zu erwartenden Proteinexpression (im Vergleich zu Referenzwerten von gesunden Lebergewebe, siehe Tabelle 3, S.29) fanden sich für CD 45. Insbesondere Lebergewebe ohne Metastasen zeigte eine hohe Expression von CD 45. Der Nachweis der hohen Expression von CD 45 in den Leberproben ist möglicherweise durch Infiltration mit Leukozyten zu erklären, welche eine hohe Expression von CD 45 aufweisen.

Die Ergebnisse bezüglich der prognostischen Relevanz von der Midkin und Periostin Expression im Primärtumor und der Leber weichen von bisherigen Forschungsergebnissen ab. In dieser Arbeit zeigt sich bei hoher Midkin und Periostin Expression in der Leber eine längere Überlebenszeit der Patienten. Im Vorfeld der Experimente waren wir jedoch von dem gegenteiligen Ergebnis (siehe z.B. Tackels-Horne et al. 2001, Michaylira et al. 2010, Ruan, M. et al. 2007) einer schlechteren Prognose bei hoher Expression dieser Moleküle im Primärtumor und in der Leber ausgegangen. In Anbetracht dieser Differenzen sollte die Methodik der Molekül Darstellung genauer begutachtet werden.

Betrachtet man die TMA Schnitte, zeigt sich auch im Falle der Färbung von Periostin und Midkin, dass sich Lebergewebe ohne Metastasen im Mittel deutlich stärker färbt als die Proben aus Lebermetastasen. So zeigt sich zwar eine Korrelation zwischen einer starken Färbung (hohe Molekülexpression) von Periostin und Midkin und einer längeren Gesamtüberlebenszeit der Patienten, ursächlich für die bessere Prognose scheint jedoch das Fehlen von Lebermetastasen zu sein. Auffällig war, dass sich das Lebergewebe intensiver färbte als das Gewebe aus Lymphknoten. In vielen Fällen zeigte sich zudem eine stärkere Färbung der Leber als des Primärtumors.

Auf das Ausmaß der Färbung des jeweiligen Gewebes haben, neben der Stärke der Proteinexpression, auch andere Faktoren Einfluss, z.B. unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers an das Gewebe oder auch die Gewebedichte. Es ist zu erwarten, dass sich ein Gewebe mit hoher Zelldichte bei gleicher Proteinexpression pro Zelle

stärker als ein aufgelockertes Gewebe mit viel extrazellulärer Flüssigkeit färbt. Lebergewebe weist ein hohes Level an endogenem Biotin auf. Aus diesem Grund erfolgte im Vorfeld der immunhistochemischen Färbung eine Behandlung mit Avidin/Biotin Blocking Reagent, um falsch intensive Färbung zu vermeiden. Dennoch kann die Verwendung von Nachweissystemen auf Biotinbasis durch eine inkomplette Blockierung des endogenen Biotins bei Färbung von Geweben mit hohem Biotin Anteil fehleranfällig sein.

Die immunhistochemischen Färbungen der Leberproben von den untersuchten in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten zeigten teilweise von Tabelle 45 abweichende Ergebnisse.

Relevante Unterschiede zu der zu erwartenden Proteinexpression fanden sich für CD 45 und CXCR4. Insbesondere Lebergewebe ohne Metastasen zeigte eine hohe Expression von beiden Molekülen. Sowohl CXCR4 als auch CD 45 werden auf Lymphozyten exprimiert, so dass die hohe Expression der Moleküle in den Leberproben durch eine Infiltration von Lymphozyten zu erklären sein könnte.

Des Weiteren war in den untersuchten Leberproben Midkin nachweisbar; Dieses sollte im gesunden Lebergewebe nicht exprimiert werden. Im Rahmen einer Verletzung, Entzündung oder Tumorbildung kann Midkin jedoch exprimiert werden (Muramatsu 2010).

In der Herstellung der TMA Schnitte, der immunhistochemischen Färbungen sowie der Auswertung sind folgende mögliche Fehlerquellen zu bedenken:

- Durch die gewählten Einschlusskriterien stand nur eine beschränkte Anzahl an zu untersuchenden Geweben zur Verfügung. Aufgrund von Auslagerung alter Gewebeproben oder mangelnder Qualität reduzierten sich die letztlich in den TMA verwendeten Proben, so dass in einigen Fällen keine statistische Signifikanz bei möglicherweise doch relevanten Unterschieden erreicht werden konnte (z.B. bei der Periostin Expression im PT). Andererseits können bei geringer Fallzahl bereits wenige Proben zu einer möglicherweise falsch positiven Signifikanz geführt haben.
- Fehler in der technischen Durchführung beim Erstellen des TMA Blockes sowie der immunhistochemischen Färbung sind nicht auszuschließen. So können bei der Gewinnung von TMA Stanzen aus kleinen Gewebebiopsien, insbesondere aus der

