

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und
Kinderchirurgie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

**Bedeutung der Stammzellmarker LgR5 und DCAMKL-1 für die
Pathogenese des Adenokarzinoms im distalen Ösophagus**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Christoph Reiber
aus Augsburg

Würzburg, März 2015

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Burkhard H. A. von Rahden
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Ralf Bargou
Dekan: Univ.-Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2016
Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Adenokarzinom des distalen Ösophagus	1
1.1.1	Überblick	1
1.1.2	Definition	2
1.1.3	Klinik, Diagnostik, Therapie und Prognose	2
1.1.4	Risikofaktoren	4
1.2	Barrett-Ösophagus	5
1.2.1	Der Barrett-Ösophagus und seine Bedeutung in der Pathogenese des Adenokarzinoms im distalen Ösophagus	5
1.2.2	Zweifel an der Bedeutung als Präkanzerose	7
1.3	Tumorgenese des ösophagealen Adenokarzinoms	10
1.3.1	Zellulärer Ursprung der Tumorzellen	10
1.3.2	Modell der klonalen Selektion	10
1.3.3	Tumorinitiiierende Zellen – Stammzellhypothese	11
1.3.3.1	Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften	11
1.3.3.2	Metastasierung und Tumorrezidiv	14
1.3.3.3	Krebsstammzellen im Ösophagus	14
1.4	Marker	15
1.4.1	LgR5	15
1.4.2	DCAMKL-1	16
1.4.3	Cdx2 und Ki-67	17
1.5	Fragestellung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Patientendaten und Tumorgewebe	19
2.1.1	Auswahl und Einteilung der Resektate	19
2.1.2	Histopathologische Analyse	20
2.2	Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	21
2.2.1	Verwendete Antikörper	21
2.2.2	Verarbeitung und Färbung des Gewebes	22
2.2.3	Auswertung	23

2.3	Quantitative RT-PCR	24
2.4	Zellkulturen	26
2.5	Statistische Analyse	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Ergebnisse auf Proteinebene	28
3.1.1	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für LgR5.....	28
3.1.2	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für DCAMKL-1	34
3.2	Ergebnisse auf Genebene	34
3.2.1	Ergebnisse der RT-PCR für das LgR5-Gen auf mRNA-Ebene	34
3.2.2	Ergebnisse der Zellkultur für das LgR5-Gen	35
3.3	Zusammenhang von LgR5-Expression und Proliferation (Ki-67+)	36
3.4	Zusammenhang von LgR5-Expression und Überleben	37
4	Diskussion	40
5	Zusammenfassung	54
6	Literaturverzeichnis	56
7	Abbildungsverzeichnis	64
8	Tabellenverzeichnis	66
9	Abkürzungsverzeichnis	67

1 Einleitung

1.1 Adenokarzinom des distalen Ösophagus

1.1.1 Überblick

Hinsichtlich Histologie, Ätiologie und Lokalisation werden zwei Hauptentitäten von Ösophaguskarzinomen unterschieden, das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom (Siewert et al. 2001). Global betrachtet ist das Plattenepithelkarzinom mit einem Anteil von ca. 95 % wesentlich häufiger (Devesa et al. 1998). In vielen Ländern der westlichen Welt hat sich das Verhältnis in den letzten Jahrzehnten allerdings drastisch verändert: Während für das Plattenepithelkarzinom eine gleichbleibende (Steevens et al. 2010) oder sogar rückläufige (Holmes et al. 2007) Inzidenz beobachtet wird, ist für das ösophageale Adenokarzinom ein extremer Inzidenzanstieg von bis zu 600 % innerhalb der letzten 30 Jahre zu verzeichnen (Pohl et al. 2005). Damit hat das ösophageale Adenokarzinom den steilsten Inzidenzanstieg aller malignen Tumoren (Pohl et al. 2005). Dieser Trend findet sich in vielen Ländern wieder, darunter in den USA sowie in vielen europäischen Ländern einschließlich Deutschland (Devesa et al. 1998; Powell et al. 2002; Vizcaino et al. 2002; Pera et al. 2005; Pohl et al. 2005; Brown et al. 2008; Steevens et al. 2010; Tumorzentrum Regensburg 2013).

Die Ätiopathogenese des ösophagealen Adenokarzinoms ist noch unvollständig aufgeklärt. Ein neues Modell zur Krebsentstehung mit der Beteiligung sogenannter Krebsstammzellen, wie es für andere Tumoren formuliert wurde, erscheint auch für das ösophageale Adenokarzinom erfolgversprechend, ist jedoch noch kaum untersucht (Spechler 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind zwei mögliche Marker für diese Krebsstammzellen, LgR5 und DCAMKL-1, in Hinblick auf diese These betrachtet worden. Ein detailliertes Wissen über die Tumorgenese hilft dabei, in Zukunft effektivere

Therapiemöglichkeiten zu schaffen sowie Möglichkeiten zur Prävention aufzuzeigen.

1.1.2 Definition

Die Mehrzahl der Adenokarzinome entsteht im distalen Ösophagus (Campbell et al. 2000). Histologisch finden sich meist tubuläre oder papilläre Tumoren mit intestinalem Erscheinungsbild in unterschiedlichen Differenzierungsgraden. Angrenzend an das ösophageale Adenokarzinom finden sich oft charakteristische Schleimhautveränderungen, wobei das regelhaft vorhandene Plattenepithel durch eine spezialisierte intestinale Metaplasie, charakterisiert durch Becherzellen, die sogenannte Barrett-Mukosa, ersetzt ist (Campbell et al. 2000). In Bezug auf das Adenokarzinom des distalen Ösophagus wird daher auch vom Barrett-Karzinom gesprochen. Beide Begriffe werden synonym verwendet (Stein et al. 2005). Morphologisch ähnelt das Adenokarzinom des Ösophagus dem Kardiakarzinom des Magens (Campbell et al. 2000; Jeon et al. 2006). Aufgrund von Unterschieden bezüglich Epidemiologie, Tumormorphologie und Risikofaktoren sehen viele Autoren sie aber als unterschiedliche Tumorentitäten an. Auch aus klinischer Erfahrung lassen verschiedene Patiententypen unterschiedliche Tumortypen annehmen (Siewert et al. 2000; Corley et al. 2001; El-Serag et al. 2002; Engel et al. 2003; Nguyen et al. 2003).

1.1.3 Klinik, Diagnostik, Therapie und Prognose

Das Adenokarzinom des distalen Ösophagus wird meist erst in fortgeschrittenen Stadien klinisch apparent und diagnostiziert. Initial stehen oft die Symptome einer pathogenetisch zugrundeliegenden gastroösophagealen Refluxerkrankung im Vordergrund (Lagergren et al. 1999; Moehler et al. 2011).

Als Basis für die Therapieentscheidung dient heute primär die Tiefeninvasion des Tumors (uT-Kategorie). Das derzeit dafür genaueste bildgebende Verfahren mit der geringsten Fehlerquote bezüglich Under- und Overstaging ist die endoskopische Sonographie (endoscopic ultrasound, EUS) (Pech et al.

2006). Mit dieser Methode werden auch die lokalen Lymphknoten beurteilt. Mögliche Fernmetastasen in Thorax und Abdomen werden mittels Computertomographie (CT) beurteilt.

Mit der Ösophagusresektion wird ein kuratives Therapieziel angestrebt, sofern sich noch keine Fernmetastasen gebildet haben. Als Standardverfahren gilt heute die transthorakale En-bloc-Resektion mit radikaler Zwei-Feld-Lymphadenektomie und anschließendem Magenhochzug mit intrathorakaler Anastomose (Ivor-Lewis-Ösophagusresektion) (von Rahden et al. 2007). Ein alternatives Verfahren stellt die transhiatale Ösophagusresektion dar, deren Vorteil einer niedrigeren Morbidität und Mortalität wegen der fehlenden Möglichkeit einer radikalen Lymphknotendissektion möglicherweise ein schlechteres Langzeitüberleben gegenübersteht (Hulscher et al. 2002; Omloo et al. 2007).

Für die seltenen Fälle, in denen das Karzinom schon in frühen Stadien entdeckt wird (Frühkarzinom), wird diskutiert, ob eine Limitierung des Resektionsausmaßes gerechtfertigt ist oder gar lokaltherapeutische endoskopische Verfahren zur Anwendung kommen können bzw. onkologisch gerechtfertigt sind (Pech et al. 2011; von Rahden et al. 2013). Bei weit fortgeschrittenen Tumoren und nach Dissemination kann ein palliativer, nicht operativer Therapieansatz, z. B. die Einbringung eines intraluminalen Stents, das Leiden und die Symptome, insbesondere die Dysphagie, lindern. Eine neoadjuvante Behandlung ist bei fortgeschrittenen Tumoren mittlerweile Standard (Stein et al. 2005). Der Überlebensvorteil durch eine neoadjuvante Chemo- oder besonders Radiochemotherapie wurde in mehreren Metaanalysen deutlich belegt, letztere birgt jedoch eine erhöhte Gefahr bezüglich Mortalität und perioperativen Komplikationen (Kaklamanos et al. 2003; Fiorica et al. 2004; GebSKI et al. 2007; Sjoquist et al. 2011).

Die Letalität der Ösophagusresektion wurde in den letzten Jahrzehnten durch eine starke präoperative Patientenselektion von 20 % (Earlam et al. 1980) auf bis zu 2 % in spezialisierten Zentren (Siewert et al. 2000; Hulscher et al. 2002; von Rahden et al. 2007) gesenkt. Die perioperative Morbidität ist mit über 30 %

nach wie vor hoch (Mamidanna et al. 2012). Die Prognose für fortgeschrittene Stadien ist weiterhin schlecht. Bei Frühkarzinomen erzielen neue Techniken wie die endoskopische Resektion gute Ergebnisse bezüglich Morbidität und Prognose, wobei berücksichtigt werden muss, dass die Tumoren hierbei oft noch nicht die Mukosa überschritten haben (Vieth et al. 2004; Behrens et al. 2011).

1.1.4 Risikofaktoren

Als Hauptrisikofaktor für das ösophageale Adenokarzinom gilt die gastroösophageale Refluxkrankheit (gastroesophageal reflux disease, GERD) (Lundell 2010). Mit einer Prävalenz von 10–20 % handelt es sich dabei um eine Volkskrankheit (Dent et al. 2005). Der starke kausale Zusammenhang kann als gesichert gelten (Lagergren et al. 1999). Das Risiko einer Krebserkrankung steigt dabei mit Dauer, Stärke und Häufigkeit der Refluxsymptomatik, bei schweren Verlaufsformen liegt das Karzinomrisiko 30–60mal höher als ohne Refluxerkrankung (Lagergren et al. 1999).

Als weiterer Risikofaktor gilt die Adipositas (Kubo et al. 2006; Whiteman et al. 2008); der Grund ist möglicherweise ein verstärkter Reflux durch einen erhöhten intraabdominellen Druck (Locke et al. 1999). Bezüglich Alkohol und Tabakrauchen als mögliche weitere Risikofaktoren sind die Ergebnisse nicht eindeutig (Vaughan et al. 1995; Gammon et al. 1997; Pandeya et al. 2009; Cook et al. 2012).

Eine potentiell protektive Rolle wird Ballaststoffen, Früchten, Gemüse und Antioxidantien zugeschrieben (Lundell 2010). Interessanterweise scheint auch eine Besiedelung mit *Helicobacter pylori* das Erkrankungsrisiko zu senken (Islami et al. 2008), möglicherweise aufgrund eines verminderten Refluxes (Blaser 2008) oder durch eine verminderte Produktion des appetitsteigernden Hormons Ghrelin, was wiederum zu einer niedrigeren Adipositasprävalenz führen könnte (Islami et al. 2008). Passend zum Inzidenzanstieg des Adenokarzinoms im distalen Ösophagus ist der Rückgang an Patienten mit *H. pylori*-Besiedelung, vor allem in der westlichen Welt (Blaser 2006).

1.2 Barrett-Ösophagus

1.2.1 Der Barrett-Ösophagus und seine Bedeutung in der Pathogenese des Adenokarzinoms im distalen Ösophagus

Nach ihrem Erstbeschreiber Norman Barrett wird als Barrett-Ösophagus eine spezielle, mit der gastroösophagealen Refluxkrankheit assoziierte Veränderung der ösophagealen Schleimhaut bezeichnet, bei der das reguläre Plattenepithel im distalen Ösophagus durch Barrett-Mukosa ersetzt ist (Barrett 1957). Die Barrett-Mukosa ist histologisch definiert als spezialisierte intestinale Metaplasie, charakterisiert durch Becherzellen, ähnlich der Schleimhaut, wie sie üblicherweise im Magen und im Darm vorzufinden ist (von Rahden et al. 2007; Hvid-Jensen et al. 2011). Die Diagnose erfolgt durch histologische Untersuchung von nach einem streng definierten Protokoll endoskopisch gewonnenen Biopsien. Die Übergangszone vom Plattenepithel des Ösophagus zum rötlichem Zylinderepithel der Cardia und des Magens bildet eine endoskopisch sichtbare Linie, die so genannte Z-Linie (Spechler 2002). Normalerweise fällt diese Z-Linie mit dem gastroösophagealen Übergang zusammen. Beim Barrett-Ösophagus ist diese Linie oralwärts verschoben (Abbildung 1). Histopathologisch lassen sich im Bereich aboral der Z-Linie intestinale Zellen, unter anderem Becherzellen, nachweisen. Befindet sich die Z-Linie mehr als 3 cm vom ösophagogastralen Übergang entfernt, spricht man von einem langstreckigen Barrett-Ösophagus (long segment Barrett esophagus, LSBE), anderenfalls von einem kurzstreckigen Barrett-Ösophagus (short segment Barrett esophagus, SSBE) (Spechler 2002). Für Fälle, bei denen in einem makroskopisch unauffälligem Ösophagus histologisch eine Barrett-Schleimhaut nachgewiesen wird, wurde der Begriff ultra-kurzstreckiger Barrett-Ösophagus (ultrashort segment Barrett esophagus) geprägt (Spechler 1997; von Rahden et al. 2007; Matsuzaki et al. 2011).

Als Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer Barrett-Mukosa gilt die gastroösophageale Refluxkrankheit (Spechler 2011). Als weitere Risikofaktoren wurden neben einer hereditären Komponente (Chak et al. 2002) Adipositas

(Whiteman et al. 2008) und Rauchen (Smith et al. 2009) identifiziert. Protektiv wirken sich eine Infektion mit *H. pylori* (Corley et al. 2008), eine regelmäßige Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) (Anderson et al. 2006) und diätetische Faktoren (Kubo et al. 2009) aus. Damit wurden viele gemeinsame Risikofaktoren für das Barrett-Epithel und das ösophageale Adenokarzinom identifiziert. Tabelle 1 stellt die Risikofaktoren gegenüber. Die Gesamtprävalenz für den Barrett-Ösophagus wird auf ca. 1 % geschätzt (von Rahden et al. 2007). In den letzten Jahrzehnten wurde eine Inzidenzsteigerung beobachtet (van Soest et al. 2005).

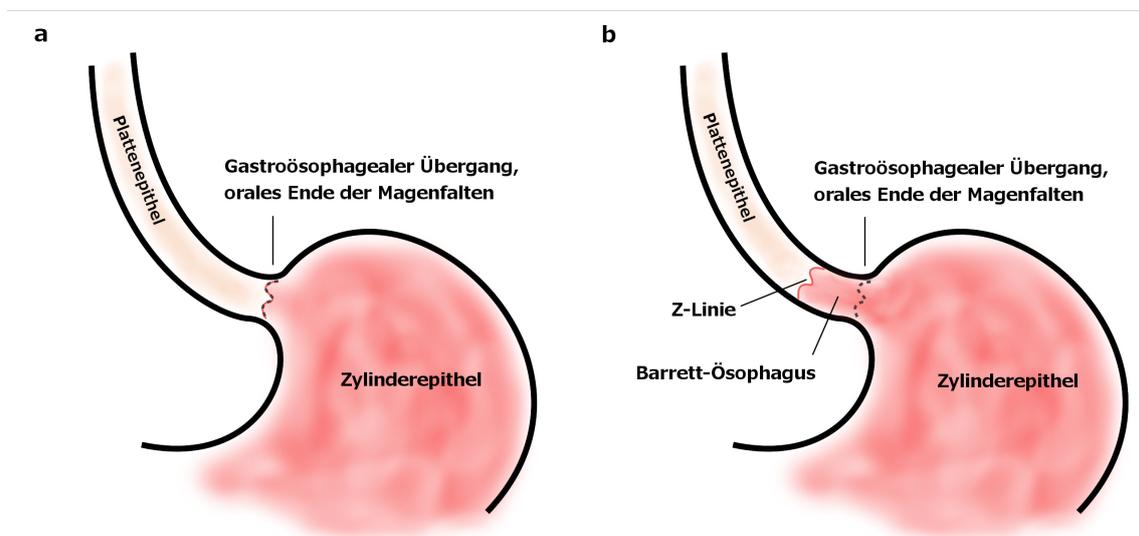


Abbildung 1: Gastroösophagealer Übergang. (a) Physiologische Situation. (b) Barrett-Ösophagus mit oralwärts verschobener Z-Linie. (Modifiziert nach Spechler 2002)

Um bei maligner Progression der Barrett-Mukosa frühzeitig therapieren zu können, empfiehlt eine Leitlinie des American College of Gastroenterology eine systematische endoskopische Überwachung (sog. „Barrett surveillance“) nach genau definierten Regeln (Wang et al. 2008).

Die Barrett-Mukosa wird als Reaktion auf eine permanente Exposition gegenüber Magen- und Gallensäuren bzw. eine daraus resultierende Refluxösophagitis angesehen. Die Modellvorstellung ist, dass das Gewebe

unter Bildung einer inkompletten Form eines intestinalen Epithels ausheilt, das den Ösophagus besser vor weiteren Irritationen schützen kann (Spechler 2002; von Rahden et al. 2007; Phillips et al. 2011).

Tabelle 1: Risikofaktoren für das Barrett-Karzinom und für den Barrett-Ösophagus im Überblick

	Barrett-Karzinom	Barrett-Ösophagus
Risikofaktoren:	GERD (Hauptrisikofaktor) Adipositas (Tabakrauchen) (Alkohol)	GERD (Hauptrisikofaktor) Adipositas Tabakrauchen hereditäre Komponente
Protektiv:	Ballaststoffe, Früchte, Gemüse, Antioxidantien, H. pylori	NSAR, diätetische Faktoren; H. pylori

Der zelluläre Ursprung des Adenokarzinoms des distalen Ösophagus ist bisher nicht geklärt (Phillips et al. 2011). Viele Autoren postulieren eine metaplastische Umwandlung der normalen Schleimhaut, also eine Änderung im Differenzierungsmuster der für die Regeneration der Ösophagusschleimhaut verantwortlichen Stammzellen (van Baal et al. 2008; Zhang et al. 2009). Diskutiert werden ösophageale Stammzellen aus der Basalzellschicht (Croagh et al. 2007) oder aus submukösen Drüsen (Leedham et al. 2008). Als weitere Möglichkeit für die Ausbildung des Zylinderepithels wurde eine Transdifferenzierung aufgrund epigenetischer Effekte auf postmitotische Zellen des Plattenepithels vorgeschlagen. Es wurde gezeigt, dass Plattenepithelzellen Marker für Zylinder- und intestinales Epithel exprimieren können, wenn sie Magen- und Gallensäure ausgesetzt sind (Bajpai et al. 2008).

1.2.2 Zweifel an der Bedeutung als Präkanzerose

Die gastroösophageale Refluxkrankheit bzw. der daraus resultierende Barrett-Ösophagus gelten als wichtigste Risikofaktoren für die Entstehung eines ösophagealen Adenokarzinoms (Spechler 2002; von Rahden et al. 2007; Phillips et al. 2011). Die Vorstellung ist, dass aus dem Barrett-Epithel in einer Sequenz über die histologischen Stadien einer niedriggradigen und einer

hochgradigen Neoplasie das invasive Adenokarzinom entsteht (Spechler 2002). Es ist aber nicht klar, ob das Epithel bei jedem Patienten alle diese histopathologischen Veränderungen stadienhaft durchläuft (von Rahden et al. 2007). In den letzten Jahren ist eine kontroverse Diskussion um die Bedeutung des Barrett-Ösophagus als Präkanzerose aufgekommen (Jamieson 2007). Folgende Kritikpunkte wurden vorgebracht:

- Ein Barrett-Ösophagus ist mit einer starken Risikoerhöhung für ein ösophageales Adenokarzinom assoziiert (Cameron et al. 1985). Jedoch erkrankt nur ein sehr kleiner Prozentsatz der Barrett-Patienten von unter 0,5 % pro Jahr an einem Karzinom (Shaheen et al. 2009; Hvid-Jensen et al. 2011). Eine Metaanalyse entdeckte noch dazu eine mögliche Überschätzung des Krebsrisikos aufgrund von Publikationsbias (Shaheen et al. 2000). Daher wird vermutet, dass für die Entstehung des Adenokarzinoms andere, bisher unbekannte Faktoren eine Rolle spielen (Jamieson 2007).
- Unklar ist auch, welchen Einfluss die Länge des Barrett-Ösophagus auf das Krebsrisiko hat. Einige Studienergebnisse deuten zwar darauf hin, dass ein ausgedehnteres Barrett-Epithel mit einer höheren Tumorinzidenz korreliert (Avidan et al. 2002; Shaheen 2005), andere Studien stellen diesen Zusammenhang allerdings in Frage (Rudolph et al. 2000). Eine fehlende Korrelation würde eher gegen einen kausalen Zusammenhang zwischen Barrett-Ösophagus und Adenokarzinom sprechen.
- Zur Behandlung des GERD stehen zwei Therapiestrategien zur Verfügung, die medikamentöse Behandlung mit Histaminantagonisten und Protonenpumpeninhibitoren sowie die chirurgische Therapie (Funduplicatio). Zweifel am Barrett-Epithel als Präkanzerose ergeben sich auch bei der genaueren Analyse dieser beiden Therapiestrategien. So kann weder die medikamentöse noch die chirurgische Therapie das Krebsrisiko signifikant senken (Lagergren et al. 1999; Ye et al. 2001; Chang et al. 2007; Lagergren et al. 2010; Lofdahl et al. 2013). Dies sollte man aber bei einem kausalen Zusammenhang von Barrett-Epithel und

Adenokarzinom erwarten. Zudem wurde für das Adenokarzinom des distalen Ösophagus eine Assoziation mit einer langfristigen PPI-Therapie aufgezeigt, d.h. eine langfristige PPI-Einnahme könnte das Krebsrisiko sogar steigern (Islami et al. 2009; Nguyen et al. 2009; von Rahden et al. 2012). Die Ergebnisse diesbezüglich widersprechen sich allerdings.