Leber und dem LK, nicht vom Tumorgewebe betroffene Areale miterfasst worden sein, z.B. nekrotische oder Bindegewebsanteile innerhalb der markierten Tumoreareale. Zudem ist die Tumorerogenität mit zu berücksichtigen. Die immunhistochemische Färbung ist ein komplexer Vorgang mit vielen einzelnen Schritten, welche zu Fehler führen könnten. Durch die Verwendung von TMA Schnitten kann jedoch sichergestellt werden, dass die verglichenen Gewebe alle unter gleichen Rahmenbedingungen angefärbt wurden.

- Durch die Einteilung der unterschiedlichen Färbungsgrade in vier Intensitäten, welche visuell beurteilt wurden, werden möglicherweise geringe Unterschiede in der Molekülexpression nicht hinreichend differenziert.
- Unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers können auftreten und zu einer stärkeren Färbung der Probe führen.

Um zu beurteilen, ob es sich bei den gefundenen statistisch signifikanten Ergebnissen um Korrelationen oder aber kausale Zusammenhänge handelt, führten wir zudem Subgruppen Analysen durch. Das Patientenkollektiv wurde unterteilt in eine Gruppe mit Lebermetastasen und eine Gruppe ohne Metastasen in der Leber. Es erfolgte in diesen Gruppen eine gesonderte statistische Auswertung zur Beurteilung des Einflusses der jeweiligen Molekülexpression im PT und in der Leberprobe auf die Gesamtüberlebenszeit. Innerhalb der jeweiligen Subgruppen zeigte sich kein statistisch signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Molekülexpressionen auf die Gesamtüberlebenszeit. In der Gruppe der Patienten mit Lebermetastasen waren zumeist die Fallzahlen zu gering, als dass ein statistisch signifikantes Ergebnis erreicht werden konnte. Aber auch in der Gruppe der Patienten ohne Lebermetastasen konnte kein statistisch signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Molekülexpression im PT und der Leberprobe auf die Gesamtüberlebenszeit gefunden werden.

Die Lebermetastasen zeigten in der Regel deutlich geringere Expressionen der untersuchten Moleküle, so dass postuliert werden kann, dass im Metastasengewebe eine verringerte Expression jener Moleküle stattfindet. Ein Einfluss der Molekülexpressionen von CXCR4, E-Cadherin, Midkin, Periostin und CD 45, ohne zeitgleiches Vorliegen von Lebermetastasen, auf die Überlebenszeit konnte jedoch nicht bewiesen werden. Demnach scheint die regelhafte Bestimmung der untersuchten Moleküle in gewonnen Biopsien noch keine sinnvolle zusätzliche Option beim Staging des Adeno-

karzinom des Ösophagus zu sein. Es stellt sich die Frage, wie die gefundenen Ergebnisse genutzt werden können, um entweder die Diagnostik oder aber die Therapie des AK des Ösophagus zu verbessern.

Wünschenswert wären weitere Studien, in denen das Ausmaß der Molekülexpression von CD 45, CXCR4 und E-Cadherin im Lebergewebe als unabhängige prognostische Faktoren beim AK des Ösophagus bestätigt werden. Hierbei sollten ergänzende Methoden zur Darstellung der Molekülexpression in Erwägung gezogen werden, z.B. als RNA Nachweis mittels polymerase chain reaction, (PCR).