- Auch wegen eines ungeklärten geschlechtsspezifischen Inzidenzunterschieds bestehen Zweifel (Jamieson 2007). Die Prävalenz von GERD und Barrett-Ösophagus ist bei Männern etwas höher, das Verhältnis liegt zwischen 1 : 1 und 2 : 1 (Gerson et al. 2001; Dent et al. 2005; Ronkainen et al. 2005). An einem Barrett-Karzinom jedoch erkranken Männer ungefähr zehnmal so häufig wie Frauen (Devesa et al. 1998). Vielleicht spielen auch hier bisher unbekannte Faktoren eine Rolle (Jamieson 2007).
- Histologisch befindet sich nicht neben allen ösophagealen Adenokarzinomen eine Barrett-Mukosa, d.h. nicht jedes Karzinom ist mit einer Barrett-Mukosa assoziiert. Die Rate schwankt zwischen 40 % (Sabel et al. 2000) und über 60 % (Lagergren et al. 1999; Zhang et al. 2005). Es besteht die Möglichkeit, dass sich die Karzinome, die nicht mit einer Barrett-Mukosa assoziiert sind, unabhängig davon entwickelt haben. Außerdem scheint auch die Risikoerhöhung durch den gastroösophagealen Reflux unabhängig von einer Barrett-Mukosa zu sein (Lagergren et al. 1999). Beides würde die pathogenetische Rolle der Barrett-Schleimhaut als Präkanzerose anzweifeln lassen.

Zusammenfassend bleiben Zweifel am Stellenwert des Barrett-Ösophagus als Präkanzerose (Jamieson 2007). Möglicherweise kann ein alternativer Erklärungsversuch postuliert werden. Sehr wahrscheinlich bleibt aber die Annahme, dass die Tumorgenese im Zusammenhang mit einer chronischen Entzündung im Rahmen der Refluxerkrankung gesehen werden muss (Lagergren et al. 1999; Jamieson 2007). Möglicherweise sind aber wichtige Einflussfaktoren für die Tumorgenese noch nicht identifiziert. Das beflügelt die Suche nach weiteren möglichen zellulären Ursprüngen des ösophagealen Adenokarzinoms.

1.3 Tumorgenese des ösophagealen Adenokarzinoms

1.3.1 Zellulärer Ursprung der Tumorzellen

Die zellulären Ursprünge vieler solider Tumore sind unbekannt. Auch die genauen Mechanismen der für die Tumorgenese wichtigen Interaktion der Tumorzellen mit ihrer Umgebung sind ungeklärt (Visvader et al. 2008). Man weiß, dass die Zellen eines Tumors oft sehr heterogen hinsichtlich ihrer Funktion und ihrer Eigenschaften in Bezug auf Proliferation und Differenzierung sind (Heppner et al. 1983). Die zellulären Mechanismen, die zu dieser Tumorerogenität führen, sind Gegenstand intensiver Forschung. Es existieren zwei unterschiedliche Modelle, die diese Heterogenität und weitere Tumoreigenschaften erklären sollen, auf der einen Seite das ältere Modell der klonalen Selektion (clonal selection model) und auf der anderen Seite das Modell der Krebsstammzellen (cancer stem cells, CSCs).

1.3.2 Modell der klonalen Selektion

Gemäß dem Modell der klonalen Selektion (Nowell 1976) beginnt die Entstehung eines Tumors damit, dass sich in einer beliebigen Zelle eines Gewebes mehrere Mutationen akkumulieren, die ihr einen Wachstumsvorteil gegenüber den umliegenden Zellen verschaffen (Campbell et al. 2007). Die Zellen akquirieren nach und nach aufgrund genetischer Instabilität und unkontrollierter Proliferation diverse Mutationen. Durch diesen genetischen Drift, also die zufällige Veränderung einzelner Gene, und durch natürliche Selektion der aggressivsten Zellen wird die Tumorprogression angetrieben (Campbell et al. 2007). Das sorgt dafür, dass jede der Tumorzellen Fähigkeiten erlangen kann, die ihr invasives Wachstum ermöglichen und die für Metastasierung, Therapieresistenz und Rezidive verantwortlich sind. Angelehnt an die Evolutionstheorie von Darwin spricht man von der klonalen Evolution von Tumoren, wobei eine Gewebezelle durch ein initiales Ereignis einen Wachstumsvorteil gegenüber den benachbarten Zellen erhält und unter Bildung identischer Zellen expandiert. Wird eine Zelle dieses Klons von einem weiteren

Ereignis getroffen, kann ihr das wiederum Wachstumsvorteile verschaffen (Wagener et al. 2009). Dieses Prinzip setzt sich fort. Die Heterogenität eines Tumors entsteht durch die somatische Akkumulation genetischer Aberrationen und weiterer Mutationen in Nachkommen dieser Zelle, die dann in Konkurrenz zueinander Tumorklone mit variablen Selektionsvorteilen hervorbringen (Nowell 1976; Campbell et al. 2007). Die Mutationen, die zu Tumorentstehung und Tumorprogression führen, können sich in jeder Zelle des Gewebes ereignen.

1.3.3 Tumorinitiierende Zellen – Stammzellhypothese

1.3.3.1 Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften

Neben dem Modell der klonalen Selektion wurde eine neue Theorie über den zellulären Ursprung und die Organisation von Tumoren postuliert (Bonnet et al. 1997; Reya et al. 2001). Für verschiedene Tumorentitäten wurden Subpopulationen von Zellen identifiziert, die Eigenschaften von Stammzellen aufweisen. Es gibt Hinweise, dass einige Tumoren – ähnlich wie normales Gewebe – von solchen Zellen abstammen und unterhalten werden. Analog zu den Stammzellen des normalen Gewebes werden diese speziellen Zellen der Tumoren als Krebsstammzellen bezeichnet. Das Modell der Krebsstammzellen ist derzeit Thema intensiver Diskussionen (Visvader et al. 2008). Folgende drei Fähigkeiten charakterisieren diese Stammzellen: erstens die Fähigkeit zur Selbsterneuerung durch symmetrische und asymmetrische Teilung, d. h. die Teilung der Zelle in zwei neue Stammzellen bzw. in eine neue Stammzelle und eine sich differenzierende Zelle, zweitens die Pluripotentialität, also die Fähigkeit, abhängig von den Umgebungsbedingungen in unterschiedliche Gewebearten zu differenzieren, und drittens ein extensives Proliferationspotential (Jordan et al. 2006). Die Organisation des Tumors im Modell der Krebsstammzellen unterscheidet sich grundsätzlich von dem der klonalen Selektion. Der Tumor ist hierarchisch aufgebaut mit den Krebsstammzellen an der Spitze, die die große Masse an normalen Tumorzellen unterhalten (Campbell et al. 2007). Abbildung 2 stellt die beiden Modelle gegenüber.

mal für einen soliden Tumor Tumorstammzellen entdeckt (Al-Hajj et al. 2003); es folgten weitere Tumoren, z. B. verschiedene Hirntumoren (Singh et al. 2004), das kolorektale Karzinom (Ricci-Vitiani et al. 2007), das Pankreaskarzinom (Li et al. 2007), das hepatozelluläre Karzinom (Yang et al. 2008), das Melanom (Schatton et al. 2008) und das Ovarialkarzinom (Zhang et al. 2008).

Die zur Identifikation verwendeten Marker waren dabei oft die gleichen wie die, die für normale Stammzellen der entsprechenden Gewebe verwendet werden. Der Anteil an Krebsstammzellen in den Tumoren scheint sehr variabel zu sein, er wird im Bereich zwischen 2 und 30 % angegeben (O'Brien et al. 2007; Visvader et al. 2008), siehe Tabelle 2.

Tabelle 2: Prozentualer Anteil von Krebsstammzellen in verschiedenen menschlichen Tumorgeweben. (Modifiziert nach Visvader et al. 2008)

Tumorlokalisation	CSC-Marker	Anteil der Zellen mit Exprimierung der CSC-Marker	Arbeit
Brust	CD44 ⁺ /CD24 ^{-low}	11-35 %	(Al-Hajj et al. 2003)
Brust	ALDH1 ⁺	3-10 %	(Yu et al. 2007)
Gehirn	CD133 ⁺ (GBM)	19-29 %	(Lee et al. 2005)
	CD133 ⁺ (MB)	6-21 %	
Gehirn	CD133 ⁺	2-3 %	(Bao et al. 2006)
Kolon	CD133 ⁺	1,8-25 %	(O'Brien et al. 2007)
Kolon	CD133 ⁺	0,7-6 %	(Ricci-Vitiani et al. 2007)
Kolon	EpCAMhi/CD44+	0,03-38 %	(Dalerba et al. 2007)
Kopf und Hals	CD44+	0,1-42 %	(Prince et al. 2007)
Pankreas	CD44+/CD24+/ESA+	0,2-0,8 %	(Li et al. 2007)
Pankreas	CD133+	1-3 %	(Hermann et al. 2007)
Lunge	CD133+	0,32-22 %	(Eramo et al. 2008)
Leber	CD90+	0,03-6 %	(Yang et al. 2008)
Melanom	ABC5+	1,6-20 %	(Schatton et al. 2008)

1.3.3.2 Metastasierung und Tumorrezidiv

Krebsstammzellen gelten nicht nur als Ursprung der malignen Zellen des Primärtumors, sie werden auch als mögliche Ursache für die Entstehung von Metastasen und Tumorrezidiven diskutiert, beides wichtige Faktoren im Hinblick auf das Langzeitüberleben. Die aktuelle Studienlage deutet darauf hin, dass Krebsstammzellen das Potenzial besitzen, im Falle einer Dissemination neue Tumorzell-Populationen bilden zu können (Visvader et al. 2008). Ob alle Krebsstammzellen dazu in der Lage sind oder nur spezielle, aggressivere Krebsstammzell-Untergruppen mit gesteigertem Metastasierungspotenzial, die durch Mutation aus den ursprünglichen Krebsstammzellen entstanden sind, ist bislang nicht geklärt (Hermann et al. 2007; Marotta et al. 2009).

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Krebsstammzellen vieler Tumoren, darunter Brustkrebs, Leukämie, Pankreas- und Kolonkarzinom, resistent gegenüber manchen Chemo- und Radiotherapien sind (Marotta et al. 2009). So wurde zum Beispiel für Brustkrebs gezeigt, dass der Anteil an tumorinitiierenden Zellen nach einer Chemotherapie stark erhöht ist (Li et al. 2008). Das bedeutet, dass die Therapien gegen Krebsstammzellen weniger effizient sind als gegen die restlichen Tumorzellen (Yu et al. 2007). Diese Resistenz gäbe eine plausible Erklärung für die Entstehung von Tumorrezidiven. Trotz vordergründiger Elimination des Tumors durch Zerstörung der großen Masse an normalen Tumorzellen würde zumindest ein Teil der Krebsstammzellen überleben und hätte das Potential, ein erneutes Tumorwachstum zu initiieren. Daher muss der Fokus zukünftiger Therapien auf der Eradikation der Krebsstammzellen liegen, denn nur so wäre eine stabile Remission möglich.

1.3.3.3 Krebsstammzellen im Ösophagus

Eine Hypothese ist, dass auch an der Entstehung des ösophagealen Adenokarzinoms Krebsstammzellen beteiligt sind. Bezüglich der Identifikation erwiesen sich die von anderen Tumorentitäten bekannten Marker als unspezifisch und wenig geeignet (Grotenhuis et al. 2010). Für die Entwicklung

des Adenokarzinoms des distalen Ösophagus auf der Basis der klonalen Selektion und/oder der Stammzellhypothese sind zahlreiche Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen bekannt (Jeon et al. 2006; Visvader et al. 2008; Zhang et al. 2009). Stammzellmarker für das ösophageale Adenokarzinom wurden bisher nicht etabliert. Da das Barrett-Epithel als Form einer inkompletten intestinalen Metaplasie gilt, sind zwei evaluierte Marker des gastrointestinalen Systems, LgR5 (Barker et al. 2007) und DCAMKL-1 (May et al. 2009), vorgeschlagen worden (Souza et al. 2008; Zhang et al. 2009).

1.4 Marker

1.4.1 LgR5

Der Rezeptor LgR5 (leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5), andere Namen sind FEX, HG38, GPR49, GPR67 (G protein-coupled receptor 67) und GRP49, ist ein membranständiger, G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Der Ligand für diesen Rezeptor ist unbekannt (sog. Orphan-Rezeptor). Das kodierende Gen liegt auf Chromosom 12 mit der Lokalisation 12q22–q23. LgR5 wurde als Marker für intestinale Stammzellen (Barker et al. 2007) und für Stammzellen von Haarfollikeln (Jaks et al. 2008) identifiziert. Es wurde dabei gemutmaßt, dass er auch als Marker für Stammzellen vieler anderer Gewebearten dienen könnte. Als Zielgen des Wnt-Stammzell-Pfades könnte LgR5 mit Stammzeleigenschaften assoziiert sein. LgR5 aktiviert die CaMK und weitere wesentliche Elemente der Karzinogenese: NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B), das Homebox-Gen Cdx2 (Caudal type homeobox transcription factor 2), und CREB (cAMP response element-binding protein) (Abbildung 3). Darüberhinaus könnten Entzündungsreaktionen durch LgR5-abhängige Aktivierung von NF- κ B tumorinitiierende Zellen möglicherweise dazu befähigen, sich selbst aufrechtzuerhalten und die Tumorerogenität neu zu etablieren, indem sie ihre Resistenz gegenüber Apoptose erhöhen (Birnie et al. 2008; Quigley et al. 2009). Es wurde gemutmaßt, dass die LgR5-Expression auch für die Ätiopathogenese des ösophagealen Adenokarzinoms von Bedeutung sein könnte (Souza et al. 2008). Sie könnte mit der

Tumorprogression assoziiert sein und zur malignen Transformation aus präkanzerösen metaplastischen Zellen des Barrett-Epithels beitragen.

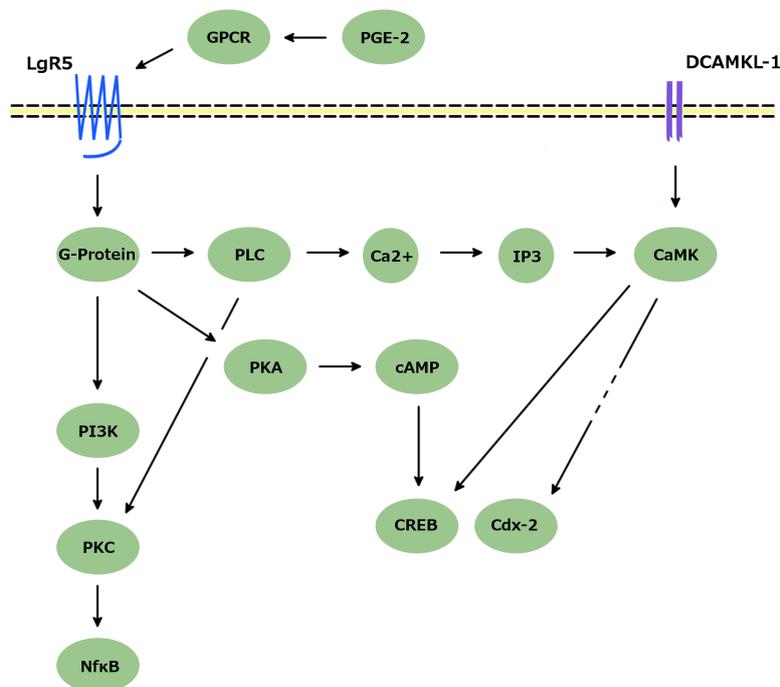


Abbildung 3: Vereinfachtes Schema zum entzündungsvermittelnden Signalweg G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR) durch PGE-2 als auch zu „stammzelltypischen Signalwegen“ (LgR5 und DCAMKL-1). Sowohl GPCR als auch DCAMKL-1 aktivieren entscheidende Signalelemente der Karzinogenese. Pfeile zeigen aktivierende Modifikation. G-Protein, Guaninnucleotid-bindendes Protein; PGE-2, Prostaglandin E2; GPCR, G-protein coupled receptor; LgR5, leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5; DCAMKL-1, Doublecortin and Calmodulin-Kinase-Like-1; PLC, Phospholipase C; IP3, Inositoltrisphosphat; CaMK, Calcium/Calmodulin-dependent kinase; PKA, Proteinkinase A; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; CREB, cAMP response element-binding protein; Cdx2, Caudal type homeobox transcription factor 2; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; PKC, Proteinkinase C; NfκB, Nuclear factor Kappa B.

1.4.2 DCAMKL-1

DCAMKL-1 (Doublecortin and Calmodulin-Kinase-Like-1) ist eine Serin-Threonin-Kinase und gehört zur Gruppe der CaMK. Die genetische Information liegt auf Chromosom 13 mit der Lokalisation 13q13. Neben der Bedeutung für die neuronale Entwicklung (Lin et al. 2000) wurde DCAMKL-1 vor kurzem als intestinaler Stammzellmarker identifiziert (May et al. 2008). Es ist beteiligt an molekularen Signalwegen, die mit Tumorgenese assoziiert sind. Auch

DCAMKL-1 wurde als möglicher Stammzellmarker für das ösophageale Adenokarzinom vorgeschlagen (Zhang et al. 2009) und soll im Rahmen dieser Arbeit auf die Eignung in dieser Hinsicht untersucht werden.

1.4.3 Cdx2 und Ki-67

Das Protein Cdx2 (Caudal type homeobox transcription factor 2) ist ein wichtiger Transkriptionsregulator in der embryonalen Differenzierung und bei der Aufrechterhaltung von Epithel vom intestinalen Typ (Vallbohmer et al. 2006). Cdx2 ist zunehmend als verlässlicher Marker für die intestinale Metaplasie des Barrett-Ösophagus etabliert worden (van Baal et al. 2008). Es wird in den Kernen der Zellen einer spezialisierten intestinalen Metaplasie stark exprimiert, nicht hingegen im normalen Plattenepithel des Ösophagus. Die Cdx2-Expression ist ein frühes Ereignis bei der Entstehung von Barrett-Epithel und etwa ab dem Übergang von der Refluxösophagitis zur spezialisierten intestinalen Metaplasie nachweisbar (Eda et al. 2003; Moons et al. 2004). Eine ektope Cdx2-Expression in ösophagealem Plattenepithel könnte zur Ausbildung der intestinalen Metaplasie beitragen (Liu et al. 2007).

Das Protein Ki-67 wird als Proliferationsmarker für Zellpopulationen verwendet. In der Zelle ist es mit der ribosomalen RNA-Transkription assoziiert (Bullwinkel et al. 2006). Ki-67 ist nur in den aktiven Phasen des Zellzyklus (G_1 , S, G_2 , und Mitose), jedoch nicht in der Ruhephase (G_0) nachweisbar (Scholzen et al. 2000). Das macht es zu einem exzellenten Marker zur Bestimmung der Wachstumsfraktion innerhalb einer Zellpopulation.

1.5 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit wurde zur Klärung folgender Fragen durchgeführt:

- Es soll untersucht werden, ob LgR5 und DCAMKL-1 als Marker für Krebsstammzellen des ösophagealen Adenokarzinoms geeignet sein könnten, wie es in der aktuellen Diskussion über die Grundlagen der Tumorgenese vorgeschlagen wurde (Souza et al. 2008; Visvader et al.

2008). Aufgrund des Expressionsmusters der beiden Marker sollen Hinweise auf zellulären Subpopulationen gesucht werden, die möglicherweise Stammzeleigenschaften besitzen. Die Ergebnisse sollen in Hinblick auf die beiden Modelle der Tumorgenese, das Modell der klonalen Selektion und die Stammzellhypothese, interpretiert werden.

- Des Weiteren soll analysiert werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von LgR5 bzw. DCAMKL-1 und dem Überleben der Patienten besteht.
- Zusätzlich soll nach Hinweisen für oder gegen die These gesucht werden, dass das Barrett-Epithel eine Präkanzerose des ösophagealen Adenokarzinoms ist. Es soll untersucht werden, ob die Ergebnisse auch erlauben würden, dass sich ein Karzinom auch ohne vorheriges Vorhandensein von Barrett-Epithel entwickelt kann.

Die Ergebnisse sollen auch in Hinblick auf mögliche Implikationen für die Therapie des ösophagealen Adenokarzinoms diskutiert werden. Es könnten sich neue Behandlungsoptionen eröffnen, indem durch speziell entwickelte Medikamente in tumorspezifische Signalwege von möglichen Barrett- und Krebsstammzellen eingegriffen werden könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Patientendaten und Tumorgewebe

2.1.1 Auswahl und Einteilung der Resektate

Die Untersuchungen erfolgten an Archivmaterial mit humanen Präparaten von Ösophaguskarzinomen aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg. Die Gewebeproben stammten aus den Jahren 2001 bis 2004. Alle Präparate waren routinemäßig gemäß histopathologischem Standardverfahren formalinfixiert und in Paraffin eingebettet worden. Sie waren bei Operationen gewonnen worden, die zur primären Entfernung von Ösophaguskarzinomen durchgeführt worden waren. Bei der Auswahl berücksichtigt wurden nur Resektate von Patienten, die keine neoadjuvante antineoplastische Therapie (Radiatio oder Chemotherapie) erhalten hatten. Eine weitere Bedingung war, dass der Tumor durch die Operation komplett entfernt wurde (R0-Resektion). Für die Adenokarzinome wurde gefordert, dass sie aus dem distalen Ösophagus stammten, sie entsprechen somit dem AEG Typ I gemäß der Klassifikation nach Siewert und Stein (Siewert et al. 1998). Es wurden Gewebeproben von insgesamt n = 70 Patienten untersucht, die sich wie folgt unterteilen lassen:

- n = 41 Adenokarzinome des Ösophagus (esophageal adenocarcinoma, EAC) mit angrenzend nachweisbarem Barrett-Epithel (Barrett's Esophagus, BE) (EAC mit BE)
- n = 19 Adenokarzinome des Ösophagus ohne nachweisbares Barrett-Epithel (EAC ohne BE)
- n = 10 Plattenepithelkarzinome des Ösophagus (esophageal squamous-cell carcinoma, ESCC), die zur Negativkontrolle in die Studie aufgenommen wurden.

Weitere Daten zu den Patienten und den Resektaten (Alter, Geschlecht, histologische Klassifikation des Karzinoms, Invasionstiefe, Lymphknotenstatus, UICC-Stadium und Überleben) sind in Tabelle 4 (Seite 32) und Tabelle 5 (Seite 33) dargestellt.

Die Daten für das Follow-up stammen aus dem lokalen Tumorregister Unterfranken und dem universitätseigenen Tumorregister und waren für alle Patienten verfügbar. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 29 Monate bei einer Standardabweichung von $\pm 17,6$ Monaten.

2.1.2 Histopathologische Analyse

Bei der histopathologischen Analyse wurden alle routinemäßig angefertigten H. E.-Schnitte sämtlicher Paraffinblöcke untersucht. Die Schnitte wurden bezüglich Tumorinfiltration (EAC oder ESCC), Stroma und Infiltration von Immunzellen analysiert. Das Staging der Tumoren erfolgte gemäß der 6. Auflage des Tumor-Staging-Systems der UICC (Union internationale contre le cancer) / des AJCC aus dem Jahr 2002 (Sobin et al. 2002). Das Grading der Tumoren erfolgte gemäß den Kriterien der WHO (World Health Organization) (Hamilton et al. 2000). Die Tumordaten (UICC-Stadium, pT-Kategorie, pN-Kategorie, cM-Kategorie, Anzahl entfernter Lymphknoten, Anzahl tumorinfiltrierter Lymphknoten, Resektionsstatus und Lokalisation) und die Patientendaten wurden in einer Tabelle (EXCEL, Microsoft, Redmond, USA) gesammelt.

Wurde bei der histopathologischen Analyse Barrett-Mukosa, also spezialisierte intestinale Metaplasie mit Becherzellen (Spechler 2002; von Rahden et al. 2007) gefunden, wurden die entsprechenden Adenokarzinome als „Adenokarzinome mit Barrett-Epithel“ („EAC mit BE“) klassifiziert. Zur Erhöhung der Sicherheit bei der Identifikation von Barrett-Epithel wurden zusätzlich für alle Adenokarzinome immunhistochemische Färbungen mit Cdx2 (Caudal type homeobox transcription factor 2) durchgeführt, das mit einer Sensitivität von 70 % (Phillips et al. 2003) als früher Marker für intestinale Metaplasie gilt (Moons et al. 2004). Wurden anhand dieser Färbungen auch nur kleinste

Metaplasieherde identifiziert, galten auch diese Tumoren als Adenokarzinome mit Barrett-Epithel. Wurde in keinem der Tumorblöcke, weder histopathologisch noch immunhistochemisch, eine Metaplasie nachgewiesen, wurden die jeweiligen Tumoren als „Adenokarzinome ohne Barrett-Epithel“ („EAC ohne BE“) klassifiziert.

2.2 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

2.2.1 Verwendete Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Färbungen mithilfe von Antikörpern gegen LgR5, DCAMKL-1, Cdx2 und Ki-67 an Serienschnitten der oben beschriebenen Resektate durchgeführt.

Für die immunhistochemischen (IHC-)Färbungen wurden unkonjugierte polyklonale Antikörper gegen LgR5 und DCAMKL-1 (Kaninchen) sowie Isotyp-Kontroll-Antikörper (Maus, Kaninchen) von Abcam (Cambridge, UK) verwendet. Der unkonjugierte monoklonale Cdx2-Antikörper (Maus) wurde von Biogenex (San Ramon, USA) bezogen, der unkonjugierte monoklonale Ki-67-Antikörper (Maus) von Acris (Hiddenhausen, D).

Zur Analyse einer Koexpression von LgR5 und Ki-67 wurden sequenzielle Immunfluoreszenz(IF)-Doppelfärbungen angefertigt. Als Sekundärantikörper für Ki-67 wurde ein Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-konjugierter AffiniPure Affe-anti-Maus-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Suffolk, UK) in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Als Sekundärantikörper für LgR5 wurde ein Cy3-konjugierter AffiniPure Affe-anti-Kaninchen-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) in einer Verdünnung von 1:200 verwendet.

Als Positivkontrolle der LgR5-Expression wurden Färbungen mit den gleichen Antikörpern an normaler Kolon-Schleimhaut durchgeführt (Segditsas et al. 2008; Jin et al. 2009). Auch diese Resektate stammten aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg und waren bei Resektionen von Polypen oder Divertikeln gewonnen worden. Es handelte sich um normales,

nicht maligne verändertes Gewebe, das an die Polypen / Divertikel angrenzte. Das Kolongewebe durchlief nach seiner Resektion die gleiche Standardprozedur wie die Ösophagus-Resektate (Formalinfixierung, Einbettung in Paraffin).

2.2.2 Verarbeitung und Färbung des Gewebes

Von den Paraffin-Blöcken mit den Tumorsektaten wurden mit einem Mikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, D) Serienschnitte von 2 µm Dicke angefertigt, in einem Warmwasserbad gestreckt und auf adhäsive Objektträger (Hartenstein, Würzburg, D) gebracht. Anschließend wurden die Schnitte zunächst in Xylen und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und dann in Wasser rehydriert. Darauf folgte eine Hitzedemaskierung der Epitope (Heat induced epitope retrieval, HIER) in Citrat-Puffer mit pH-Wert 6,0 (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D).

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Schnitte in Normalserum (2 %) und Rinder-Serum-Albumin (bovine serum albumin, BSA, 0,5 %) bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert, um nicht-spezifische Bindungen zu blocken. Danach wurden die Schnitte mit dem Primär-Antikörper bzw. dem Kontroll-Antikörper über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer und anschließend mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper, verdünnt in TBS (Tris-buffered saline) mit 0,5 % BSA, über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer und anschließend mit dem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) gegengefärbt, mit Polyvinylalkohol-Eindeckmittel (DABCO, Sigma-Aldrich) eingedeckt und mit einer Kamera (Zeiss, Jena, D) abfotografiert. Die Fotografien wurden mithilfe des MetaMorph Software-Pakets (Visitron Systems, Puchheim, D) in den Microsoft Office Picture Manager importiert.

Für die immunhistochemischen Färbungen erfolgte nach Entparaffinierung, Rehydrierung und Hitzedemaskierung (alles wie oben beschrieben) die Inaktivierung der endogenen Peroxidase in 0,03%igem Wasserstoffperoxid. Die endogene Biotin-Aktivität wurde unter Verwendung eines Avidin / Biotin-Blocking-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA) geblockt. Die Schnitte wurden dann mit dem Primärantikörper allein (LgR5, DCAMKL-1, Cdx2 und Ki-67) bzw. mit LgR5-blocking-Peptid (Abgent, San Diego, USA) (Vorinkubation für 30 Minuten) und dem LgR5-Antikörper über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte mit dem DAKO LSAB2-System, bestehend aus biotinyliertem Sekundärantikörper und Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP)-konjugiertem Streptavidin, behandelt und anschließend durch Inkubation in DAB (3,3'-Diaminobenzidin) (Biogenex), einem HRP-Chromogen, über fünf Minuten angefärbt. Zuletzt erfolgten die Gegenfärbung mit Hämalaun und das Eindecken der Gewebeschnitte mit Glycergel (Dako Deutschland GmbH).

Bezüglich Cdx2 und LgR5 wurden sequenzielle IHC-Doppelfärbungen durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem ersten Primärantikörper (Cdx2) wurde ein mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierter AffiniPure Affe-anti-Maus Antikörper verwendet, anschließend wurde das Gewebe für 20 Minuten in Fast Red (Dako Deutschland GmbH) inkubiert. Nach der Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper (LgR5) wurde ein HRP-konjugierter AffiniPure Affe-anti-Maus-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) verwendet, anschließend wurden die Gewebeschnitte für fünf Minuten in DAB (Biogenex) inkubiert. Es folgte die Gegenfärbung mit Hämalaun und das Eindecken der Gewebeschnitte mit Glycergel (Dako Deutschland GmbH).

2.2.3 Auswertung

Bezüglich der Expression von LgR5, DCAMKL-1 und Ki-67 wurde sowohl das Tumorgewebe („EAC ohne BE“ und „EAC mit BE“) als auch das Barrett-Epithel („BE“) neben den „EAC mit BE“ ausgewertet. Die Auszählung der angefärbten Zellen erfolgte in „high-power fields“ (HPF), Ausschnitten bei 400facher

Vergrößerung. Dazu wurden auf jedem Gewebeschnitt sechs definierte, repräsentative, individuelle Bereiche ausgewählt und quantitativ analysiert. Das Ergebnis wurde als Prozentzahl angegeben (Anzahl positiver Zellen bezogen auf 100 Tumorzellen).

Für die Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen wurde in sechs „high-power fields“ die Anzahl der Ki-67-positiven Zellen und die der LgR5-positiven Zellen bestimmt. Der Anteil der gleichzeitig Ki-67-positiven Zellen an allen LgR5-positiven Zellen wurde als Prozentzahl angegeben.

2.3 Quantitative RT-PCR

Die LgR5-Expression wurde zusätzlich mittels quantitativer Echtzeit-PCR (real-time quantitative reverse transcription-polymerase-chain-reaction, RT-PCR) auf mRNA-Ebene analysiert. Auf eine Analyse bezüglich der Expression von DCAMKL-1 wurde bei fehlender Expression auf Proteinebene (IHC) verzichtet.

Zur Untersuchung mittels RT-PCR wurden von den Paraffinblöcken Schnitte mit 10 µm Dicke angefertigt und die zu untersuchenden Ausschnitte (nur epitheliale Bereiche) per Hand mit einem Skalpell präpariert. Für zwei verschiedene Bereiche – im Barrett-Epithel und im Adenokarzinom ohne Barrett-Epithel – wurden jeweils gleich große Gewebeflächen mit jeweils 2 cm x 1,5 cm Oberfläche bemessen. Mithilfe des Absolutely RNA FFPE Kits und des AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kits (Stratagene, Waldbronn, D) wurde nach Vorgaben des Herstellers die gesamte zelluläre RNA extrahiert und cDNA synthetisiert.

Das Lysat wurde anschließend auf die RNeasy Quarzmembran (RNeasy Mini spin column, RNeasy Mini Kit Qiagen, Hilden, D) gegeben. Die RNA wurde gebunden und alles Fremdmaterial wurde effizient abgewaschen. Pure, konzentrierte RNA wurde in Wasser eluiert und für weitere Analysen bei –70 °C gelagert. Die Menge der Gesamt-RNA wurde anhand der Absorption von Licht mit der Wellenlänge 260 nm, dem Absorptionsmaximum von RNA, bestimmt. Die Reinheit wurde durch des Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm : 280 nm

(dem Absorptionsmaximum vieler anderer Proteine) ermittelt. Dieser Wert lag in einem Bereich von 1,8 bis 2,0, was bestätigte, dass die RNA-Präparate nicht durch andere Proteine kontaminiert waren.

Mithilfe der Primer Express-Software (Life Technologies, Carlsbad, USA) wurden Primer entworfen, um kurze Segmente von 50–150 Basenpaaren der Ziel-cDNA zu vervielfältigen. Die Sequenz des LgR5-Vorwärtsprimers war 5'-TGCTGGCTGGTGTGGATGCG-3', die Sequenz des LgR5-Rückwärtsprimers war 5'-GCCAGCAGGGCACAGAGCAA-3'. Für Kontrollfärbungen wurde passende menschliche ösophageale cDNA von BioChain (Hayward, USA) erworben. Für die relative Quantifizierung sowie zur Qualitätskontrolle der cDNA wurde das Haushaltsgen (housekeeping gene) Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die Sequenz des GAPDH-Vorwärtsprimers war 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAGG-3'; die Sequenz des GAPDH-Rückwärtsprimers war 5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'. Alle PCR-Reaktionen wurden mit einem DNA Engine Opticon 2 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) ausgeführt. Es folgte eine reverse Transkription der gesamten RNA zu cDNA gemäß Anleitung des Herstellers in einem Volumen von 20 µl mit 200 Einheiten Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT) und 0,1 µg / µl Zufallsprimern.

Jede PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 25 µl mit 12,5 µl Sensi Mix, 0,5 µl SYBR Green, 10 pmol / µl Vorwärtsprimer, 10 pmol / µl Rückwärtsprimer, 1 µl Template-DNA (150 ng) und 9 µl peqGOLD RNase-freiem Wasser (alles peqlab Biotechnologie, Erlangen, D) durchgeführt. Der initialen Denaturierung bei 95° C für zehn Minuten folgten 38 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 15 Sekunden, Abkühlung bei 60,9 °C für 30 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 40 Sekunden. Um die Spezifität der Vervielfältigung zu bestätigen, wurden die PCR-Produkte jedes Primer-Paars einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen. Für jeden Durchgang wurden Negativkontrollen ohne Matrize produziert.

Die Daten zur Quantifizierung wurden mittels LightCycler-Software (Roche Diagnostics, Risch, CH) analysiert. Die Reproduzierbarkeit wurde bestätigt,

indem zwei voneinander unabhängige PCRs durchgeführt wurden. Der mittlere Wert des Schwellenzyklus (threshold cycle, Ct) wurde berechnet als die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz des Reporters eine feste Schwelle erreicht hat. Die Differenz ΔCt zwischen den mittleren Ct-Werten der Proben und denen des Haushaltgens (GAPDH) wurde bewertet. Anschließend wurde die Differenz $\Delta\Delta\text{Ct}$ zwischen den mittleren ΔCt -Werten der Tumor-Proben für jedes Ziel und des ΔCt -Werts der normalen Gewebe für dieses Ziel bestimmt. Der Wert der relativen Quantifizierung, also der Unterschied angegeben in Vielfachen des normalen Werts, wurde als $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ausgedrückt.

2.4 Zellkulturen

Als Positivkontrolle wurde die Expression von LgR5 in ösophagealen Adenokarzinomzellen der Zelllinie OE-33 (1×10^4 Zellen, Sigma-Aldrich) mittels Cytospins und, auf Genexpressionsebene, mittels RT-PCR analysiert. Die Tumorzellen stammen ursprünglich aus einem niedrig differenzierten Tumor einer 73jährigen Patientin im UICC-Stadium IIA, die untersuchten Zellen stammten aus dem Jahr 2009. Auf eine Untersuchung der Expression von DCAMKL-1 wurde bei negativer Expression an dem humanen Paraffinmaterial (IHC) verzichtet.

Eine Kontamination mit Mykoplasmen wurde mittels RT-PCR ausgeschlossen. Die Zellen wurde in PRMI-1640-Medium kultiviert, dem 10 % fetales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS), Penicillin (100 Einheiten / ml) und Streptomycin (100 μg / ml) zugesetzt worden war. Die Cytospins der OE-33-Zelllinie wurden in Aceton fixiert und für zehn Minuten getrocknet. Die anschließenden Schritte zur Rehydrierung, zum Blocken nicht-spezifischer Bindungen und zum Färben waren die gleichen, die im Rahmen der IHC-Färbungen der Gewebeschnitte beschrieben wurden. Zur Durchführung der RT-PCR wurde, nach einer Homogenisierung, zum Lysat der OE-33-Zelllinie Diethylpyrocarbonat (DEPC) in 75%igem Ethanol hinzugefügt. Ansonsten wurde analog zu den IHC-Färbungen verfahren.

2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software MedCalc, Version 11.3.2 (Mariakerke, B). Alle Werte wurden als Median \pm Interquartilsabstand (interquartile range, IQR) angegeben, da die Gen- und Proteinexpression laut D'Agostino-Pearson-Test nicht normalverteilt ist. Die tumorspezifische Überlebenszeit wurde festgelegt als der Zeitraum zwischen Tumorresektion und tumorbedingtem Tod, die rezidivfreie Zeit als Zeitraum zwischen Tumorresektion und evidentem Tumorrezidiv. Die Gesamtüberlebenszeit im Zusammenhang mit der Expression von LgR5 wurde mithilfe der Kaplan-Meier-Methode geschätzt (Kaplan et al. 1958). Um die Unterschiede in der Gesamt- bzw. tumorbedingten Überlebenszeit der Patienten nach erfolgreicher (R0) kurativer Resektion eines ösophagealen Adenokarzinoms zu analysieren, wurden die Patienten in zwei Untergruppen (dichotome Variablen) unterteilt. Der Cut-off-Wert für die Unterteilung in schwache bzw. starke Expression wurde für die LgR5-Expression in Barrett-Epithel (n = 41) auf 33 %, für die LgR5-Expression in angrenzendem Adenokarzinom (n = 41) auf 15 % und für die LgR5-Expression in allen ösophagealen Adenokarzinomen (n = 60) auf 15 % festgesetzt. Die univariate Signifikanzanalyse für Unterschiede in der LgR5-Expression in den Überlebenskurven wurde mit dem Log-Rang-Test berechnet. Eine multivariate Analyse mittels Cox-Proportional-Hazards-Modell (Cox 1972) wurde für alle Parameter durchgeführt, die sich bezüglich univariater Faktoren als signifikant erwiesen haben. Der exakte Fisher-Test wurde benutzt, um das Verhältnis zwischen zwei kategorischen Variablen zu untersuchen. Die Daten wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitey-U-Test oder, wenn mehr als zwei Gruppen verglichen wurden, mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert. Als statistisch signifikant wurden p-Werte kleiner als 0,05 angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse auf Proteinebene

3.1.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für LgR5

Zunächst wurde der Anteil der Gewebeproben bestimmt, die das Protein LgR5 exprimierten. Eine positive Färbung war bei den Adenokarzinomen mit Barrett-Mukosa (EAC mit BE) in 85 % (35 von 41) der Gewebeschnitte zu erkennen, bei den Adenokarzinomen ohne Barrett-Mukosa (EAC ohne BE) in 84 % (16 von 19) der Gewebeschnitte. Der prozentuale Anteil der LgR5-positiven Schnitte korrelierte damit nicht mit dem Vorhandensein einer Barrett-Mukosa.

Außerhalb des Tumorgewebes, also in dem den Tumor umgebenden regulären Plattenepithel, wurde keine Anfärbung beobachtet. Auch auf den Kontrollschnitten mit ösophagealem Plattenepithelkarzinom (ESCC) wurde keine LgR5-Expression gefunden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse folgt in Tabelle 3.

Tabelle 3: Anteil LgR5-positiver Gewebeproben in den ösophagealen Adenokarzinomen mit (EAC mit BE) und ohne Barrett-Epithel (EAC ohne BE) sowie im ösophagealen Plattenepithelkarzinom (ESCC).