## 5 Zusammenfassung

Das Adenokarzinom des Ösophagus ist einer der am schnellsten an Häufigkeit zunehmenden Tumoren der westlichen Welt. Ösophaguskarzinome gehören bei Männern zu den zehn häufigsten Todesursachen unter den malignen Erkrankungen. In Deutschland bestand 2012 eine altersstandardisierte Mortalitätsrate von 4,8/100000 (Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft 2016). Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit beim AK des Ösophagus ist mit unter 20 Prozent weiterhin sehr schlecht (Aaltonen und Hamilton 2000, Siewert und Stein 2012). Es besteht aus diesen Gründen Handlungsbedarf, um die Diagnostik und die Therapie dieser Erkrankung zu verbessern. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass beim AK des Ösophagus eine veränderte Expression von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen und Rezeptoren, im Vergleich zum gesunden Gewebe, auftritt. Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welchen Einfluss die Expression der Moleküle CXCR 4, E-Cadherin, Midkin, Periostin und CD 45 in dem Primärtumor, der Leber und den Lymphknoten auf die Gesamtüberlebenszeit eines Patienten hat. Der Nachweis der Expression der Moleküle erfolgte durch immunhistochemische Färbungen von TMA Schnitten der zu untersuchenden Gewebe. Das Ausmaß der Molekülexpression wurde anhand einer Farbskala dargestellt. Es wurde die Gesamtüberlebenszeit aus Follow-up-Daten, in Abhängigkeit von der jeweiligen Molekülexpression in den untersuchten Geweben, verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Kaplan-Meier-Methode, die Überlebenskurven wurden berechnet und die Verläufe durch den Log-Rank Test verglichen. Zwischen den Molekülexpressionen in den PT und den LK und der Gesamtüberlebenszeit der nachverfolgten Patienten konnte kein statistischer Zusammenhang gefunden werden. Vielversprechende Ergebnisse zeigten sich für die untersuchten Leberproben. Statistisch signifikant längere Gesamtüberlebenszeiten hatten jene Patienten mit hoher CXCR4-, CD 45- und E-Cadherin-Expression in der Leber und entgegen der Erwartung auch jene Patienten mit hoher Periostin- und Midkin-Expression im Lebergewebe. Es bedarf weiterer Forschung, um den Effekt der untersuchten Molekülexpressionen in der Leber auf den Krankheitsverlauf beim AK des Ösophagus besser zu verstehen. Gelingt der Nachweis eines kausalen Zusammenhanges zwischen den gefundenen veränderten Molekülexpressionen und der Gesamtüberlebenszeit, ermöglicht dies die Entwicklung neuer Diagnostik- und Therapieoptionen.

## Summary

The esophageal adenocarcinoma is one of the most increasing tumors in the western hemisphere and one of the ten most common causes of deaths among males due to cancer. In 2012, in Germany, there was an age-standardized mortality rate of 4,8/100000 (Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft 2016). The 5-year survival rate of patients with esophageal adenocarcinoma remains low with less than 20% (Aaltonen and Hamilton 2000, Siewert and Stein 2012). Due to these reasons there is a need for action to improve the diagnosis and therapy of this disease. In previous studies it was shown that the expression of different cell adhesion molecules and receptors in the esophageal adenocarcinoma differs from their expression in healthy tissue. The task of this study was to investigate the influence of the expression of the molecules CXCR 4, E-cadherin, midkine, periostin and CD 45 in the primary tumor, the liver and the lymph nodes on the overall survival of a patient. The expression of the molecules was demonstrated by immunohistochemical staining of TMA sections of the examined tissue. The extent of the molecular expression was shown on a color scale. The overall survival time from follow-up data, depending on the respective molecular expression in the examined tissues, was compared. The statistical evaluation was carried out using the Kaplan-Meier method. The survival curves were calculated, and their courses were compared by implementation of the log-rank test. No statistical relation could be found between the molecular expressions in the primary tumor and the lymph nodes and the overall survival of the followed-up patients. Promising results were shown for the examined liver samples. Patients with high CXCR4, CD 45 and E-cadherin expression in the liver tissue had statistically significant longer overall survival times than patients with low expression of these molecules in the liver tissue. Contrary to the expectation, similar results were found for periostin and midkine expression in the liver tissue. Previous studies suggested the opposite with low overall survival rates in patients with high periostin and midkine expression.

Further research is required for a better understanding of the effect of the examined molecular expressions in the liver on the course of esophageal adenocarcinoma. If it was possible to prove a causal relationship between the changes in molecular expression found and the overall survival time, it would facilitate the development of new diagnostic and therapeutic options.

## **6 Abkürzungsverzeichnis**

AEG = Karzinome des gastro-ösophagealen Übergangs

AK = Adenokarzinom

EMR = Endoskopische Mucosaresektion

ER = Endoskopische Resektion

EUS = Endoskopisches Ultraschall

HGIEN = Hochgradige intraepitheliale Neoplasien

LK = Lymphknoten

LP = Leberprobe

LSB = Long-Segment-Barrett

MK = Midkin

PDT = Photodynamische Therapie

PK = Plattenepithelkarzinom

PT = Primärtumor

SSB = Short-Segment-Barrett

TMA = Tissue Microarray

UKE = Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf



## 7 Literaturverzeichnis

Aaltonen LA, Hamilton SR (2000) World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. International Agency for Research on Cancer Press, Lyon, France. 20-26.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Walter P (2005). Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. 3. Aufl., John Wiley & Sons, Hoboken, 653-661.