	EAC mit BE	EAC ohne BE	ESCC
Anteil LgR5-positiver Gewebeproben	85 % (35 von 41)	84 % (16 von 19)	0 % (0 von 10)

Die zur Positivkontrolle an normaler Kolon-Mukosa durchgeführten Färbungen zeigten das dort typische Färbemuster für LgR5 mit positiven Zellen an der Basis der Krypten bzw. in der Übergangszone und damit in Bereichen, die als Stammzellnische für die gut beschriebenen mutmaßlichen Stammzellen der Kolon-Mukosa angesehen werden (Abbildung 4) (Segditsas et al. 2008; Jin et al. 2009).

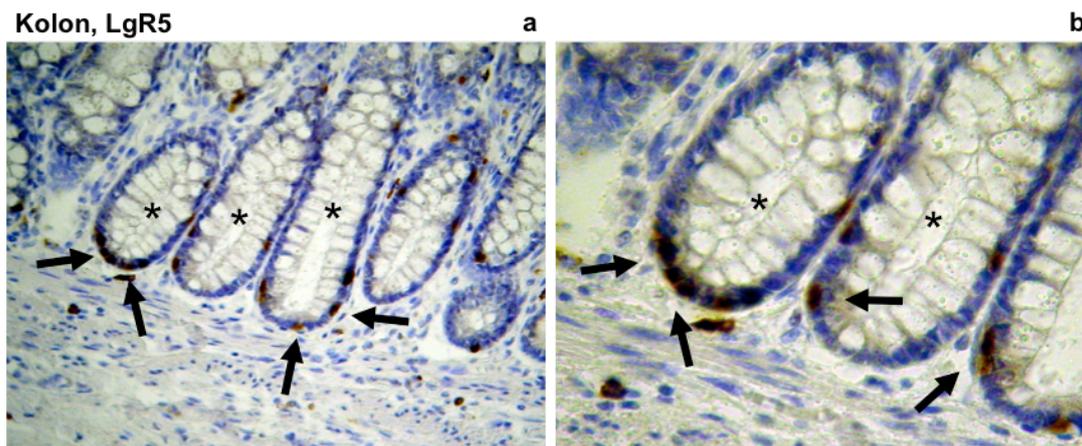


Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung von LgR5 in Kolonschleimhaut. Membranöses Färbemuster (braun). Normale Kolonmukosa (*) zeigte das typische Färbemuster für mutmaßliche Stammzellen der Schleimhaut in den vermuteten Stammzellnischen (Pfeile). (a) 200fache und (b) 400fache Vergrößerung.

Anschließend wurde bestimmt, welcher Prozentsatz der Zellen innerhalb der Gewebeschnitte LgR5 exprimiert, indem die Zellen innerhalb von repräsentativen „high-power fields“ (siehe Kapitel 2.2.3) ausgezählt wurden und der Anteil der LgR5-positiven Zellen berechnet wurde. Die Expression von LgR5 war im Barrett-Epithel signifikant höher ($n = 41$, Median 33 %, IQR 14,75-45,00 %; 95 %-Konfidenzintervall (KI) 24,76-39,95 %; $p < 0,05$; Abbildung 5, Säule 1) als in den angrenzenden Adenokarzinomen ($n = 41$, Median 15 %, IQR 13,00-18,00 %; 95 %-KI 13,76-17,00 %; $p < 0,05$; Abbildung 5, Säule 2) sowie in den Adenokarzinomen ohne Barrett-Epithel ($n = 19$, Median 13 %, IQR 4,75-23,00 %; 95 %-KI 6,35-22,44 %; $p < 0,05$; Abbildung 5, Säule 3). Die Ergebnisse der LgR5-Expression für das Adenokarzinom ohne Barrett-Epithel waren somit vergleichbar mit dem Expressionsniveau bei den Adenokarzinomen mit Barrett-Epithel. Für alle ösophagealen Adenokarzinome ($n = 60$) ergab sich für den Anteil an LgR5-positiven Zellen ein Median von 15 % (IQR 11,00-18,00 %; 95 %-KI 13,00-16,06 %).

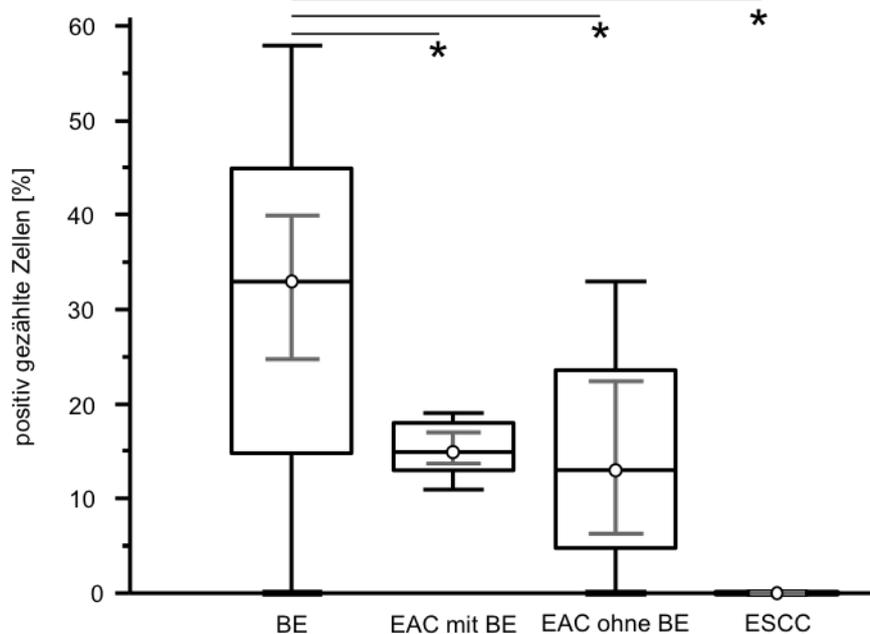


Abbildung 5: LgR5-Expression im Barrett-Ösophagus (BE), im Adenokarzinom mit (EAC mit BE) und ohne Barrett-Epithel (EAC ohne BE) sowie im Plattenepithelkarzinom (ESCC) als Prozentsatz aller ausgezählten Zellen. Die grauen Linien markieren die 95 %-Konfidenzintervalle. Sternchen (*) markieren signifikante Abweichungen von der Expression im Barrett-Epithel

Abbildung 6a und Abbildung 6b zeigen repräsentative Beispiele für LgR5- und Cdx2-Färbungen in Barrett-Epithel. Die Bereiche, die bezüglich der LgR5-Expression analysiert wurden, wurden zusätzlich mittels immunhistochemischer Färbungen mit Cdx2 auf das Vorhandensein von Barrett-Epithel bestätigt (Abbildung 6b). Dabei wurde eine Anfärbung am Boden des Barrett-Epithels und der Adenokarzinome beobachtet (Abbildung 6c).

Es erfolgte eine Subgruppenanalyse mit Aufschlüsselung der Ergebnisse für die LgR5-Expression nach Alter, Geschlecht, histologischer Klassifikation, Invasionstiefe, Lymphknotenstatus und UICC-Stadium, zusätzlich getrennt nach hoher und niedriger LgR5-Expression. Tabelle 4 zeigt die Daten für Adenokarzinome mit Barrett-Epithel und für das daran angrenzende Barrett-Epithel, in Tabelle 5 sind die Ergebnisse für alle untersuchten Adenokarzinome zusammengefasst.

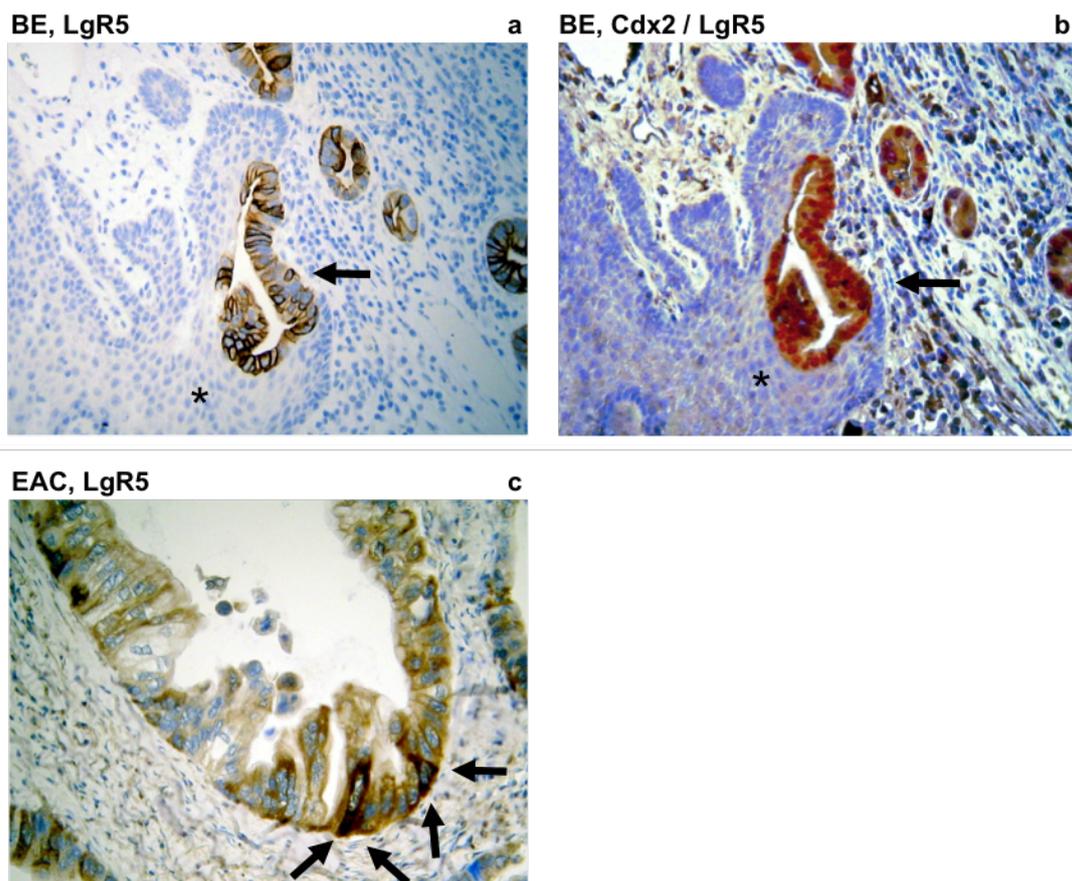


Abbildung 6: Expression von LgR5 im Barrett-Epithel. (a) Erhöhte LgR5-Expression im Barrett-Epithel (Pfeile). Angrenzendes normales Gewebe wird nicht angefärbt (*). (b) Zur Verifizierung des Barrett-Epithels durchgeführte Doppelfärbung mit Cdx2 (nukleäres Färbemuster, Fast Red) und LgR5 (membranöses Färbemuster, braun). (c) Signifikant ($p < 0,05$) niedrigere LgR5-Expression in den Karzinomen in mutmaßlichen Stammzellnischen an der Basis der EACs (Pfeile), 200fache Vergrößerung.

Färbungen der OE-33-Adenokarzinom-Zelllinie mittels Zytopins dienten als zusätzliche Positivkontrollen für eine LgR5-Expression und zeigten zu 25 % positive Zellen (Abbildung 7a). Nach vorheriger Inkubation der Zellen in LgR5-Blocking-Peptid wurde keine Anfärbung beobachtet (Abbildung 7b).

3 Ergebnisse

Tabelle 4: Klinisch-pathologische Eigenschaften der Studienpopulation mit Adenokarzinom mit Barrett-Ösophagus (für das Barrett-Epithel und das Adenokarzinom).

Merkmale	Patienten (n = 41)	LgR5 im BE		p-Wert	LgR5 im EAC mit BE		p-Wert
		niedrig	hoch		niedrig	hoch	
Alter (Jahre)				0,100			0,051
< 66	21 (51 %)	10 (48 %)	11 (52 %)		4 (19 %)	17 (81 %)	
≥ 66	20 (49 %)	4 (20 %)	16 (80 %)		10 (50 %)	10 (50 %)	
Geschlecht				0,074			0,673
männlich	34 (83 %)	14 (41 %)	20 (59 %)		11 (32 %)	23 (68 %)	
weiblich	7 (17 %)	0 (0 %)	7 (100 %)		3 (43 %)	4 (57 %)	
Histologisches Grading				0,305 ^a			0,083 ^a
G1	11 (27 %)	6 (55 %)	5 (45 %)		6 (55 %)	5 (45 %)	
G2	16 (39 %)	5 (31 %)	11 (69 %)		6 (37 %)	10 (63 %)	
G3/4	14 (34 %)	3 (21 %)	11 (79 %)		2 (14 %)	12 (86 %)	
Invasionstiefe				0,481 ^b			0,155 ^b
pT1	10 (24 %)	4 (40 %)	6 (60 %)		6 (60 %)	4 (40 %)	
pT2	18 (44 %)	7 (39 %)	11 (61 %)		6 (33 %)	12 (67 %)	
pT3	6 (15 %)	1 (17 %)	5 (83 %)		1 (17 %)	5 (83 %)	
pT4	7 (17 %)	2 (28 %)	5 (72 %)		1 (14 %)	6 (86 %)	
Lymphknotenmetastasen				0,001			0,0154
pN0	15 (37 %)	10 (67 %)	5 (33 %)		9 (60 %)	6 (40 %)	
pN1-3	26 (63 %)	4 (15 %)	22 (85 %)		5 (19 %)	21 (81 %)	
UICC-Stadium				0,481 ^c			0,155 ^c
UICC I	9 (22 %)	4 (44 %)	5 (56 %)		2 (22 %)	4 (78 %)	
UICC II	19 (46 %)	7 (37 %)	12 (63 %)		7 (37 %)	12 (63 %)	
UICC III	13 (31 %)	3 (23 %)	10 (77 %)		5 (15 %)	11 (85 %)	
UICC IV	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)		0 (0 %)	0 (0 %)	
Mittleres Gesamtüberleben (Monate)	42	32 (n = 14)	24 (n = 27)		33 (n = 14)	28 (n = 27)	

LgR5-Expression im Barrett-Epithel (BE) und im angrenzendem Adenokarzinom (EAC mit BE), getrennt nach klinisch-pathologischen Eigenschaften. ^a G1/2 vs. G3/4; ^b pT1/2 vs. pT3/4; ^c UICC I/II vs. UICC III/IV.

Tabelle 5: Klinisch-pathologische Eigenschaften der kompletten Studienpopulation (Adenokarzinome mit und ohne Barrett-Ösophagus).

Merkmale	Patienten (n = 60)	LgR5 alle EAC		p-Wert
		niedrig	hoch	
Alter (Jahre)				0,069
< 66	30 (50 %)	10 (33 %)	20 (67 %)	
≥ 66	30 (50 %)	18 (60 %)	12 (40 %)	
Geschlecht				1,000
männlich	52 (87 %)	24 (46 %)	28 (34 %)	
weiblich	8 (13 %)	4 (50 %)	4 (50 %)	
Histologisches Grading				0,577 ^a
G1	17 (28 %)	11 (65 %)	6 (35 %)	
G2	22 (37 %)	11 (50 %)	11 (50 %)	
G3/4	21 (33 %)	6 (29 %)	15 (71 %)	
Invasionstiefe				0,259 ^b
pT1	16 (27 %)	11 (69 %)	5 (31 %)	
pT2	26 (43 %)	11 (42 %)	15 (58 %)	
pT3	10 (17 %)	4 (40 %)	6 (60 %)	
pT4	8 (13 %)	2 (25 %)	6 (75 %)	
Lymphknotenmetastasen				0,007
pN0	23 (38 %)	16 (70 %)	7 (30 %)	
pN1-3	37 (62 %)	12 (32 %)	25 (68 %)	
UICC-Stadium				0,573 ^c
UICC I	14 (23 %)	10 (71 %)	4 (29 %)	
UICC II	28 (47 %)	11 (39 %)	17 (61 %)	
UICC III	18 (30 %)	7 (39 %)	11 (61 %)	
UICC IV	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	
Mittleres Gesamtüberleben (Monate)	43	32 (n = 28)	24 (n = 32)	

LgR5-Expression in allen Adenokarzinomen (EAC), getrennt nach klinisch-pathologischen Eigenschaften. ^a G1/2 vs. G3/4; ^b pT1/2 vs. pT3/4; ^c UICC I/II vs. UICC III/IV.

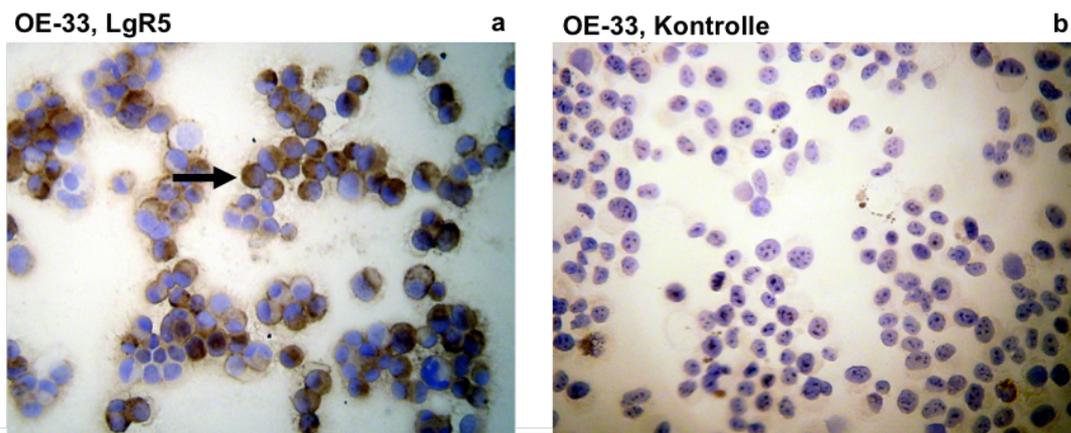


Abbildung 7: LgR5-Färbung in Zytospins der OE-33-Zelllinie. (a) 25 % positive Zellen. (b) Keine Anfärbung nach vorheriger Inkubation in LgR5-Blocking-Peptid.

3.1.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für DCAMKL-1

Die Färbungen bezüglich des mutmaßlichen Stammzellmarkers DCAMKL-1 zeigten auf allen Gewebeschnitten mit Adenokarzinomen, sowohl mit also auch ohne Barrett-Mukosa, ein negatives Färbeergebnis. Eine Expression wurde damit immunhistochemisch nicht nachgewiesen. Auch auf den Schnitten mit den Plattenepithelkarzinomen waren die Ergebnisse diesbezüglich negativ. In den Kontrollfärbungen an Kolon-Mukosa zeigte sich analog zur LgR5-Färbung das typische Muster in den mutmaßlichen Stammzellnischen an der Basis der Krypten bzw. in den Übergangszonen.

3.2 Ergebnisse auf Genebene

3.2.1 Ergebnisse der RT-PCR für das LgR5-Gen auf mRNA-Ebene

Zusätzlich wurde die Genexpression von LgR5 in den Resektaten auf mRNA-Ebene mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Im Vergleich zu normalem Plattenepithel des Ösophagus wies das Barrett-Epithel, das neben den Adenokarzinomen gefunden wurde, eine erhöhte LgR5-Expression auf (Median 3,5fach, IQR 3,03fach bis 3,73fach, n = 7), die Adenokarzinome ohne Barrett-

Epithel nur eine leicht erhöhte (Median 1,4fach, IQR 0,90fach bis 1,65fach; n = 8; Abbildung 8). Die Genexpression im Barrett-Epithel war damit signifikant ($p = 0,0159$) höher als die in den Adenokarzinomen ohne Barrett-Epithel. Die Expressionsanalyse auf RNA-Ebene untermauerte somit die Ergebnisse auf Proteinebene, nämlich eine erhöhte LgR5-Expression in dem mit einem Adenokarzinom assoziierten Barrett-Epithel im Vergleich zur Expression in den Adenokarzinomen ohne Barrett-Epithel.

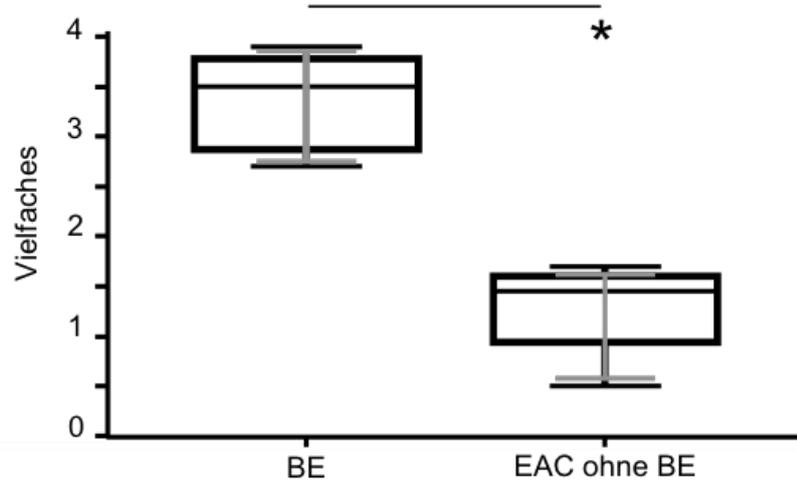


Abbildung 8: LgR5-Genexpression (mRNA) in dem mit einem Adenokarzinom assoziierten Barrett-Epithel (BE) und in den Adenokarzinomen ohne Barrett-Epithel (EAC ohne BE) als Vielfaches der Expression in normalem Ösophagusepithel. Die grauen Linien markieren die 95 %-Konfidenzintervalle. Der Asterisk (*) markiert eine signifikante Abweichung.

3.2.2 Ergebnisse der Zellkultur für das LgR5-Gen

Die Ergebnisse der an der OE-33-Adenokarzinom-Zelllinie durchgeführten RT-PCR zeigten eine im Vergleich zu normaler plattenepithelialer Mukosa um den Faktor 4,8 erhöhte LgR5-Expression. Sie waren damit gut mit den anhand der Resektate gewonnenen Ergebnissen vereinbar.

3.3 Zusammenhang von LgR5-Expression und Proliferation (Ki-67+)

Um Informationen über den Proliferationsstatus LgR5-positiver Zellen und über eine mögliche Assoziation der LgR5-Expression mit krebsinitiierenden Zellen zu erhalten, wurden an den Serienschnitten IF-Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen LgR5 und gegen den Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt. Die Zellen ließen sich entsprechend ihrem Färbeverhalten in vier Fraktionen unterteilen:

Die erste Fraktion beinhaltete Zellen, die sowohl LgR5- als auch Ki-67-positiv waren (LgR5+/Ki-67+). Diese Zellen machten nur einen kleinen Anteil (< 5 %) der LgR5-positiven Zellen aus (Abbildung 9). Eine Koexpression wurde vor allem in Bereichen gefunden, die anhand von Cdx2-Färbungen an Serienschnitten als Bereiche mit Barrett-Epithel identifiziert worden waren. Abbildung 9a zeigt die Koexpression der beiden Marker in einem repräsentativen Beispiel der n = 41 Adenokarzinome mit Barrett-Epithel. Abbildung 9b zeigt die Verteilung in den OE-33-Zellen, wo ein vergleichbares Muster festgestellt wurde.

Bei den meisten LgR5-positiven Zellen war die Kernfärbung mit dem Proliferationsmarker negativ (LgR5+/Ki-67-). Diese Zellen stellten die zweite Fraktion dar. Daraus wird gefolgert, dass die meisten LgR5-positiven Zellen nicht proliferieren.

Die dritte Fraktion bestand aus einer dominanten Population von proliferierenden Zellen, die keine Expression von LgR5 aufwiesen (LgR5-/Ki-67+) (Abbildung 9a). Proliferierende Zellen befanden sich selten in Bereichen mit Tumorgewebe (Adenokarzinome sowohl mit als auch ohne Barrett-Epithel), woraus sich auf eine Herunterregulation in diesen Bereichen schließen lässt. Nichtsdestotrotz waren wenige proliferierende Zellen in Cdx2-negativen Bereichen zu finden.

3 Ergebnisse

Die vierte, größte Zellfraktion beinhaltet die Zellen, die weder LgR5-Positivität noch Proliferationsaktivität (LgR5-/Ki-67-) aufwiesen. Diese Zellen sind nicht Bestandteil der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit.

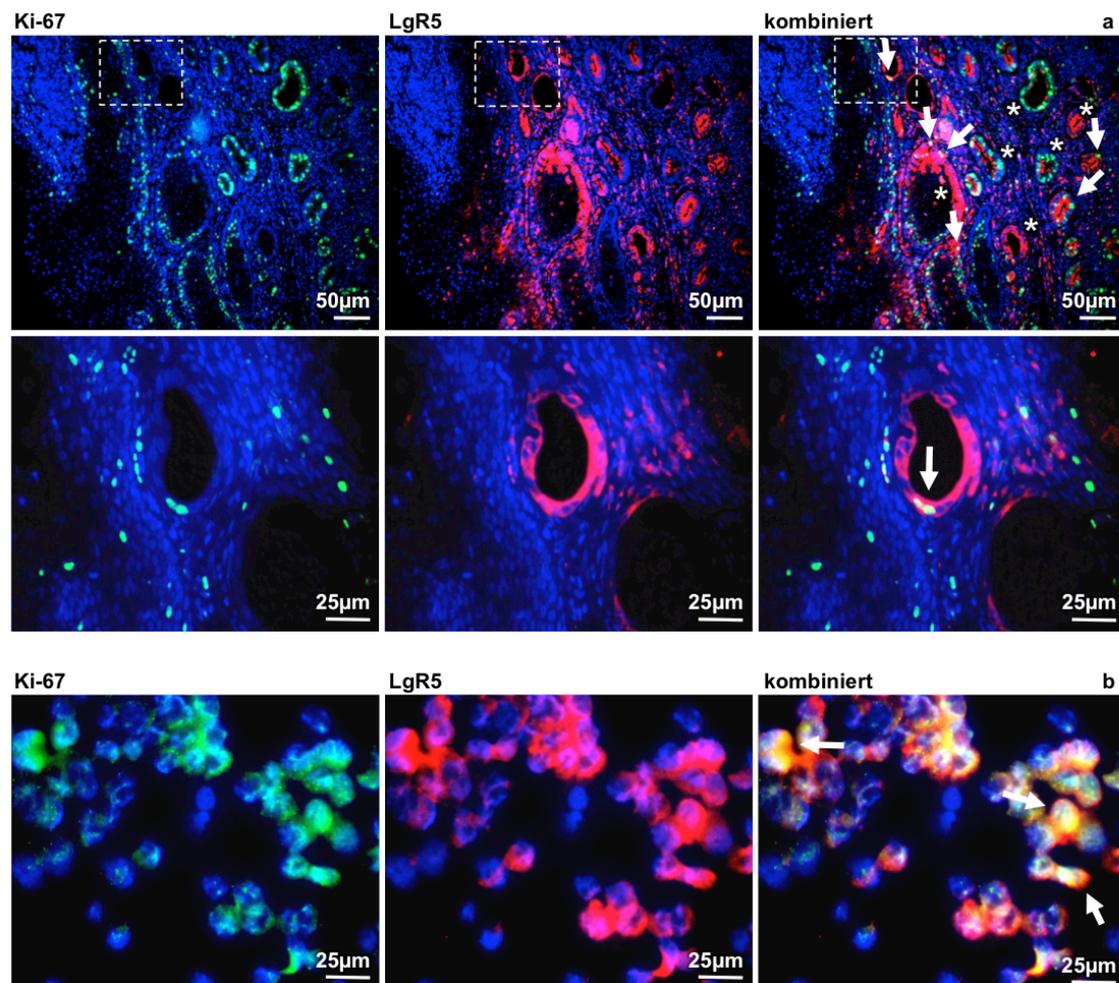


Abbildung 9: Koexpression von LgR5 und Ki-67 in BE (a) und OE-33 (b) in Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen. (a) Wenige zugleich LgR5- und Ki-67-positive Zellen (Pfeile), viele zugleich LgR5-negative und Ki-67-positive Zellen (*) sowie zugleich LgR5-positive und Ki-67-negative Zellen (*). Unten jeweils vergrößerte Ausschnitte. (b) Proliferierende sowohl Ki-67- als auch LgR5-positive Zellen (Pfeile). grün: FITC (Fluoresceinisothiocyanat), rot: Cy3 und blau: DAPI (4'6-Diamidino-2-phenylindodihydrochlorid).

3.4 Zusammenhang von LgR5-Expression und Überleben

Es wurde untersucht, welche statistischen Zusammenhänge zwischen verschiedenen Tumormerkmalen und dem Überleben der Patienten nach

erfolgreicher (R0) kurativer Resektion des ösophagealen Adenokarzinoms bestehen. In einer univariaten Analyse aller Adenokarzinome (n = 60) wurde gezeigt, dass Lymphknotenmetastasen (N+, p < 0,0001; Hazard Ratio (HR) 12,1940; 95 %-KI 5,9509-24,9867), pT-Kategorie (pT3/4, p < 0,0001, HR 3,8447; 95 %-KI 1,5309-9,6553) und Grading (G3/4, p < 0,0001; HR 4,0652; 95 %-KI 1,7123-9,6514) Faktoren für eine ungünstige Prognose sind.

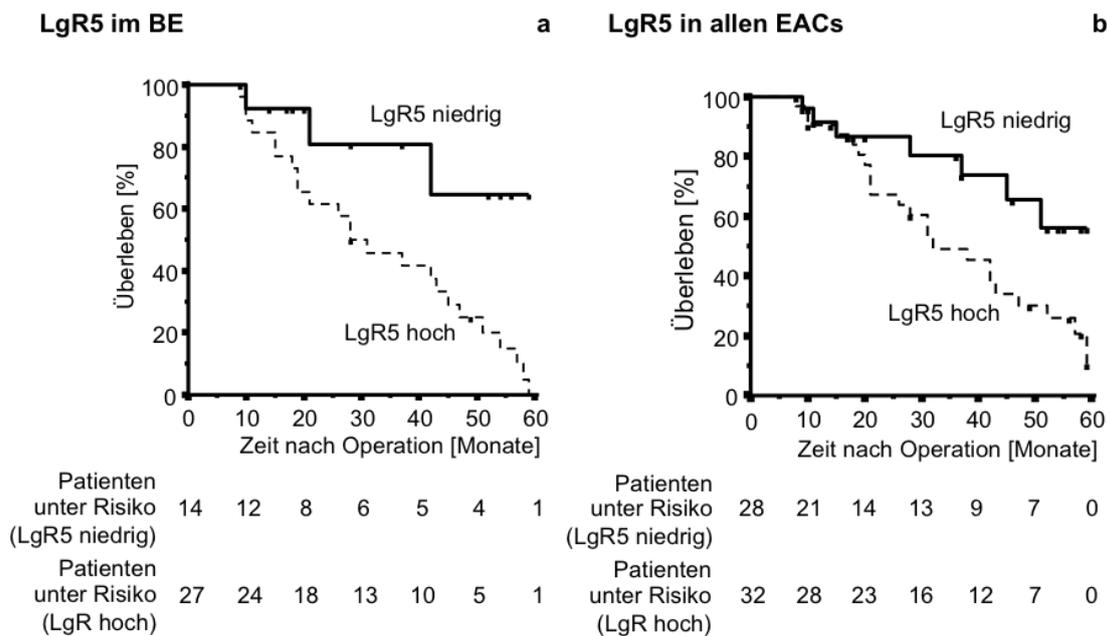


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Überlebenskurven. (a) Adenokarzinome mit Barrett-Epithel (EAC mit BE). (b) alle Adenokarzinome (EAC). Die kurzen vertikalen Linien kennzeichnen die Zeiten der zensierten Daten.

Um eine mögliche Korrelation der LgR5-Expression mit dem Überleben aufzuzeigen, wurden die Patienten in Gruppen mit niedriger und hoher LgR5-Expression eingeteilt (siehe Kapitel 2.5). Das Überleben in der Untergruppe mit hoher LgR5-Expression im Barrett-Epithel (n = 41, p = 0,0278, HR 3,5145, 95 %-KI 1,5050-8,2073, Abbildung 10a), im angrenzenden Adenokarzinom (n = 41, p = 0,0390, HR 2,8408, 95 %-KI 1,2496-6,4582) und in allen Adenokarzinomen (n = 60, p = 0,0325, HR 2,4175, 95 %-KI 1,1719-4,9872,

Abbildung 10b) war signifikant schlechter im Vergleich zur Untergruppe der Patienten mit einer niedrigen LgR5-Expression (Tabelle 4 und Tabelle 5). Diese Daten lassen vermuten, dass eine LgR5-Expression im Barrett-Epithel und im angrenzenden Adenokarzinom mit klinisch-pathologischen Charakteristiken vergesellschaftet ist, die möglicherweise ein schlechteres klinisches Outcome der zugehörigen (benachbarten) Adenokarzinome vorhersagen.

Multivariate Analysen mit dem Cox Proportional Hazard Model zeigen, dass Lymphknotenmetastasen und Grading, nicht aber die LgR5-Expression unabhängige prognostische Faktoren in allen Adenokarzinomen (n = 60) sind (Lymphknotenmetastasen: Exp(b) 9,1861; 95 %-KI von Exp(b) 2,0665-40,8346; p = 0,003746. Grading G3/4: Exp(b) 2,2593; 95 %-KI von Exp(b) 1,0171-5,0186; p = 0,4643).

4 Diskussion

Anhand der IF-Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen LgR5, dem mutmaßlichen Stammzellmarker für Krebsstammzellen des Barrett-Karzinoms, sowie Antikörpern gegen Ki-67, einem Proliferationsmarker, wurden drei unterschiedliche Zellpopulationen identifiziert:

Der erste, relativ große Teil beinhaltete Zellen, die LgR5 exprimieren und nicht proliferieren (LgR5+ / Ki-67-). Bei diesen Zellen könnte es sich um ruhende Stammzellen, um ruhende Krebsstammzellen oder um postmitotisch entdifferenzierte Zellen handeln, die die Fähigkeit zur Proliferation verloren haben.

Bei der zweiten Subpopulation handelte es sich um Zellen, die den mutmaßlichen Stammzellmarker LgR5 exprimieren und gleichzeitig proliferieren (LgR5+ / Ki-67+). Ca. 5 % der Zellen des Barrett-Epithels wiesen diese beiden Merkmale gleichzeitig auf. Sollte LgR5 neben der Verwendung als Marker für intestinale Stammzellen auch dazu geeignet sein, Krebsstammzellen zu identifizieren, könnte es sich hierbei um aktiv proliferierende ösophageale Barrett- bzw. Krebsstammzellen handeln.

Die dritte Subpopulation beinhaltete Zellen, die keine Expression von LgR5, jedoch eine aktive Proliferation aufzeigten (LgR5- / Ki-67+). Ein größerer Anteil solcher Zellen fand sich einerseits in Arealen mit Adenokarzinom, andererseits in Bereichen mit Barrett-Epithel. Falls LgR5 (Krebs-)Stammzellen markieren sollte, dann würde diese Fraktion normale, LgR5-negative Zellen beinhalten, von denen einige dennoch proliferierten. Dieses Ergebnis spricht gegen die Annahme, dass die Tumormasse alleine durch Krebsstammzellen unterhalten wird, und lässt sich eher mit dem Modell der klonalen Selektion vereinbaren.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die Karzinogenese des ösophagealen Adenokarzinoms eine Kombination aus dem Modell der klonalen Selektion und dem Modell der Krebsstammzellen zutreffen könnte, so wie es

auch schon von anderen Autoren vorgeschlagen wurde (Abbildung 11, Erweiterung zur Abbildung 2, Seite 12) (Melchor et al. 2008; Visvader et al. 2008). Diese Modelle schließen sich nicht gegenseitig aus. Bei der Entstehung einer Krebsstammzelle aus einer gesunden Zelle muss die Ursprungszelle genetische Veränderungen durchlaufen. Für Leukämie-Stammzellen etwa wurde ein genetisches Rearrangement gezeigt (Barabe et al. 2007). Auch wäre es möglich, dass Krebsstammzellen selbst den Weg einer klonalen Selektion durchlaufen und durch diesen Mechanismus von sich verschiedene, neue und eventuell dominantere Krebsstammzellen bilden können, wenn eine Mutation aggressivere Fähigkeiten bezüglich Selbsterneuerung oder Wachstum generiert (Visvader et al. 2008). Die Populationen der unterschiedlichen Krebsstammzellen könnten nebeneinander existieren und zur Heterogenität des Tumors beitragen (Marotta et al. 2009). Der Nachweis von proliferierenden, LgR5-negativen Zellen schließt die Stammzellhypothese damit nicht aus.

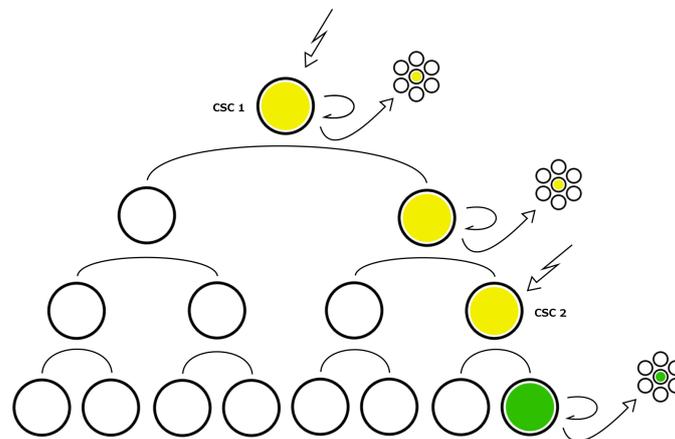


Abbildung 11: Kombination des Modells der klonalen Selektion und des Modells der Krebsstammzellen zur Karzinogenese. (Modifiziert nach Visvader et al. 2008)

Die Resultate der vorliegenden Arbeit sind im Gegenteil gut vereinbar mit gegenwärtigen Krebsmodellen, die eine Verknüpfung der Krebsstammzell-Hypothese mit dem Modell der klonalen Selektion vorschlagen (Melchor et al. 2008; Visvader et al. 2008). Einige generelle Charakteristika von Karzinomen

lassen sich gut mit dem Modell der klonalen Selektion in Einklang bringen: So gilt die genetische Instabilität als „Wegbereiter für die Krebsentstehung“ (Hanahan et al. 2000), und Eigenschaften wie Monoklonalität, unbegrenzte Proliferationskapazität und Tumorerogenität können dadurch erklärt werden, dass sich Tumoren aus einzelnen Zellen entwickeln und verschiedene Veränderungen durchlaufen, wobei die jeweils potentesten Zellen selektiert werden (Merlo et al. 2006; Campbell et al. 2007).

In unserer Arbeit ermittelten wir einen Anteil von LgR5-positiven Zellen zwischen 13 und 33 %. Für viele anderen Tumorentitäten, bei denen die Stammzellhypothese etabliert ist, wird eine sehr große Spannbreite für den prozentualen Anteil von Krebsstammzellen angegeben (s. Tabelle 2, Seite 13). Bei Aussagen über den Krebsstammzellanteil muss beachtet werden, dass die Identifikation der Zellen schwierig ist und die Marker noch unausgereift und teilweise recht unspezifisch sind. Aufgrund dessen muss davon ausgegangen werden, dass die als Krebsstammzellen betrachtete Population nicht rein ist und neben Krebsstammzellen andere Zellarten enthalten kann. Das erklärt mit die weite Spannbreite der Ergebnisse (Visvader et al. 2008). Zudem scheinen die Ergebnisse durch die unterschiedlichen Techniken, z. B. bei der Transplantation der Tumorzellen, beeinflusst zu werden (Quintana et al. 2008). Ebenso wenig ist geklärt, ob die Fähigkeiten und Eigenschaften der Krebsstammzellen zeitlich konstant bleiben oder ob sie sich im Laufe der Entwicklung des Tumors eventuell verändern. Das exakte molekulare Profil der Krebsstammzellen ist noch nicht bekannt (Marotta et al. 2009). Es wird vermutet, dass der Anteil der Krebsstammzellen, auch bei verschiedenen Tumoren des gleichen Typs, tatsächlich variieren kann (Visvader et al. 2008). Die Spannweite unserer Werte der LgR5-positiven Zellen liegt in einem Größenbereich, der auch für Krebsstammzellen anderer Tumorentitäten beschrieben ist (Tabelle 2, Seite 13) (Visvader et al. 2008). Die relative Anzahl der LgR5-positiven Zellen passt demnach zu der Annahme, dass es sich dabei um Krebsstammzellen handeln könnte.

Die Expression von LgR5 in Bezug auf das ösophageale Adenokarzinom wurde bisher in einer Studie untersucht (Becker et al. 2010). In dieser wurde die LgR5-Expression im Biopsiematerial bzw. Resektaten mit Barrett-Ösophagus, Dysplasien und Adenokarzinomen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Studie weichen teilweise von unseren Ergebnissen ab. Unterschiede finden sich unter anderem bezüglich des Anteils der LgR5-positiven Gewebeproben. Wir untersuchten in unserer Arbeit zum einen die Expression von LgR5 insgesamt auf den Gewebeschnitten, zum anderen differenzierten wir anschließend zwischen der Expression im Adenokarzinom selbst und der im angrenzenden Barrett-Epithel. Diese genaue Unterscheidung ist in der anderen Arbeit nicht ersichtlich, so dass anzunehmen ist, dass die angegebenen Werte der LgR5-Expression im Karzinom entsprechen. In der anderen Arbeit wurde in allen 26 Proben mit Adenokarzinomen eine LgR5-Expression nachgewiesen. In unseren Experimenten lag der Anteil bei 85 % (51 von 60 Proben). Möglicherweise sind die unterschiedlichen Ergebnisse durch die unterschiedliche Größe der Stichproben oder andere Kriterien bei der Auswahl der Gewebeproben bedingt. Vielleicht liegen die Unterschiede auch an unterschiedlichen Bindungseigenschaften der LgR5-Antikörper, den die andere Arbeitsgruppe von einem anderem Hersteller bezogen hat (MBL International Co., Woburn, MA, USA; wir: Abcam, Cambridge, UK).