Alderson D, Cunningham D, Nankivell M, Blazeby JM, Griffin SM, Crellin A, Grabsch HI, Langer R, Pritchard S, Okines A, Krysztolik R, Coxon F, Thompson J, Falk S, Robb C, Stenning S, Langley RE (2017) Neoadjuvant cisplatin and fluorouracil versus epirubicin, cisplatin, and capecitabine followed by resection in patients with oesophageal adenocarcinoma (UK MRC OE05): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 18(9):1249-1260.

al-Sarraf M, Martz K, Herskovic A, Leichman L, Brindle JS, Vaitkevicius VK, Cooper J, Byhardt R, Davis L, Emami B (1997) Progress report of combined chemoradiotherapy versus radiotherapy alone in patients with esophageal cancer: an intergroup study. *J Clin Oncol.* 1997 Jan;15(1):277-84.

Aridome K, Takao S, Kaname T, Kadomatsu K, Natsugoe S, Kijima F, Aikou T and Muramatsu T (1998) Truncated midkine as a marker of diagnosis and detection of nodal metastases in gastrointestinal carcinomas. *Br J Cancer.* 78(4):472-477

Bao S, Ouyang G, Bai X, Huang Z, Ma C, Liu M, Shao R, Anderson RM, Rich JN, Wang XF (2004) Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell.* 5(4):329-339.

Behm FG, Raimondi SC, Schell MJ, Look AT, Rivera GK, Pui CH (1992) Lack of CD45 antigen on blast cells in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with chromosomal hyperdiploidy and other favorable prognostic features. *Blood.* 79(4):1011-1016.

Behrens A, Pech O, Graupe F, May A, Lorenz D, Ell C (2011) Barrett's adenocarcinoma of the esophagus: better outcomes through new methods of diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* ;108(18):313-319

Böcker W, Denk H, Heitz PU (2004) Pathologie. 3.Aufl., Elsevier / Urban & Fischer, München, 44.

Bollschweiler E und Holscher A H (2000) Deutliche Zunahme des Adenokarzinoms im Osophagus. Dtsch Arztebl A 97.27 (2000): 1896-1901.

Borowitz M, Guenther K, Shults K, Stelzer G (1993). Immunophenotyping of Acute Leukemia by Flow Cytometric Analysis: Use of CD45 and Right-Angle Light Scatter to Gate on Leukemic Blasts in Three-Color Analysis. Am J Clin Pathol. 100. 534-540.

Bracke M, Charlier C, Bruyneel E, Labit C, Mareel M, Castronovo V (1994) Tamoxifen restores the E-cadherin function in human breast cancer MCF-7/6 cells and suppresses their invasive phenotype. Cancer Res.54(17):4607–4609.

Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA (2002) The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. Lung Cancer. 36(2):115-124.

Bronchud MH, Foote M., Peters WP, Robinson MO (2000) Principles of Molecular Oncology Humana Press, Totowa, New Jersey. 297-303.

Brown LM, Devesa SS, Chow WH (2008) Incidence of adenocarcinoma of the esophagus among white Americans by sex, stage, and age. J Natl Cancer Inst. 100: 1184–1187.

Buchmann, I (2008) Myeloablative Radioimmuntherapien zur Konditionierung bei Patienten mit AML, MDS und multiplem Myelom vor Stammzelltransplantation. Der Nuklearmediziner. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. 151-163.

Buda A, Pignatelli M (2011) E-cadherin and the cytoskeletal network in colorectal cancer development and metastasis. Cell Commun Adhes. 18(6): 133-143.

Cancer Principles and Practice of Oncology, 7th edition. Edited by Vincent T. DeVita, Jr, Samuel Hellman, and Steven A. Rosenberg Philadelphia, Pa, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, Part 3, section 4, p.113-126)

Chak A, Falk G, Grady WM, Kinnard M, Elston R, Mittal S, King JF, Willis JE, Kondru A, Brock W, Barnholtz-Sloan J (2009) Assessment of familiarity, obesity, and

other risk factors for early age of cancer diagnosis in adenocarcinomas of the esophagus and gastroesophageal junction. *Am J Gastroenterol.* 104(8):1913-1921.

Chow WH, Blaser MJ, Blot WJ, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Perez-Perez GI, Schoenberg JB, Stanford JL, Rotterdam H, West AB, Fraumeni JF Jr. (1998) An inverse relation between *cagA*<sup>+</sup> strains of *Helicobacter pylori* infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res.* 15;58(4):588-590.

Conroy T, Galais MP, Raoul JL, Bouché O, Gourgou-Bourgade S, Douillard JY, Etienne PL, Boige V, Martel-Lafay I, Michel P, Llacer-Moscardo C, François E, Créhange G, Abdelghani MB, Juzyna B, Bedenne L, Adenis A; Fédération Franco-phonie de Cancérologie Digestive and UNICANCER-GI Group (2014) Definitive chemoradiotherapy with FOLFOX versus fluorouracil and cisplatin in patients with oesophageal cancer (PRODIGE5/ACCORD17): final results of a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet Oncol.* 15(3):305-14.

Corley DA, Kubo A (2006) Body mass index and gastroesophageal reflux disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 101(11):2619-2628.

Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft. [Online im Internet.] URL: <http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/organ.html> [Stand: 12.10.2016, 18:00]

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (2004) *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 7th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 113-126.

Dietel M, Suttrop N, Zeitz M (2012) *Harrisons Innere Medizin*, Deutsche Ausgabe, 18. Aufl., ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, 818-820.

El-Serag HB, Lagergren J (2009) Alcohol drinking and the risk of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology.* 136(4):1155-1157.

Enomoto K, Sho M, Wakatsuki K, Takayama T, Matsumoto S, Nakamura S, Akahori T, Tanaka T, Migita K, Ito M and Nakajima Y (2012) Prognostic importance of tumour-infiltrating memory T cells in oesophageal squamous cell carcinoma. *Clin Exp Immunol.* 168:186–191.

Enzinger PC, Mayer RJ. (2003). Esophageal cancer. *N Engl J Med.* 349(23), 2241-2252.

Guarino M, Rubino B, Ballabio G (2007) The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology, *Pathology*, 39:3, 305-318.

Henkel K (2016) Das Schneiden in der Mikroskopie, Vierter Teil, Das Schneiden mit dem Mikrotom von Klaus Henkel. Mikrobiologische Vereinigung München e. V. [Online im Internet.] URL: <http://www.klaus-henkel.de/cut-mikrotom.html> [Stand: 10.08.2016, 14:00]

Herskovic A, Martz K, al-Sarraf M, Leichman L, Brindle J, Vaitkevicius V, Cooper J, Byhardt R, Davis L, Emami B (1992) Combined chemotherapy and radiotherapy compared with radiotherapy alone in patients with cancer of the esophagus. *N Engl J Med.* 326(24):1593-1598.

Hölscher AH, Fetzner UK, Bollschweiler E, Mönig SP (2010) Allgemein-und Viszeralchirurgie up2date 4.01, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York: 35-53.

Hong L, Wei X, Chen J, Shi Y. (2013). Overexpression of periostin predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 6, 1595-1603.

Jia HL, Ye QH, Qin LX, Budhu A, Forgues M, Chen Y, Liu YK, Sun HC, Wang L, Lu HZ, Shen F, Tang ZY, Xin WW (2007). Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 13(4):1133-1139.

Jones, DR. (2014) Measuring midkine: the utility of midkine as a biomarker in cancer and other diseases. *Br J Pharmacol.* 171(12): 2925-2939.

Jono H, Ando Y (2010) Midkine: a novel prognostic biomarker for cancer. *Cancers (Basel).* 2(2):624-641.

Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, Obonyo D, Wachowiak R, Busch P, Heinecke A, Pantel K, Izbicki JR (2005) Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 97(24):1840-1847

Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119(6):1420–1428.

Kaname T, Kadomatsu K, Aridome K, Yamashita SI, Sakamoto K, Ogawa M, Muramatsu T, Yamamura KI (1996). The expression of truncated MK in human tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* 219(1), 256-260.

Kato H, Miyazaki T, Nakajima M, Sohda M, Fukai Y, Masuda N, Fukuchi M, Manda R, Tsukada K, Kuwano H (2003). Prediction of hematogenous recurrence in patients with esophageal carcinoma. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg.* 51(11), 599-608.

Kemper M, Strohm T, Grupp K, Ghadban T, Bogoevski D, Bachmann K, Bockhorn M, Sauter G, Izbicki J, Reeh M. (2019). Increase of CD45-positive Immune Cells in Liver Parenchyma Indicates a More Favorable Prognosis for Patients With Barrett's Cancer. *Anticancer Res.* 39(3). 1191-1196.

Kim SA, Inamura K, Yamauchi M, Nishihara R, Mima K, Sukawa Y, Li T, Yasunari M, Morikawa T, Fitzgerald KC, Fuchs CS, Wu K, Chan AT, Zhang X, Ogino S, Qian ZR (2016) Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis. *Br J Cancer.* 114(2):199-206.