Ein weiterer Unterschied im Vergleich der Ergebnisse ergibt sich bei der prozentualen Anzahl der LgR5-positiven Zellen. So schwankte dieser Wert bei der anderen Gruppe zwischen Proben mit wenigen verstreuten LgR5-positiven Zellen und Proben, wo über 90 % der Zellen LgR5 exprimierten. In unseren Experimenten beträgt der Anteil LgR5-positiver Zellen zwischen 13 und 33 %. Die Autoren beschreiben nicht, wie die Auswertung erfolgte. Unsere Auszählung erfolgte jeweils in sechs „high-power fields“. Die Auswertung nur eines kleinen Bereiches würde zu einer höheren Spannweite der Ergebnisse führen, was eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Resultate wäre. Zusätzlich kann eine für Tumoren typische Heterogenität in der Genexpression (Easwaran et al. 2014) zu diesen Unterschieden beitragen.

In der anderen Arbeit ist eine sich verstärkende Intensität der LgR5-Expression in der Folge Barrett-Epithel – intraepitheliale Neoplasie – Karzinom beschrieben (Becker et al. 2010). In unseren immunhistochemischen Färbungen war die Expression im Barrett-Epithel signifikant höher als im Karzinom. Der methodische Unterschied ist, dass wir nur Barrett-Epithel untersucht haben, an das ein Adenokarzinom angrenzte, in der anderen Arbeit jedoch auch Probiopsien mit alleinigem Barrett-Epithel untersucht wurden. So ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse nur eingeschränkt möglich. Wenn man jedoch davon ausgeht, dass sich das Karzinom aus dem angrenzenden Barrett-Epithel entwickelt hat und die LgR5-Expression in diesem konstant ist, wären die Ergebnisse nicht konkordant. Unsere Ergebnisse postulieren eine Herunterregulation von LgR5 im Adenokarzinom.

Konkordant zu den Resultaten unserer Arbeit sind die Ergebnisse einer anderen Arbeit, die die Tumorgenese des Endometriumkarzinoms untersuchte. Hier wurde in den Initialstadien eine Hochregulation von LgR5 gezeigt, wohingegen für vollständig entwickelte Tumoren eine Herunterregulation von LgR5 beschrieben wurde (Sun et al. 2009).

Eine Expression des anderen mutmaßlichen Stammzellmarkers DCAMKL-1 wurde im ösophagealen Adenokarzinom, sowohl mit als auch ohne Barrett-Epithel, als auch im angrenzenden Barrett-Epithel nicht nachgewiesen. Die immunhistochemischen Färbungen waren durchweg negativ. Kontrollfärbungen mit demselben Marker an Kolonschleimhaut waren erfolgreich, so dass eine Fehlfunktion des Markers ausgeschlossen war. Auf eine weitere Untersuchung auf Genebene mittels RT-PCR und auf die Untersuchung in Zellkulturen wurde daher verzichtet. Zu gegensätzlichen Ergebnissen kam eine andere Arbeit, wo im Barrettepithel und im Barrettkarzinom eine im Vergleich zur normalen Ösophaguskukosa erhöhte Expression von DCAMKL-1 nachgewiesen wurde (Vega et al. 2012). Im Vergleich unserer Arbeit mit der anderen konnten keine Unterschiede in der Methodik der Immunfluoreszenzfärbungen festgestellt werden. Für unsere Färbungen bezüglich DCAMKL-1 und LgR5 verwendeten wir bis auf den unterschiedlichen Antikörper das gleiche Färbeprotokoll. Die

LgR5-Färbungen lieferten positive Ergebnisse, so dass von einem generellen Funktionieren unseres Färbeprotokolls ausgegangen werden muss. Auch bezüglich des gefärbten Materials ist kein Unterschied zu erkennen, da auch die andere Arbeitsgruppe ihre Färbungen an humanem Ösophagusgewebe durchführte. Die diskordanten Ergebnisse können letztendlich nicht erklärt werden. Es könnte die Vermutung aufgestellt werden, dass DCAMKL-1 nur in manchen Barrettkarzinomen exprimiert wird. Dann wäre es jedoch als zuverlässiger Stammzellmarker ungeeignet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass DCAMKL-1 nicht dazu geeignet ist, eine spezielle Zellpopulation, insbesondere Krebsstammzellen, im ösophagealen Adenokarzinom und im Barrett-Epithel zu identifizieren.

Im ösophagealen Plattenepithelkarzinom wurde wie vermutet weder eine Expression von LgR5 noch von DCAMKL-1 gefunden. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da diese Tumorentität nicht von einem intestinalen (glandulären) Epithel abstammt.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass zumindest ein Teil der proliferierenden Zellpopulation aus LgR5-positiven Zellen besteht. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit der Annahme, dass nur eine Minderheit der Zellen im Barrett-Epithel zur Proliferation fähig ist und somit zur Vergrößerung der Zellpopulation beitragen kann. Die daraus entstehenden Zellen besitzen jedoch eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit. Eine solche Situation würde der normalen hämatopoetischen Proliferation entsprechen, wo nur eine Minderheit innerhalb der Population, nämlich die Stammzellen, proliferiert und für einen großen Bestand an Nachkommen sorgt, von denen die meisten ihre Stammzeleigenschaften verlieren.

Die Rolle des LgR5 in der Tumorgenese ist nicht bekannt. Generell ist bei den meisten bekannten Stammzellmarkern nicht klar, ob sie eine Funktion bei der Zellregulation besitzen, auch da keiner der Marker exklusiv von Krebsstammzellen exprimiert wird (Visvader et al. 2008). Mehrere Studien haben sich bereits mit der Expression von LgR5 im Kontext von Tumorentstehung und -progression beschäftigt. Eine verstärkte Expression

wurde in diversen Tumorentitäten gezeigt, was auf eine Involvierung in die Tumorentstehung und die Tumorprogression schließen lassen könnte. Dazu zählen das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) (Yamamoto et al. 2003), das Basalzellkarzinom (Tanese et al. 2008), das kolorektale Karzinom, das Ovarialkarzinom (McClanahan et al. 2006) und das Endometriumkarzinom (Sun et al. 2009). Interessant ist hierbei die Tatsache, dass LgR5 sowohl in den Stammzellen des Kryptenepithels (Vorläuferzellen) als auch in prämaligen, zu Karzinomen führenden Veränderungen gefunden wurde (Barker et al. 2009; Brabletz et al. 2009).

Die Beteiligung von LgR5 an für die Karzinogenese relevanten Signalwegen sowie die verstärkte Expression in diversen anderen Tumorentitäten könnte eine kausale Beteiligung auch bei der Pathogenese des ösophagealen Adenokarzinoms vermuten lassen. Eine chronische Aktivierung von LgR5 in den mutmaßlich pluripotenten krebsinitiierenden Zellen innerhalb des Barrett-Epithels könnte Entzündungsreaktionen aufrecht erhalten, zu einer Resistenz gegenüber Apoptose führen und eine weitere Progression der Sequenz von einer Metaplasie über eine intraepitheliale Neoplasie zum Karzinom begünstigen. Eine inflammatorische Mikroumgebung (micro environment) scheint für Zellen des ösophagealen Adenokarzinoms und Zellen des Barrett-Epithels von großer Bedeutung zu sein (Hill 2006; Wicha et al. 2006).

Unsere Ergebnisse zeigen einen ungünstigen Effekt der LgR5-Expression bezüglich des Überlebens auf. In einer univariaten Analyse der immun-histochemischen Färbungen und somit auf Proteinebene wurde gezeigt, dass Patienten mit einem hohen Prozentsatz an LgR5-positiven Zellen (> 33 %) eine schlechtere Prognose aufweisen verglichen mit Patienten mit einem niedrigeren Prozentsatz LgR5-positiver Zellen. Dieser Effekt wurde für alle Patienten mit ösophagealem Adenokarzinom gezeigt, die im Rahmen unserer Studie untersucht wurden. Unser Ergebnis bezüglich des prognostischen Effekts stimmt mit den Ergebnissen einer anderen Gruppe überein (Becker et al. 2010).

Sollte LgR5 wie vermutet Krebsstammzellen markieren, so wäre ein höherer Anteil an Krebsstammzellen mit einem schlechteren Überleben assoziiert, ein

Zusammenhang, wie er z. B. auch für das Gliom vermutet wird (Zeppernick et al. 2008). In dieser Studie war eine hohe Expression des Stammzellmarkers CD133 mit einem schlechteren Überleben assoziiert, und der Anteil der CD133-positiven Zellen schien ein unabhängiger Risikofaktor für ein Tumorrezidiv zu sein. Auch diese Konkordanz gibt einen Hinweis darauf, dass LgR5 tatsächlich als Marker für Krebsstammzellen dienen könnte.

Mehrere Pfade, u. a. der Wnt-Signalweg, und Gene, die für eine normale Stammzellfunktion benötigt werden, sind in Krebsstammzellen aktiviert und spielen eine essentielle Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Tumoren (Reya et al. 2005). Es gibt klare genetische Beweise, dass der Wnt-Signalweg bei der Regulation der epithelialen Stammzellen im Intestinaltrakt beteiligt ist (Korinek et al. 1998; Shackleton et al. 2006). LgR5 als Zielgen des Wnt-Stammzell-Pfades könnte eine biologische Rolle in diesen womöglich krebsinitiierenden Zellen innerhalb des Barrett-Epithels spielen. Die im Vergleich zum Karzinomgewebe erhöhte LgR5-Expression im Barrett-Epithel könnte die Annahme eines kausalen Zusammenhangs zwischen LgR5-Expression und Entzündung stützen. Daher könnte das therapeutische Anvisieren des LgR5-Signalwegs ein mächtiger Mechanismus sein, diesen entzündungsvermittelten Effekt bei der Tumorprogression außer Kraft zu setzen.

Zusätzlich zum ungünstigen prognostischen Effekt der LgR5-Expression in den Karzinomen fanden wir bei der Analyse der Ergebnisse Hinweise darauf, dass die LgR5-Expression im mit den Adenokarzinomen assoziierten Barrett-Epithel einen ähnlich ungünstigen prognostischen Effekt auf das Überleben der Patienten hat. Dieses Ergebnis wurde noch nicht beschrieben und könnte durch einen als „field cancerization“ (Gazdar et al. 2009) bedingten Effekt interpretiert werden, wonach die Zellen in einem Bereich, der karzinogenen Einflüssen ausgesetzt ist, leichter entarten können. Möglicherweise geht eine erhöhte LgR5-Expression im benachbarten Barrett-Ösophagus mit einer erhöhten zellulären karzinogenen Tendenz einher, die mit einem schlechteren Überleben assoziiert ist.

In unserer Arbeit unterschieden wir zwischen Adenokarzinomen mit und ohne Barrett-Epithel. Die Daten wurden dahingehend analysiert, ob sich mögliche Hinweise auf die Rolle des Barrett-Epithels in der Karzinogenese des distalen Ösophaguskarzinoms ergeben. Das geschah in Hinblick auf die Zweifel, ob der Barrett-Ösophagus einen obligaten Zwischenschritt darstellt (Jamieson 2007) (siehe Kap. 1.2.2).

Bei ca. einem Drittel der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Adenokarzinome war histopathologisch keine Barrett-Mukosa nachweisbar. Andere Arbeiten geben den Anteil der ösophagealen Adenokarzinome ohne Barrett-Epithel zwischen ca. 10 und 60 % an (Tabelle 6). Erklärungsversuche dafür bieten entweder mögliche Ursachen dafür an, weshalb die Barrett-Mukosa – nach ursprünglichem Vorhandensein – nicht mehr nachgewiesen wird, oder sie argumentieren damit, dass von vornherein keine Barrett-Mukosa vorhanden war und dass diese ösophagealen Adenokarzinome unabhängig von einem Barrett-Ösophagus entstanden sind. Diese Karzinome haben dann möglicherweise auch eine andere Pathogenese als die Karzinome mit Barrett-Epithel.

Tabelle 6: Anteil der ösophagealen Adenokarzinome, neben denen kein Barrett-Epithel gefunden wurde.

Karzinome insgesamt	davon ohne Barrett-Epithel	in Prozent	Arbeit
38	5	13 %	(Chandrasoma et al. 2007)
189	71	38 %	(Lagergren et al. 1999)
178	112	63 %	(Sabel et al. 2000)
121	44	36 %	(Zhang et al. 2005)
60	19	32 %	unsere Arbeit

Zum einen wäre es möglich, dass die Karzinome, bei denen kein Barrett-Epithel gefunden wurde, zwar auf dem Boden eines solchen entstanden sind, sie dieses aber im Laufe der Tumorprogression vollständig „überwuchert“ haben,

so dass es jetzt nicht mehr nachweisbar ist (Cameron et al. 1995; Chandrasoma et al. 2007). Gestützt wird diese Argumentation durch Ergebnisse, wonach bei größeren und invasiveren Tumoren seltener Barrett-Epithel nachgewiesen wird als bei kleineren, weniger invasiven (Sabel et al. 2000; Chandrasoma et al. 2007). Außerdem wurden spezielle Proteine, die normalerweise im Darm und nicht im Ösophagus, jedoch im Barrett-Epithel gefunden werden, auch in Adenokarzinomen ohne Barrett-Epithel nachgewiesen (Mendes de Almeida et al. 1997). Das spricht dafür, dass hier initial ein Barrett-Ösophagus vorgelegen hatte. Ein weiteres Argument für diese Hypothese liefern die Ergebnisse einer Arbeit, wo der Anteil der Karzinome, neben denen Barrett-Epithel nachgewiesen wurde, nach einer neoadjuvanten Chemotherapie von 75 % auf 97 % gestiegen war (Theisen et al. 2002). Dieses Ergebnis wurde so interpretiert, dass durch die neoadjuvante Therapie ein vorher vom Tumor „überwuchertes“ Barrett-Epithel demaskiert worden war.

Eine andere Erklärung für die Karzinome ohne Barrett-Epithel wäre, dass sie in Wahrheit aus sehr kleinen Spots eines (möglicherweise ultra-kurzstreckigen) Barrett-Epithels hervorgegangen sind, die aufgrund ihrer geringen Größe schwer identifizierbar sind und daher übersehen wurden. Wie im Fall einer Überwucherung würde es sich auch in diesem Fall bei den als Adenokarzinome ohne Barrett-Epithel klassifizierten Tumoren in Wahrheit um Adenokarzinome mit Barrett-Epithel handeln.

Unsere Daten zeigten bezüglich der Expression von LgR5 im ösophagealen Adenokarzinom keinen Unterschied zwischen Karzinomen mit und ohne Barrett-Epithel. Das Expressionsmuster von LgR5 im Barrett-Epithel war vergleichbar mit dem in den Adenokarzinomen mit und ohne Barrett-Mukosa. Bezüglich der LgR5-Expression ließ sich also kein Unterschied zwischen den Adenokarzinomen, neben denen Barrett-Epithel nachgewiesen wurde, und den Adenokarzinomen, neben denen kein Barrett-Epithel gefunden wurde, feststellen. Unsere Daten legen also nahe, dass diese Unterscheidung irrelevant ist.

Hinweise darauf, ob für die Entstehung eines ösophagealen Adenokarzinoms eine Barrett-Mukosa notwendig ist, ergaben sich nicht. Es wäre genauso gut denkbar, dass alle Adenokarzinome unabhängig von dieser mutmaßlichen Präkanzerose entstanden sind. Beweise für diesen Erklärungsversuch sind natürlich sehr schwer zu erbringen, dennoch darf diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden. Die dem ösophagealen Adenokarzinom zugrundeliegende Pathophysiologie wäre dann unabhängig von einer Barrett-Mukosa und es müssten andere Faktoren, die zur Tumorgenese beitragen, gefunden werden. Einen Ansatz hierfür liefert die Stammzellhypothese, nach der für die Entwicklung eines ösophagealen Adenokarzinoms einzelne, pluripotente Zellen ursächlich sind. Der Ursprung von Krebsstammzellen ist nicht geklärt. In der Diskussion stehen normale Stammzellen, die in so gut wie allen Geweben vorkommen (Hombach-Klonisch et al. 2008), die im Laufe der Zeit zu Krebsstammzellen mutieren. Gestützt wird diese These dadurch, dass auch auf Krebsstammzellen anderer Tumorentitäten mit normalen Stammzellen assoziierte Marker wie CD133 (Mizrak et al. 2008) und ALDH1 (Douville et al. 2009) exprimiert werden und beide ähnliche epigenetische Profile, Profile bei der Genexpression und aktivierte Signalwege wie Notch, Hedgehog und Wnt zu besitzen scheinen (Marotta et al. 2009). Es wäre aber auch denkbar, dass sich Krebsstammzellen von Progenitorzellen, die einen stammzellähnlichen Phänotyp besitzen, oder von weiter differenzierten Zellen, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung wiedererlangt haben, ableiten (Jordan et al. 2006; Visvader et al. 2008). Auch wenn der Ursprung von Krebsstammzellen unbekannt ist – in jedem Fall wäre dadurch die Karzinogenese des ösophagealen Adenokarzinoms unabhängig vom Barrett-Ösophagus erklärt.

Unsere fast identischen Ergebnisse in Hinblick auf die Expression von LgR5 in den Adenokarzinomen mit und ohne Barrett-Epithel lassen eine Gemeinsamkeit der beiden Gruppen zumindest in dieser Beziehung vermuten und müssen hier eher als Argument dafür gesehen werden, dass, falls LgR5 bzw. LgR5-exprimierende Zellen eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese der Tumoren spielen, bei der Erforschung der Pathogenese nicht zwischen Adenokarzinomen mit und ohne Barrett-Epithel unterschieden werden sollte.

Diese Gemeinsamkeit liefert jedoch weder ein Argument für noch gegen die ursächliche Bedeutung des Barrett-Epithels als Präkanzerose. Auch falls tatsächlich alle ösophagealen Adenokarzinome auf dem Boden eines Barrett-Epithels entstehen, was ja nicht geklärt ist, so ist der kausale Zusammenhang zwischen Barrett-Epithel und Karzinom nicht bewiesen. Die Assoziation beweist nicht die ätiologische Notwendigkeit in der Tumorgenese des ösophagealen Adenokarzinoms. Sie könnte andere Gründe haben, allem voran das gemeinsame Vorliegen zweier unabhängiger Erkrankungen aufgrund vieler gemeinsamer Risikofaktoren wie der gastroösophagealen Refluxkrankheit (Lundell 2010; Spechler 2011) und der Adipositas (Kubo et al. 2006; Whiteman et al. 2008).

Möglicherweise ist die Prävalenz des Barrett-Ösophagus mit 1 % viel zu niedrig geschätzt. Die Angaben in der Literatur schwanken beträchtlich, auch weil die Diagnose aufgrund der fehlenden Symptomatik oft nur im Rahmen von Endoskopien, die aus anderen Gründen durchgeführt werden, gestellt wird (Phillips et al. 2011). In einer Studie wurde bei asymptomatischen Patienten sogar eine Prävalenz von 25 % gefunden (Gerson et al. 2002), worauf über einen „Barrett-Eisberg“ spekuliert wurde (Shaheen 2002). Je höher die Prävalenz des Barrett-Epithels jedoch ist, desto weniger Schlüsse ließen sich aus einem gemeinsamen Vorliegen von Barrett-Epithel und Adenokarzinom in Bezug auf einen kausalen Zusammenhang ziehen. Das nur sehr seltene „Fortschreiten“ eines Barrett-Ösophagus zum Karzinom (Hvid-Jensen et al. 2011) wäre durch den großen Inzidenzunterschied erklärt; vice versa wäre es eher unwahrscheinlich, dass das seltene Adenokarzinom – gerade bei vielen gleichen Risikofaktoren – in einem Ösophagus ohne Barrett-Epithel entsteht.

Nicht nur die Inzidenz des Barrett-Karzinoms ist in den letzten Jahrzehnten deutlich gestiegen (Pohl et al. 2005), es war auch ein deutlicher Inzidenzanstieg des Barrett-Ösophagus zu verzeichnen. Diese muss zwar sicherlich zum Teil durch eine erhöhte Rate an Endoskopien verstanden werden, ist zum Teil aber als echt zu werten (van Soest et al. 2005; Phillips et al. 2011). Es wäre möglich, dass dabei ein kausaler Zusammenhang besteht. Genauso gut aber könnten

beide Inzidenzanstiege auf eine Zunahme der Prävalenz gemeinsamer Risikofaktoren in der Bevölkerung zurückzuführen sein. So stieg die Anzahl an Patienten mit gastroösophagealer Refluxkrankheit (El-Serag 2007), dem Hauptrisikofaktor für das ösophageale Adenokarzinom (Lundell 2010) und den Barrett-Ösophagus (Spechler 2011), und auch die Adipositas, ein weiterer Risikofaktor für beide Krankheiten (Kubo et al. 2006; Whiteman et al. 2008), nimmt weltweit zu (Calle et al. 2004). Eine Risikoerhöhung durch Tabakrauchen ist zwar nur für den Barrett-Ösophagus sicher geklärt (Smith et al. 2009), wird aber teilweise auch für das ösophageale Adenokarzinom vermutet (Tramacere et al. 2011). Der über die letzten Jahrzehnte gestiegene Tabakkonsum (Gammon et al. 1997) könnte mit ein weiterer Grund für beide – möglicherweise unabhängigen – Inzidenzanstiege sein. Eine konkordant gerichtete Häufigkeitsentwicklung muss also nicht kausal bedingt sein, sondern kann dem Einfluss gleicher Risikofaktoren geschuldet sein.

Möglicherweise können durch den Marker LgR5 Tumorzellen identifiziert werden, die Schlüsseleigenschaften von Stammzellen haben (Wicha et al. 2006; Becker et al. 2008; Souza et al. 2008; May et al. 2009; Becker et al. 2010) und die dann mitverantwortlich für das Tumorwachstum, die Metastasierung und für Rezidive wären. Aus dem Nachweis von Krebsstammzellen ergeben sich Konsequenzen für die Tumorthherapie. Dabei müssen insbesondere die Mechanismen geklärt werden, die der erhöhten Resistenz (Li et al. 2008) zugrunde liegen und die bisher unzureichend verstanden sind. Es wurde unter anderem gezeigt, dass Krebsstammzellen im Vergleich zu normalen Gewebezellen ein effizienteres DNA-Reparatursystem besitzen (Bao et al. 2006), vermehrt multi-drug-resistant(MDR)-Proteine synthetisieren (Johnstone et al. 1999) und Medikamente schneller enzymatisch eliminieren können (Marotta et al. 2009). Für eine stabile Remission ist eine Eradikation der Krebsstammzellen obligat. Neue Therapien müssen etabliert werden, um Krebsstammzellen gezielt ausschalten zu können. Eine Schwierigkeit dabei ist, normale Stammzellen, mit denen sie viele Eigenschaften teilen, zu verschonen. Zur Zeit vielversprechend erscheinen sogenannte „small molecules“, die direkt krebssstammzellspezifische Proteine

angreifen können. Modellbeispiel hierfür ist der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib, der in der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie erfolgreich eingesetzt wird (Savage et al. 2002). Als Target für eine mögliche Therapie mit „small molecules“ kommt die Inhibition der CaMK (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase) in Frage (Sossey-Alaoui et al. 1999; Tirupathi et al. 2000; Fabian et al. 2005). Die Forschung nach solchen Therapien steckt noch in den Kinderschuhen. Die langfristigen Folgen sind noch nicht bekannt, Daten über die Spezifität und mögliche Nebenwirkungen müssen erst erforscht werden. Weiterhin müssen für die Entwicklung spezifischer Therapien weitere, sicherere Marker für Krebsstammzellen evaluiert werden (Klonisch et al. 2008).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression zweier intestinaler Stammzellmarker, LgR5 und DCAMKL-1, im ösophagealen Adenkarzinom mit und ohne Barrett-Ösophagus in Bezug auf die Stammzellhypothese untersucht.

Die Untersuchungen fanden an chirurgischen Resektaten und an ösophagealen Adenokarzinomzellen der Zelllinie OE-33 statt. Die Gewebeproben waren bei Operationen zur primären Entfernung von Ösophaguskarzinomen gewonnen worden und stammten von Patienten, die keine neoadjuvante antineoplastische Therapie erhalten hatten. Wurde auf den Gewebeschnitten neben dem Karzinomgewebe Barrett-Mukosa identifiziert, wurde das Karzinom als „Adenokarzinom mit Barrett-Epithel“ („EAC mit BE“; n = 41) klassifiziert, anderenfalls als „Adenokarzinom ohne Barrett-Epithel“ („EAC ohne BE“; n = 19). Die Identifikation der Barrett-Mukosa fand mikroskopisch und immunhistologisch (Marker: Cdx2) statt.

Zur Expressionsanalyse führten wir immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen LgR5 und DCAMKL-1 durch. Analysen auf Genebene fanden mittels RT-PCR statt. Es wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit LgR5 und dem Proliferationsmarker Ki-67 angefertigt. Die Ergebnisse wurden mit dem Tumorstadium und den 5-Jahres-Überlebensraten korreliert.

Eine LgR5-Expression wurde in 35 der 41 (85 %) Adenokarzinome mit Barrett-Epithel und in 16 der 19 (84 %) Adenokarzinome ohne Barrett-Epithel gefunden. Der Anteil der LgR5-positiven Zellen lag bei den Adenokarzinomen mit Barrett Epithel bei 15 %, im angrenzenden Barrett-Epithel bei 32 % und bei den Adenokarzinomen ohne Barrett-Epithel bei 13 %. Karzinome mit und ohne Barrett-Epithel wiesen damit eine nicht signifikant unterschiedliche LgR5-Expression auf. Die Expression im Barrett-Epithel war im Vergleich dazu erhöht. Die Ergebnisse der RT-PCR auf mRNA-Ebene bestätigten die im Vergleich zum

Adenokarzinomgewebe höhere LgR5-Expression im Barrett-Epithel ($p = 0,0159$). Für DCAMKL-1 zeigten sich durchweg negative Färbeergebnisse.

Mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen LgR5 und Ki-67 ließen sich drei Zellpopulationen identifizieren: LgR5-positive, nicht proliferierende Zellen (LgR5+ / Ki-67-), LgR5-negative, proliferierende Zellen (LgR5- / Ki-67+) und wenige proliferierende, LgR5-positive Zellen (LgR5+ / Ki-67+). Bei der kleinen Subpopulation LgR5-positiver, proliferierender Zellen könnte es sich um Krebsstammzellen handeln. Die proliferierenden, LgR5-negativen Zellen können eher mit dem Modell der klonalen Selektion erklärt werden. Unsere Ergebnisse scheinen daher gut zu dem aktuellen Verständnis der Pathogenese des ösophagealen Adenokarzinoms zu passen, wobei das Modell der klonalen Selektion mit der Hypothese der Krebsstammzellen kombiniert wird. Eine höhere LgR5-Expression war in der univariaten Analyse mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Patienten mit einem hohen Prozentsatz an LgR5-positiven Zellen wiesen eine schlechtere Prognose auf verglichen mit Patienten mit einem niedrigeren Prozentsatz LgR5-positiver Zellen. Dieser Zusammenhang gilt für Zellen sowohl im Karzinomgewebe als auch im Barrett-Epithel.

Wir haben gezeigt, dass der intestinale Stammzellmarker LgR5 – im Gegensatz zu DCAMKL-1 – im ösophagealen Adenokarzinom exprimiert wird. Die Expression scheint unabhängig vom Vorhandensein einer Barrett-Mukosa zu sein. Möglicherweise ist eine höhere Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Unsere Ergebnisse sind mit einem Modell für die Pathogenese des ösophagealen Adenokarzinoms vereinbar, das auf Krebsstammzellen basiert. LgR5 könnte dabei helfen, diese zu identifizieren. Das Aufzeigen neuer Ansatzpunkte für zielgerichtete Therapien könnte dabei helfen, neue wirksame Methoden zur Behandlung des ösophagealen Adenokarzioms zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden unter „Lgr5 expression and cancer stem cell hypothesis: clue to define the true origin of esophageal adenocarcinomas with and without Barrett's esophagus? (Von Rahden et al., *J Exp Clin Cancer Res.* 2011 Feb 23;30:23)“ veröffentlicht.

- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(7): 3983-3988.
- Anderson, L. A., B. T. Johnston, et al. (2006). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the esophageal inflammation-metaplasia-adenocarcinoma sequence." *Cancer research* 66(9): 4975-4982.
- Avidan, B., A. Sonnenberg, et al. (2002). "Hiatal hernia size, Barrett's length, and severity of acid reflux are all risk factors for esophageal adenocarcinoma." *Am J Gastroenterol* 97(8): 1930-1936.
- Bajpai, M., J. Liu, et al. (2008). "Repeated exposure to acid and bile selectively induces colonic phenotype expression in a heterogeneous Barrett's epithelial cell line." *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 88(6): 643-651.
- Bao, S., Q. Wu, et al. (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." *Nature* 444(7120): 756-760.
- Barabe, F., J. A. Kennedy, et al. (2007). "Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice." *Science* 316(5824): 600-604.
- Barker, N., R. A. Ridgway, et al. (2009). "Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer." *Nature* 457(7229): 608-611.
- Barker, N., J. H. van Es, et al. (2007). "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5." *Nature* 449(7165): 1003-1007.
- Barrett, N. R. (1957). "The lower esophagus lined by columnar epithelium." *Surgery* 41(6): 881-894.
- Becker, L., Q. Huang, et al. (2008). "Immunostaining of Lgr5, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue." *ScientificWorldJournal* 8: 1168-1176.
- Becker, L., Q. Huang, et al. (2010). "Lgr5, an intestinal stem cell marker, is abnormally expressed in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma." *Dis Esophagus* 23(2): 168-174.
- Behrens, A., O. Pech, et al. (2011). "Barrett's adenocarcinoma of the esophagus: better outcomes through new methods of diagnosis and treatment." *Deutsches Arzteblatt international* 108(18): 313-319.
- Birnie, R., S. D. Bryce, et al. (2008). "Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions." *Genome Biol* 9(5): R83.
- Blaser, M. J. (2006). "Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases." *EMBO Rep* 7(10): 956-960.
- Blaser, M. J. (2008). "Disappearing microbiota: Helicobacter pylori protection against esophageal adenocarcinoma." *Cancer prevention research* 1(5): 308-311.
- Bonnet, D. und J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." *Nature medicine* 3(7): 730-737.
- Brabletz, S., O. Schmalhofer, et al. (2009). "Gastrointestinal stem cells in development and cancer." *J Pathol* 217(2): 307-317.
- Brown, L. M., S. S. Devesa, et al. (2008). "Incidence of adenocarcinoma of the esophagus among white Americans by sex, stage, and age." *Journal of the National Cancer Institute* 100(16): 1184-1187.
- Bullwinkel, J., B. Baron-Luhr, et al. (2006). "Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells." *J Cell Physiol* 206(3): 624-635.

- Calle, E. E. und M. J. Thun (2004). "Obesity and cancer." *Oncogene* 23(38): 6365-6378.
- Cameron, A. J., C. T. Lomboy, et al. (1995). "Adenocarcinoma of the esophagogastric junction and Barrett's esophagus." *Gastroenterology* 109(5): 1541-1546.
- Cameron, A. J., B. J. Ott, et al. (1985). "The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus." *N Engl J Med* 313(14): 857-859.
- Campbell, F., W. V. Bogomoletz, et al. (2000). *Diagnostic Histopathology of Tumors*, Churchill Livingstone.
- Campbell, L. L. und K. Polyak (2007). "Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution?" *Cell Cycle* 6(19): 2332-2338.
- Chak, A., T. Lee, et al. (2002). "Familial aggregation of Barrett's oesophagus, oesophageal adenocarcinoma, and oesophagogastric junctional adenocarcinoma in Caucasian adults." *Gut* 51(3): 323-328.
- Chandrasoma, P., K. Wickramasinghe, et al. (2007). "Is intestinal metaplasia a necessary precursor lesion for adenocarcinomas of the distal esophagus, gastroesophageal junction and gastric cardia?" *Dis Esophagus* 20(1): 36-41.
- Chang, E. Y., C. D. Morris, et al. (2007). "The effect of antireflux surgery on esophageal carcinogenesis in patients with barrett esophagus: a systematic review." *Ann Surg* 246(1): 11-21.
- Cohnheim, J. (1875). "Congenitales, quergestreiftes Muskelsarkom der Nieren." *Virchows Archiv* 65(1): 64-69-69.
- Cook, M. B., N. J. Shaheen, et al. (2012). "Cigarette smoking increases risk of Barrett's esophagus: an analysis of the Barrett's and Esophageal Adenocarcinoma Consortium." *Gastroenterology* 142(4): 744-753.
- Corley, D. A. und P. A. Buffler (2001). "Oesophageal and gastric cardia adenocarcinomas: analysis of regional variation using the Cancer Incidence in Five Continents database." *International journal of epidemiology* 30(6): 1415-1425.
- Corley, D. A., A. Kubo, et al. (2008). "Helicobacter pylori infection and the risk of Barrett's oesophagus: a community-based study." *Gut* 57(6): 727-733.
- Cox, D. R. (1972). "Regression Models and Life-Tables." *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 34(2): 33.
- Croagh, D., W. A. Phillips, et al. (2007). "Identification of candidate murine esophageal stem cells using a combination of cell kinetic studies and cell surface markers." *Stem Cells* 25(2): 313-318.
- Dalerba, P., S. J. Dylla, et al. (2007). "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(24): 10158-10163.
- Dent, J., H. B. El-Serag, et al. (2005). "Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review." *Gut* 54(5): 710-717.
- Devesa, S. S., W. J. Blot, et al. (1998). "Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States." *Cancer* 83(10): 2049-2053.
- Douville, J., R. Beaulieu, et al. (2009). "ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells." *Stem cells and development* 18(1): 17-25.
- Earlam, R. und J. R. Cunha-Melo (1980). "Oesophageal squamous cell carcinomas: II. A critical view of radiotherapy." *Br J Surg* 67(7): 457-461.
- Easwaran, H., H. C. Tsai, et al. (2014). "Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance." *Mol Cell* 54(5): 716-727.
- Eda, A., H. Osawa, et al. (2003). "Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa." *J Gastroenterol* 38(1): 14-22.
- El-Serag, H. B. (2007). "Time trends of gastroesophageal reflux disease: a systematic review." *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 5(1): 17-26.
- El-Serag, H. B., A. C. Mason, et al. (2002). "Epidemiological differences between adenocarcinoma of the oesophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia in the USA." *Gut* 50(3): 368-372.
- Engel, L. S., W. H. Chow, et al. (2003). "Population attributable risks of esophageal and gastric cancers." *Journal of the National Cancer Institute* 95(18): 1404-1413.
- Eramo, A., F. Lotti, et al. (2008). "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." *Cell Death Differ* 15(3): 504-514.

- Fabian, M. A., W. H. r. Biggs, et al. (2005). "A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors." *Nat Biotechnol* 23(3): 329-336.
- Fiorica, F., D. Di Bona, et al. (2004). "Preoperative chemoradiotherapy for oesophageal cancer: a systematic review and meta-analysis." *Gut* 53(7): 925-930.
- Gammon, M. D., J. B. Schoenberg, et al. (1997). "Tobacco, alcohol, and socioeconomic status and adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia." *J Natl Cancer Inst* 89(17): 1277-1284.
- Gazdar, A. F. und J. D. Minna (2009). "Multifocal lung cancers--clonality vs field cancerization and does it matter?" *J Natl Cancer Inst* 101(8): 541-543.
- GebSKI, V., B. Burmeister, et al. (2007). "Survival benefits from neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy in oesophageal carcinoma: a meta-analysis." *The lancet oncology* 8(3): 226-234.
- Gerson, L. B., R. Edson, et al. (2001). "Use of a simple symptom questionnaire to predict Barrett's esophagus in patients with symptoms of gastroesophageal reflux." *The American journal of gastroenterology* 96(7): 2005-2012.
- Gerson, L. B., K. Shetler, et al. (2002). "Prevalence of Barrett's esophagus in asymptomatic individuals." *Gastroenterology* 123(2): 461-467.
- Grotenhuis, B. A., W. N. Dinjens, et al. (2010). "Barrett's oesophageal adenocarcinoma encompasses tumour-initiating cells that do not express common cancer stem cell markers." *The Journal of pathology* 221(4): 379-389.
- Hamilton, S. R. und L. A. Aaltonen (2000). *Pathology and Genetics. Tumours of the Digestive System*.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- HepPner, G. H. und B. E. Miller (1983). "Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences." *Cancer metastasis reviews* 2(1): 5-23.
- Hermann, P. C., S. L. Huber, et al. (2007). "Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer." *Cell Stem Cell* 1(3): 313-323.
- Hill, R. P. (2006). "Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven." *Cancer Res* 66(4): 1891-1895; discussion 1890.
- Holmes, R. S. und T. L. Vaughan (2007). "Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer." *Seminars in radiation oncology* 17(1): 2-9.
- Hombach-Klonisch, S., S. Panigrahi, et al. (2008). "Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications." *Journal of molecular medicine* 86(12): 1301-1314.
- Hulscher, J. B., J. W. van Sandick, et al. (2002). "Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the esophagus." *N Engl J Med* 347(21): 1662-1669.
- Hvid-Jensen, F., L. Pedersen, et al. (2011). "Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus." *N Engl J Med* 365(15): 1375-1383.
- Islami, F. und F. Kamangar (2008). "Helicobacter pylori and esophageal cancer risk: a meta-analysis." *Cancer Prev Res (Phila)* 1(5): 329-338.
- Islami, F., F. Kamangar, et al. (2009). "Use of proton pump inhibitors and risk of progression of Barrett's esophagus to neoplastic lesions." *Am J Gastroenterol* 104(10): 2646-2648.
- Jaks, V., N. Barker, et al. (2008). "Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells." *Nature genetics* 40(11): 1291-1299.
- Jamieson, G. G. (2007). "Antireflux surgery, barrett esophagus, and adenocarcinoma: there is still room for doubt." *Ann Surg* 246(1): 22-23.
- Jeon, J., E. G. Luebeck, et al. (2006). "Age effects and temporal trends in adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia (United States)." *Cancer Causes Control* 17(7): 971-981.
- Jin, G., V. Ramanathan, et al. (2009). "Inactivating cholecystikinin-2 receptor inhibits progastrin-dependent colonic crypt fission, proliferation, and colorectal cancer in mice." *J Clin Invest* 119(9): 2691-2701.
- Johnstone, R. W., E. Cretney, et al. (1999). "P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death." *Blood* 93(3): 1075-1085.
- Jordan, C. T., M. L. Guzman, et al. (2006). "Cancer stem cells." *N Engl J Med* 355(12): 1253-1261.

- Kaklamanos, I. G., G. R. Walker, et al. (2003). "Neoadjuvant treatment for resectable cancer of the esophagus and the gastroesophageal junction: a meta-analysis of randomized clinical trials." *Ann Surg Oncol* 10(7): 754-761.
- Kaplan, E. L. und P. Meier (1958). "Nonparametric Estimation from Incomplete Observations." *Journal of the American Statistical Association* 53(282): 25.
- Klonisch, T., E. Wiechec, et al. (2008). "Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications." *Trends in molecular medicine* 14(10): 450-460.
- Korinek, V., N. Barker, et al. (1998). "Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4." *Nat Genet* 19(4): 379-383.
- Kubo, A., G. Block, et al. (2009). "Effects of dietary fiber, fats, and meat intakes on the risk of Barrett's esophagus." *Nutrition and cancer* 61(5): 607-616.
- Kubo, A. und D. A. Corley (2006). "Body mass index and adenocarcinomas of the esophagus or gastric cardia: a systematic review and meta-analysis." *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 15(5): 872-878.
- Lagergren, J., R. Bergstrom, et al. (1999). "Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma." *N Engl J Med* 340(11): 825-831.
- Lagergren, J., W. Ye, et al. (2010). "The risk of esophageal adenocarcinoma after antireflux surgery." *Gastroenterology* 138(4): 1297-1301.
- Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." *Nature* 367(6464): 645-648.
- Lee, A., J. D. Kessler, et al. (2005). "Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum." *Nat Neurosci* 8(6): 723-729.
- Leedham, S. J., S. L. Preston, et al. (2008). "Individual crypt genetic heterogeneity and the origin of metaplastic glandular epithelium in human Barrett's oesophagus." *Gut* 57(8): 1041-1048.
- Li, C., D. G. Heidt, et al. (2007). "Identification of pancreatic cancer stem cells." *Cancer research* 67(3): 1030-1037.
- Li, X., M. T. Lewis, et al. (2008). "Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy." *Journal of the National Cancer Institute* 100(9): 672-679.
- Lin, P. T., J. G. Gleason, et al. (2000). "DCAMKL1 encodes a protein kinase with homology to doublecortin that regulates microtubule polymerization." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20(24): 9152-9161.
- Liu, T., X. Zhang, et al. (2007). "Regulation of Cdx2 expression by promoter methylation, and effects of Cdx2 transfection on morphology and gene expression of human esophageal epithelial cells." *Carcinogenesis* 28(2): 488-496.
- Locke, G. R., 3rd, N. J. Talley, et al. (1999). "Risk factors associated with symptoms of gastroesophageal reflux." *Am J Med* 106(6): 642-649.
- Lofdahl, H. E., Y. Lu, et al. (2013). "Risk factors for esophageal adenocarcinoma after antireflux surgery." *Ann Surg* 257(4): 579-582.
- Lundell, L. R. (2010). "Etiology and risk factors for esophageal carcinoma." *Dig Dis* 28(4-5): 641-644.
- Mamidanna, R., A. Bottle, et al. (2012). "Short-term outcomes following open versus minimally invasive esophagectomy for cancer in England: a population-based national study." *Ann Surg* 255(2): 197-203.
- Marotta, L. L. und K. Polyak (2009). "Cancer stem cells: a model in the making." *Current opinion in genetics & development* 19(1): 44-50.
- Matsuzaki, J., H. Suzuki, et al. (2011). "Etiological difference between ultrashort- and short-segment Barrett's esophagus." *J Gastroenterol* 46(3): 332-338.
- May, R., T. E. Riehl, et al. (2008). "Identification of a novel putative gastrointestinal stem cell and adenoma stem cell marker, doublecortin and CaM kinase-like-1, following radiation injury and in adenomatous polyposis coli/multiple intestinal neoplasia mice." *Stem Cells* 26(3): 630-637.
- May, R., S. M. Sureban, et al. (2009). "Doublecortin and CaM kinase-like-1 and leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor mark quiescent and cycling intestinal stem cells, respectively." *Stem Cells* 27(10): 2571-2579.