Koide N, Hada H, Shinji T, Ujike K, Hirasaki S, Yumoto Y, Hanafusa T, Kadomatsu K, Muramatsu H, Muramatsu T, Tsuji T (1999). Expression of the midkine gene in human hepatocellular carcinomas. *Hepatogastroenterology.* 46(30):3189-3196.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 4(7):844-847.

Koop H, Fuchs KH, Labenz J, Lynen Jansen P, Messmann H, Miehle S, Schepp W, Wenzl TG; Mitarbeiter der Leitliniengruppe (2014) S2k-Leitlinie: Gastroösophageale Refluxkrankheit unter Federführung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS):AWMF Register Nr. 021-013. *Z Gastroenterol.* 52(11):1299-1346.

Kudo Y, Ogawa I, Kitajima S, Kitagawa M, Kawai H, Gaffney P, Mutsumi M, Takata T (2006). Periostin Promotes Invasion and Anchorage-Independent Growth in the Metastatic Process of Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* 66(14):6928-6935.

Lang G (2013) *Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik.* 2.Aufl., Springer Verlag, Wien, New York, 282-283.

Li S, Qin X, Chai S, Qu C, Wang X, Zhang H (2016). Modulation of E-cadherin expression promotes migration ability of esophageal cancer cells. *Sci Rep.* 6:21713.

- Li Z, Zhang X, Yang Y, Yang S, Dong Z, Du L, Wang L, Wang C (2015) Periostin expression and its prognostic value for colorectal cancer. *Int J Mol Sci.*;16(6):12108-12118.
- Liu AY, Zheng H, Ouyang G (2014). Periostin, a multifunctional matricellular protein in inflammatory and tumor microenvironments. *Matrix Biol.* 37:150-156.
- Mackay CR. (1999) Dual personality of memory T cells. *Nature.* 401(6754):659-660.
- McTiernan A. (2006) *Cancer Prevention and Management Through Exercise and Weight Control.* CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, 269-286.
- Michaylira CZ, Wong GS, Miller CG, Gutierrez CM, Nakagawa H, Hammond R, Klein-Szanto AJ, Lee JS, Kim SB, Herlyn M, Diehl JA, Gimotty P, Rustgi AK (2010). Periostin, a cell adhesion molecule, facilitates invasion in the tumor microenvironment and annotates a novel tumor-invasive signature in esophageal cancer. *Cancer Res.* 70(13), 5281-5292.
- Mirkin BL, Clark S, Zheng X, Chu F, White BD, Greene M, Rebbaa A (2005). Identification of midkine as a mediator for intercellular transfer of drug resistance. *Oncogene.* 24(31):4965-4974.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 410(6824), 50-56.
- Muramatsu T (2010). Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86(4):410-425.
- Muramatsu T (2011) Midkine: A promising molecule for drug development to treat diseases of the central nervous system. *Curr. Pharm.* 17(5):410-423.
- Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, Font-Burgada J, Sakamoto K, Hayakawa Y, Taniguchi K, Umemura A, Kinoshita H, Sakitani K, Nishikawa Y, Hirano K, Ikenoue T, Ijichi H, Dhar D, Shibata W, Akanuma M, Koike K, Karin M, Maeda S (2014) Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(3):1090-1095.

Nimptsch K, Pischon T (2015) Body fatness, related biomarkers and cancer risk: an epidemiological perspective. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 22(2):39-51.

Pera M, Cameron AJ, Trastek VF, Carpenter HA, Zinsmeister AR (1993) Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology.*104(2):510-513.

Pinna LA, Cohen PTW (2005). *Inhibitors of protein kinases and protein phosphates.* Vol. 167. Springer Berlin, Heidelberg, 274.

Porschen R, Buck A, Fischbach W, Gockel I, Görling U, Grenacher L, Hollerbach S, Hölscher A, Körber J, Messmann H, Meyer HJ, Miehke S, Möhler M, Nöthlings U, Pech U, Schmidberger H, Schmidt M, Stahl M, Stuschke M, Thuss-Patience P, Trojan J, Vanhoefer U, Weimann A, Wenz F, Wullstein C (2015) S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus (Langversion 1.0 - September 2015, AWMF-Registernummer: 021/023OL). *Z Gastroenterol.* 2015 53(11):1288-1347.