- McClanahan, T., S. Koseoglu, et al. (2006). "Identification of overexpression of orphan G protein-coupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors." *Cancer Biol Ther* 5(4): 419-426.
- Melchor, L. und J. Benitez (2008). "An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes." *Carcinogenesis* 29(8): 1475-1482.
- Mendes de Almeida, J. C., P. Chaves, et al. (1997). "Is Barrett's esophagus the precursor of most adenocarcinomas of the esophagus and cardia? A biochemical study." *Ann Surg* 226(6): 725-733; discussion 733-725.
- Merlo, L. M., J. W. Pepper, et al. (2006). "Cancer as an evolutionary and ecological process." *Nature reviews. Cancer* 6(12): 924-935.
- Mizrak, D., M. Brittan, et al. (2008). "CD133: molecule of the moment." *The Journal of pathology* 214(1): 3-9.
- Moehler, M., S. E. Al-Batran, et al. (2011). "[German S3-guideline "Diagnosis and treatment of esophagogastric cancer"]." *Z Gastroenterol* 49(4): 461-531.
- Moons, L. M., D. A. Bax, et al. (2004). "The homeodomain protein CDX2 is an early marker of Barrett's oesophagus." *J Clin Pathol* 57(10): 1063-1068.
- Nguyen, A. M., C. G. Luke, et al. (2003). "Comparative epidemiological characteristics of oesophageal adenocarcinoma and other cancers of the oesophagus and gastric cardia." *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 4(3): 225-231.
- Nguyen, D. M., H. B. El-Serag, et al. (2009). "Medication usage and the risk of neoplasia in patients with Barrett's esophagus." *Clin Gastroenterol Hepatol* 7(12): 1299-1304.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." *Science* 194(4260): 23-28.
- O'Brien, C. A., A. Pollett, et al. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." *Nature* 445(7123): 106-110.
- Omloo, J. M., S. M. Lagarde, et al. (2007). "Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the mid/distal esophagus: five-year survival of a randomized clinical trial." *Ann Surg* 246(6): 992-1000; discussion 1000-1001.
- Pandeya, N., G. Williams, et al. (2009). "Alcohol consumption and the risks of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus." *Gastroenterology* 136(4): 1215-1224, e1211-1212.
- Pech, O., E. Bollschweiler, et al. (2011). "Comparison between endoscopic and surgical resection of mucosal esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus at two high-volume centers." *Ann Surg* 254(1): 67-72.
- Pech, O., A. May, et al. (2006). "The impact of endoscopic ultrasound and computed tomography on the TNM staging of early cancer in Barrett's esophagus." *The American journal of gastroenterology* 101(10): 2223-2229.
- Pera, M., C. Manterola, et al. (2005). "Epidemiology of esophageal adenocarcinoma." *J Surg Oncol* 92(3): 151-159.
- Phillips, R. W., H. F. Frierson, Jr., et al. (2003). "Cdx2 as a marker of epithelial intestinal differentiation in the esophagus." *Am J Surg Pathol* 27(11): 1442-1447.
- Phillips, W. A., R. V. Lord, et al. (2011). "Barrett's esophagus." *Journal of gastroenterology and hepatology* 26(4): 639-648.
- Pohl, H. und H. G. Welch (2005). "The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence." *J Natl Cancer Inst* 97(2): 142-146.
- Powell, J., C. C. McConkey, et al. (2002). "Continuing rising trend in oesophageal adenocarcinoma." *Int J Cancer* 102(4): 422-427.
- Prince, M. E., R. Sivanandan, et al. (2007). "Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(3): 973-978.
- Quigley, D. A., M. D. To, et al. (2009). "Genetic architecture of mouse skin inflammation and tumour susceptibility." *Nature* 458(7237): 505-508.
- Quintana, E., M. Shackleton, et al. (2008). "Efficient tumour formation by single human melanoma cells." *Nature* 456(7222): 593-598.
- Reya, T. und H. Clevers (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." *Nature* 434(7035): 843-850.

- Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* 414(6859): 105-111.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." *Nature* 445(7123): 111-115.
- Ronkainen, J., P. Aro, et al. (2005). "Prevalence of Barrett's esophagus in the general population: an endoscopic study." *Gastroenterology* 129(6): 1825-1831.
- Rudolph, R. E., T. L. Vaughan, et al. (2000). "Effect of segment length on risk for neoplastic progression in patients with Barrett esophagus." *Ann Intern Med* 132(8): 612-620.
- Sabel, M. S., K. Pastore, et al. (2000). "Adenocarcinoma of the esophagus with and without Barrett mucosa." *Arch Surg* 135(7): 831-835; discussion 836.
- Savage, D. G. und K. H. Antman (2002). "Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy." *The New England journal of medicine* 346(9): 683-693.
- Schatton, T., G. F. Murphy, et al. (2008). "Identification of cells initiating human melanomas." *Nature* 451(7176): 345-349.
- Scholzen, T. und J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *J Cell Physiol* 182(3): 311-322.
- Segditsas, S., O. Sieber, et al. (2008). "Putative direct and indirect Wnt targets identified through consistent gene expression changes in APC-mutant intestinal adenomas from humans and mice." *Hum Mol Genet* 17(24): 3864-3875.
- Shackleton, M., F. Vaillant, et al. (2006). "Generation of a functional mammary gland from a single stem cell." *Nature* 439(7072): 84-88.
- Shaheen, N. (2002). "Is there a 'Barrett's iceberg?'" *Gastroenterology* 123(2): 636-639.
- Shaheen, N. J. (2005). "Should we worry about the length of Barrett's esophagus?" *Gastrointest Endosc* 62(5): 682-685.
- Shaheen, N. J., M. A. Crosby, et al. (2000). "Is there publication bias in the reporting of cancer risk in Barrett's esophagus?" *Gastroenterology* 119(2): 333-338.
- Shaheen, N. J. und J. E. Richter (2009). "Barrett's oesophagus." *Lancet* 373(9666): 850-861.
- Siewert, J. R. und H. J. Stein (1998). "Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction." *Br J Surg* 85(11): 1457-1459.
- Siewert, J. R., H. J. Stein, et al. (2001). "Histologic tumor type is an independent prognostic parameter in esophageal cancer: lessons from more than 1,000 consecutive resections at a single center in the Western world." *Ann Surg* 234(3): 360-367; discussion 368-369.
- Siewert, R. J., M. Feith, et al. (2000). "Adenocarcinoma of the esophagogastric junction: results of surgical therapy based on anatomical/topographic classification in 1,002 consecutive patients." *Ann Surg* 232(3): 353-361.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* 432(7015): 396-401.
- Sjoquist, K. M., B. H. Burmeister, et al. (2011). "Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis." *Lancet Oncol* 12(7): 681-692.
- Smith, K. J., S. M. O'Brien, et al. (2009). "Current and past smoking significantly increase risk for Barrett's esophagus." *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 7(8): 840-848.
- Sobin, L. H. und C. Wittekind (2002). *TNM Classification of Malignant Tumors*. Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer.
- Sossey-Alaoui, K. und A. K. Srivastava (1999). "DCAMKL1, a brain-specific transmembrane protein on 13q12.3 that is similar to doublecortin (DCX)." *Genomics* 56(1): 121-126.
- Souza, R. F., K. Krishnan, et al. (2008). "Acid, bile, and CDX: the ABCs of making Barrett's metaplasia." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295(2): G211-218.
- Spechler, S. J. (1997). "Short and ultrashort Barrett's esophagus--what does it mean?" *Semin Gastrointest Dis* 8(2): 59-67.
- Spechler, S. J. (2002). "Clinical practice. Barrett's Esophagus." *N Engl J Med* 346(11): 836-842.
- Spechler, S. J. (2011). "Barrett's esophagus: Clinical issues." *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America* 21(1): 1-7.
- Steevens, J., A. A. Botterweck, et al. (2010). "Trends in incidence of oesophageal and stomach cancer subtypes in Europe." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 22(6): 669-678.

- Stein, H. J., B. H. von Rahden, et al. (2005). "Survival after oesophagectomy for cancer of the oesophagus." *Langenbecks Arch Surg* 390(4): 280-285.
- Sun, X., L. Jackson, et al. (2009). "In pursuit of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-5 regulation and function in the uterus." *Endocrinology* 150(11): 5065-5073.
- Tanese, K., M. Fukuma, et al. (2008). "G-protein-coupled receptor GPR49 is up-regulated in basal cell carcinoma and promotes cell proliferation and tumor formation." *Am J Pathol* 173(3): 835-843.
- Theisen, J., H. J. Stein, et al. (2002). "Preoperative chemotherapy unmasks underlying Barrett's mucosa in patients with adenocarcinoma of the distal esophagus." *Surg Endosc* 16(4): 671-673.
- Tirupathi, C., W. Yan, et al. (2000). "G protein-coupled receptor kinase-5 regulates thrombin-activated signaling in endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13): 7440-7445.
- Tramacere, I., C. La Vecchia, et al. (2011). "Tobacco smoking and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma: a meta-analysis." *Epidemiology* 22(3): 344-349.
- Tumorzentrum Regensburg (2013). Jahresbericht 2013. <http://www.tumorzentrum-regensburg.de/pdf/Jahresbericht2013TumorzentrumRegensburg.pdf>, abgerufen am 11.12.13.
- Vallbohmer, D., S. R. DeMeester, et al. (2006). "Cdx-2 expression in squamous and metaplastic columnar epithelia of the esophagus." *Dis Esophagus* 19(4): 260-266.
- van Baal, J. W., A. Bozikas, et al. (2008). "Cytokeratin and CDX-2 expression in Barrett's esophagus." *Scand J Gastroenterol* 43(2): 132-140.
- van Baal, J. W. und K. K. Krishnadath (2008). "High throughput techniques for characterizing the expression profile of Barrett's esophagus." *Dis Esophagus* 21(7): 634-640.
- van Soest, E. M., J. P. Dieleman, et al. (2005). "Increasing incidence of Barrett's oesophagus in the general population." *Gut* 54(8): 1062-1066.
- Vaughan, T. L., S. Davis, et al. (1995). "Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4(2): 85-92.
- Vega, K. J., R. May, et al. (2012). "Identification of the putative intestinal stem cell marker doublecortin and CaM kinase-like-1 in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma." *J Gastroenterol Hepatol* 27(4): 773-780.
- Vieth, M., C. Ell, et al. (2004). "Histological analysis of endoscopic resection specimens from 326 patients with Barrett's esophagus and early neoplasia." *Endoscopy* 36(9): 776-781.
- Visvader, J. E. und G. J. Lindeman (2008). "Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions." *Nat Rev Cancer* 8(10): 755-768.
- Vizcaino, A. P., V. Moreno, et al. (2002). "Time trends incidence of both major histologic types of esophageal carcinomas in selected countries, 1973-1995." *Int J Cancer* 99(6): 860-868.
- von Rahden, B. und H. Stein (2007). "Barrett's esophagus and Barrett's carcinoma." *Current GERD Reports* 1(2): 125-132.
- von Rahden, B. H., M. Scheurlen, et al. (2012). "[Newly recognized side-effects of proton pump inhibitors. Arguments in favour of fundoplication for GERD?]." *Chirurg* 83(1): 38-44.
- von Rahden, B. H., J. Theisen, et al. (2013). "For patients with early esophageal cancer endoscopic mucosa resection is not the end of the story!" *Ann Surg* 257(6): e20-21.
- Wagener, C. und O. Müller (2009). *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*, Thieme.
- Wang, K. K. und R. E. Sampliner (2008). "Updated guidelines 2008 for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus." *The American journal of gastroenterology* 103(3): 788-797.
- Whiteman, D. C., S. Sadeghi, et al. (2008). "Combined effects of obesity, acid reflux and smoking on the risk of adenocarcinomas of the oesophagus." *Gut* 57(2): 173-180.
- Wicha, M. S., S. Liu, et al. (2006). "Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift." *Cancer Res* 66(4): 1883-1890; discussion 1895-1886.
- Yamamoto, Y., M. Sakamoto, et al. (2003). "Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations." *Hepatology* 37(3): 528-533.
- Yang, Z. F., D. W. Ho, et al. (2008). "Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer." *Cancer Cell* 13(2): 153-166.

- Ye, W., W. H. Chow, et al. (2001). "Risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia in patients with gastroesophageal reflux diseases and after antireflux surgery." *Gastroenterology* 121(6): 1286-1293.
- Yu, F., H. Yao, et al. (2007). "let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells." *Cell* 131(6): 1109-1123.
- Zeppernick, F., R. Ahmadi, et al. (2008). "Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14(1): 123-129.
- Zhang, H. Y., S. J. Spechler, et al. (2009). "Esophageal adenocarcinoma arising in Barrett esophagus." *Cancer Lett* 275(2): 170-177.
- Zhang, S., C. Balch, et al. (2008). "Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors." *Cancer research* 68(11): 4311-4320.
- Zhang, X., D. I. Watson, et al. (2005). "Outcome of oesophagectomy for adenocarcinoma of the oesophagus and oesophagogastric junction." *ANZ J Surg* 75(7): 513-519.

7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Gastroösophagealer Übergang. (a) Physiologische Situation. (b) Barrett-Ösophagus mit oralwärts verschobener Z-Linie. (Modifiziert nach Spechler 2002).....6
- Abbildung 2: Übersicht über die beiden Modelle der Karzinogenese. (a) Modell der klonalen Selektion. (b) Modell der Krebsstammzellen. (Modifiziert nach Visvader et. al 2008) ... 12
- Abbildung 3: Vereinfachtes Schema zum entzündungsvermittelnden Signalweg G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR) durch PGE-2 als auch zu „stammzelltypischen Signalwegen“ (LgR5 und DCAMKL-1). Sowohl GPCR als auch DCAMKL-1 aktivieren entscheidende Signalelemente der Karzinogenese. Pfeile zeigen aktivierende Modifikation. G-Protein, Guaninnucleotid-bindendes Protein; PGE-2, Prostaglandin E2; GPCR, G-protein coupled receptor; LgR5, leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5; DCAMKL-1, Doublecortin and Calmodulin-Kinase-Like-1; PLC, Phospholipase C; IP3, Inositoltrisphosphat; CaMK, Calcium/Calmodulin-dependent kinase; PKA, Proteinkinase A; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; CREB, cAMP response element-binding protein; Cdx2, Caudal type homeobox transcription factor 2; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; PKC, Proteinkinase C; NfκB, Nuclear factor Kappa B. 16
- Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung von LgR5 in Kolonschleimhaut. Membranöses Färbemuster (braun). Normale Kolonmukosa (*) zeigte das typische Färbemuster für mutmaßliche Stammzellen der Schleimhaut in den vermuteten Stammzellnischen (Pfeile). (a) 200fache und (b) 400fache Vergrößerung. 29
- Abbildung 5: LgR5-Expression im Barrett-Ösophagus (BE), im Adenokarzinom mit (EAC mit BE) und ohne Barrett-Epithel (EAC ohne BE) sowie im Plattenepithelkarzinom (ESCC) als Prozentsatz aller ausgezählten Zellen. Die grauen Linien markieren die 95 %-Konfidenzintervalle. Sternchen (*) markieren signifikante Abweichungen von der Expression im Barrett-Epithel..... 30
- Abbildung 6: Expression von LgR5 im Barrett-Epithel. (a) Erhöhte LgR5-Expression im Barrett-Epithel (Pfeile). Angrenzendes normales Gewebe wird nicht angefärbt (*). (b) Zur Verifizierung des Barrett-Epithels durchgeführte Doppelfärbung mit Cdx2 (nukleäres Färbemuster, Fast Red) und LgR5 (membranöses Färbemuster, braun). (c) Signifikant ($p < 0,05$) niedrigere LgR5-Expression in den Karzinomen in mutmaßlichen Stammzellnischen an der Basis der EACs (Pfeile), 200fache Vergrößerung. 31
- Abbildung 7: LgR5-Färbung in Zytospins der OE-33-Zelllinie. (a) 25 % positive Zellen. (b) Keine Anfärbung nach vorheriger Inkubation in LgR5-Blocking-Peptid. 34
- Abbildung 8: LgR5-Genexpression (mRNA) in dem mit einem Adenokarzinom assoziierten Barrett-Epithel (BE) und in den Adenokarzinomen ohne Barrett-Epithel (EAC ohne BE)

- als Vielfaches der Expression in normalem Ösophagusepithel. Die grauen Linien markieren die 95 %-Konfidenzintervalle. Der Asterisk (*) markiert eine signifikante Abweichung.....35
- Abbildung 9: Koexpression von LgR5 und Ki-67 in BE (a) und OE-33 (b) in Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen. (a) Wenige zugleich LgR5- und Ki-67-positive Zellen (Pfeile), viele zugleich LgR5-negative und Ki-67-positive Zellen (*) sowie zugleich LgR5-positive und Ki-67-negative Zellen (*). Unten jeweils vergrößerte Ausschnitte. (b) Proliferierende sowohl Ki-67- als auch LgR5-positive Zellen (Pfeile). grün: FITC (Fluoresceinisothiocyanat), rot: Cy3 und blau: DAPI (4'6-Diamidino-2-phenylindodihydrochlorid).37
- Abbildung 10: Kaplan-Meier-Überlebenskurven. (a) Adenokarzinome mit Barrett-Epithel (EAC mit BE). (b) alle Adenokarzinome (EAC). Die kurzen vertikalen Linien kennzeichnen die Zeiten der zensierten Daten.38
- Abbildung 11: Kombination des Modells der klonalen Selektion und des Modells der Krebsstammzellen zur Karzinogenese. (Modifiziert nach Visvader et. al 2008)41

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risikofaktoren für das Barrett-Karzinom und für den Barrett-Ösophagus im Überblick	7
Tabelle 2: Prozentualer Anteil von Krebsstammzellen in verschiedenen menschlichen Tumorgeweben. (Modifiziert nach Visvader et al. 2008).....	13
Tabelle 3: Anteil LgR5-positiver Gewebeproben in den ösophagealen Adenokarzinomen mit (EAC mit BE) und ohne Barrett-Epithel (EAC ohne BE) sowie im ösophagealen Plattenepithelkarzinom (ESCC).	28
Tabelle 4: Klinisch-pathologische Eigenschaften der Studienpopulation mit Adenokarzinom mit Barrett-Ösophagus (für das Barrett-Epithel und das Adenokarzinom).....	32
Tabelle 5: Klinisch-pathologische Eigenschaften der kompletten Studienpopulation (Adenokarzinome mit und ohne Barrett-Ösophagus).....	33
Tabelle 6: Anteil der ösophagealen Adenokarzinome, neben denen kein Barrett-Epithel gefunden wurde.	48

9 Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
AP	alkalische Phosphatase
BE	Barrett's Esophagus, Barrett-Epithel
BSA	bovine serum albumin
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cdx2	Caudal type homeobox transcription factor 2
CREB	cAMP response element-binding protein
CSC	cancer stem cell, Krebsstammzelle
CT	Computertomographie
Ct	threshold cycle, Schwellenzyklus
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DCAMKL-1	Doublecortin and CaM-Kinase-like-1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
EAC	esophageal adenocarcinoma, ösophageales Adenokarzinom
ESCC	esophageal squamous-cell carcinoma
EUS	endoscopic ultrasound, endoskopische Sonographie
FBS	fetal bovine serum, fetales Rinderserum
FDG-PET	18-Fluorodesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GERD	gastroesophageal reflux disease, gastroösophageale Refluxkrankheit
GPCR	G-protein coupled receptor
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
HPF	high-power field, Hauptgesichtsfeld
HRP	horseradish peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IP3	Inositoltrisphosphat
IQR	interquartile range, Interquartilspannweite
KI	Konfidenzintervall
LgR5	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
LSBE	long segment Barrett esophagus, langstreckiger Barrett-Ösophagus

9 Abkürzungsverzeichnis

NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
PGE-2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RKI	Robert Koch-Institut, Berlin
RT-PCR	real-time quantitative reverse transcription-polymerase-chain-reaction, quantitative Echtzeit-PCR
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results
SSBE	short segment Barrett esophagus, kurzstreckiger Barrett-Ösophagus
TBS	Tris-buffered saline
UICC	Union internationale contre le cancer
WHO	World Health Organization

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Burkhard H. A. von Rahden für die Überlassung des Themas und die zahlreichen hilfreichen Kommentare und Korrekturen bei der Anfertigung dieser Arbeit. Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Martin Grimm für die Betreuung im Labor und die vielen nützlichen Tipps.

Neben allen anderen Helfern möchte ich mich insbesondere bei Frau Nilsson für ihre Unterstützung bei den Tumordatenbanken sowie bei Manuela Hofmann für ihre Mitarbeit im Labor bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Luisa für die ausgesprochen angenehme Zusammenarbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch meiner ganzen Familie und Stephanie für ihre Unterstützung und ihre ausdauernde und geduldige Anteilnahme.