R&Dsystems. [Online im Internet.] URL: <https://www.rndsystems.com/products/cell-tissue-staining-kits> [Stand 10.08.2016, 18:00]

Ralph C, Elkord E, Burt DJ, O'Dwyer JF, Austin EB, Stern PL, Hawkins RE, Thistlethwaite FC (2010) Modulation of lymphocyte regulation for cancer therapy: a phase II trial of tremelimumab in advanced gastric and esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 16(5):1662-1672.

Rauser S, Langer R, Tschernitz S, Gais P, Jütting U, Feith M, Höfler A, Walch A (2010) High number of CD45RO+ tumor infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in non-metastasized (stage I-IIA) esophageal adenocarcinoma. *BMC cancer.* 10:608.

Rawnaq T, Kunkel M, Simon R, Zander H, Brandl S, Sauter G, Izbicki JR, Kaifi, JT (2010) Serum midkine correlates with tumor progression and imatinib in gastrointestinal stromal tumors. *Ann Surg Oncol.*18(2):559-565.

Ren YJ, Zhang QY (2006) Expression of midkine and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol.* 12(13):2006-2010.

- Riener MO (2011). Diagnose von Tumoren der Leber und Gallenwege: Neue Gewebe- und Serummarker. *Pathologe*. 32 Suppl 2:304-309.
- Ruan K, Bao S, Ouyang G (2009) The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci*. 66(14):2219-2230.
- Ruan M, Ji T, Wu Z, Zhou J, Zhang C (2007) Evaluation of expression of midkine in oral squamous cell carcinoma and its correlation with tumour angiogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 36(2):159-164.
- Schwab M (2001) *Encyclopedic Reference of Cancer*. 1 Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg.
- Shahabi S, Rasmi Y, Jazani NH, Hassan ZM (2008) Protective effects of *Helicobacter pylori* against gastroesophageal reflux disease may be due to a neuroimmunological anti-inflammatory mechanism. *Immunol Cell Biol*. 86(2):175-178.
- Shaheen N, Ransohoff DF (2002) Gastroesophageal reflux, barrett esophagus, and esophageal cancer: scientific review. *JAMA*. 287(15):1972-1981.
- Shibuta K, Mori M, Shimoda K, Inoue H, Mitra P, Barnard GF (2002) Regional expression of CXCL12/CXCR4 in liver and hepatocellular carcinoma and cell-cycle variation during in vitro differentiation. *Jpn J Cancer Res*. 93(7):789-797.
- Shimada H, Nabeya Y, Tagawa M, Okazumi S, Matsubara H, Kadomatsu K, Muramatsu T, Ikematsu S, Sakuma S, Ochiai T (2003) Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 94(7):628-632.
- Siewert JR, Stein HJ, *Chirurgie* (2012), 9 Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, 608-622.
- Siewert JR., Stein HJ, Lordick F (2006). Ösophaguskarzinom. In: Siewert JR., Rothmund M., Schumpelick V. (eds) *Praxis der Viszeralchirurgie*. Springer, Berlin, Heidelberg, 403-433.
- Siitonen SM, Kononen JT, Helin HJ, Rantala IS, Holli KA, Isola JJ (1996) Reduced E-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer. *American journal of clinical pathology*, 105(4), 394-402.



Sökeland G, Schumacher U (2019) The functional role of integrins during intra-and extravasation within the metastatic cascade. *Molecular Cancer*, 18(1), 12.

Swami S, Kumble S, Triadafilopoulos G (1995) E-cadherin expression in gastroesophageal reflux disease, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma: an immunohistochemical and immunoblot study. *Am J Gastroenterol*. 90(10):1808-1813.

Tackels-Horne D, Goodman MD, Williams AJ, Wilson DJ, Eskandari T, Vogt LM, Boland JF, Scherf U, Vockley JG (2001) Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma and metastatic liver tumors by oligonucleotide expression profiling. *Cancer*. 92(2):395-405.

Takei Y, Kadomatsu K, Matsuo S, Itoh H, Nakazawa K, Kubota S, Muramatsu T (2001) Antisense oligodeoxynucleotide targeted to Midkine, a heparin-binding growth factor, suppresses tumorigenicity of mouse rectal carcinoma cells. *Cancer Res*. 61(23):8486-8491.

Tew WP, Kelsen DP, Ilson DH (2005) Targeted therapies for esophageal cancer. *Oncologist*. 10(8):590-601.

Tilman G, Mattiussi M, Brasseur F, van Baren N, Decottignies A (2007). Human periostin gene expression in normal tissues, tumors and melanoma: evidences for periostin production by both stromal and melanoma cells. *Molecular cancer*, 6(1): 80.

Tu Q, Bittencourt Mde C, Cai H, Bastien C, Lemarie-Delaunay C, Bene MC, Faure GC (2014) Case Report: Detection and quantification of tumor cells in peripheral blood and ascitic fluid from a metastatic esophageal cancer patient using the Cell-Search (®) technology. *F1000Res*. 3:12.

van Hagen P, Hulshof MC, van Lanschot JJ, Steyerberg EW, van Berge Henegouwen MI, Wijnhoven BP, Richel DJ, Nieuwenhuijzen GA, Hospers GA, Bonenkamp JJ, Cuesta MA, Blaisse RJ, Busch OR, ten Kate FJ, Creemers GJ, Punt CJ, Plukker JT, Verheul HM, Spillenaar Bilgen EJ, van Dekken H, van der Slangen MJ, Rozema T, Biermann K, Beukema JC, Piet AH, van Rij CM, Reinders JG, Tilanus HW, van der Gaast A; CROSS Group (2012) Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *N Engl J Med*. 366(22):2074-2084.

Wagener C, Müller O (2009). *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3 Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 292-306.

Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P. (1987) A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *J Immunol Methods*. 103(1):121-129.

Wang W, Hodkinson P, McLaren F, Mackean MJ, Williams L, Howie SEM, Wallace WAH, Sethi T (2013) Histologic assessment of tumor-associated CD45(+) cell numbers is an independent predictor of prognosis in small cell lung cancer. *Chest*. 143(1):146-151.

Winter JM, Ting AH, Vilardell F, Gallmeier E, Baylin SB, Hruban RH, Kern SE, Iacobuzio-Donahue CA (2008) Absence of E-cadherin expression distinguishes noncohesive from cohesive pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*.14(2):412-418.

Wu AH, Wan P, Bernstein L (2001) A multiethnic population-based study of smoking, alcohol and body size and risk of adenocarcinomas of the stomach and esophagus (United States). *Cancer Causes Control*. 12(8):721-732.

Wu J, Chen QX, Teng LS, Krasna MJ (2014) Prognostic significance of positive circumferential resection margin in esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Thorac Surg*. 97(2):446-453.

Xu XL, Ling ZQ, Chen SZ, Li B, Ji WH, Mao WM (2014) The impact of E-cadherin expression on the prognosis of esophageal cancer: a meta-analysis. *Dis Esophagus*. 27(1):79-86.

## 8 **Abbildungsverzeichnis**

- 1) Übersetzt ins Deutsche aus: Muramatsu T (2002). Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *The Journal of Biochemistry*, 132(3), Fig. 5, S.364.
- 2) Ruan K, Bao S, Ouyang G (2009). The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci.* 66(14):2219-2230.
- 3) Mackay CR (1999). Dual personality of memory T cells. *Nature* 402, 3–4 (1999).
- 4) Giltane J, Rimm D (2004) Technology Insight: identification of biomarkers with tissue microarray technology. *Nat Rev Clin Oncol* 1, 104–111.
- 5) Eigener Entwurf
- 6) Herbst H, Hübner JH (2016) Pathologie-online [Online im Internet.] URL: <http://i0.wp.com/www.pathologie-online.de/wordpress/wp-content/uploads/2012/11/ih2.gif> [ Stand 01.07.2016]

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. In erster Linie danke ich Dr. med. Dean Bogoevski und Dr.med. Matthias Reeh für die vorzügliche Betreuung meiner Dissertation, sowie die Geduld mir nach längeren Phasen der Unterbrechung an dieser Arbeit, jederzeit wieder unterstützend zur Seite gestanden zu haben. Bei Herrn Dr. Marius Kemper bedanke ich mich für seine Vorschläge zur Verbesserung dieser Arbeit. Ich möchte mich bei den Kollegen und Kolleginnen der Pathologie des UKE unter Leitung von Prof. Dr. med. Guido Sauter bedanken, insbesondere bei Frau Christina Koop für die tatkräftige Unterstützung und Anleitung bei der Erstellung des TMA-Blocks. Ich danke auch recht herzlich den Mitarbeitern des Campus Forschung insbesondere Frau Petra Schroeder für die Hilfe im Labor. Dank gebührt auch Dr. med. Katharina Grupp für die Hilfe bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung. Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki danke ich für die Möglichkeit der Dissertation und wissenschaftlichen Arbeit an diesem spannenden Thema.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Ehefrau und meinen Eltern, die mich motiviert und ermutigt haben, diese Arbeit zu beenden.

## **10 Lebenslauf**


**„Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt“.**

## 11 Eidesstattliche Erklärung

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: 

.....