

**Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie,  
Kinder- und Gefäßchirurgie**

**der Universität Würzburg**

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

**Charakterisierung der Histamin-1-Rezeptorexpression  
bei der Kanzerogenese des Adenokarzinoms des Ösophagus**

**Inaugural - Dissertation**



**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Andreas Höfelmayr**

**aus Memmingen**

**Würzburg, Januar 2018**

**Referent**  
**Korreferent:**

Prof. Dr. Burkhard H. A. von Rahden  
Univ.-Prof. Dr. Ralf C. Bargou

**Dekan:**

Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2018**

**Der Promovend ist Arzt**

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Bedeutung des Ösophaguskarzinoms .....	1
1.2. Pathophysiologie des Barrett-Ösophagus und des Adenokarzinoms des Ösophagus .....	4
1.3. Kanzerogenese und chronische Entzündungsprozesse .....	6
1.3.1. Entzündung und Bedeutung bei Krebserkrankungen.....	6
1.3.2. Infektionen und gastrointestinale Tumorentstehung .....	7
1.4. Histaminstoffwechsel.....	8
1.5. Bedeutung von Histamin und Antihistaminika bei anderen Erkrankungen.....	10
1.6. Bedeutung von Histamin bei anderen Tumorentitäten .....	10
1.7. Fragestellungen der Arbeit.....	11
2. Material und Methoden .....	12
2.1. Patientenauswahl .....	12
2.2. Immunhistochemische Färbungen.....	14
2.3. Stimulationsexperiment/Zellkultur .....	16
2.3.1. RNA-Extraktion .....	16
2.3.2. UV-Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen .....	17
2.3.3. cDNA-Synthese .....	17
2.3.4. qPCR .....	18
2.4. Statistische Analyse .....	20

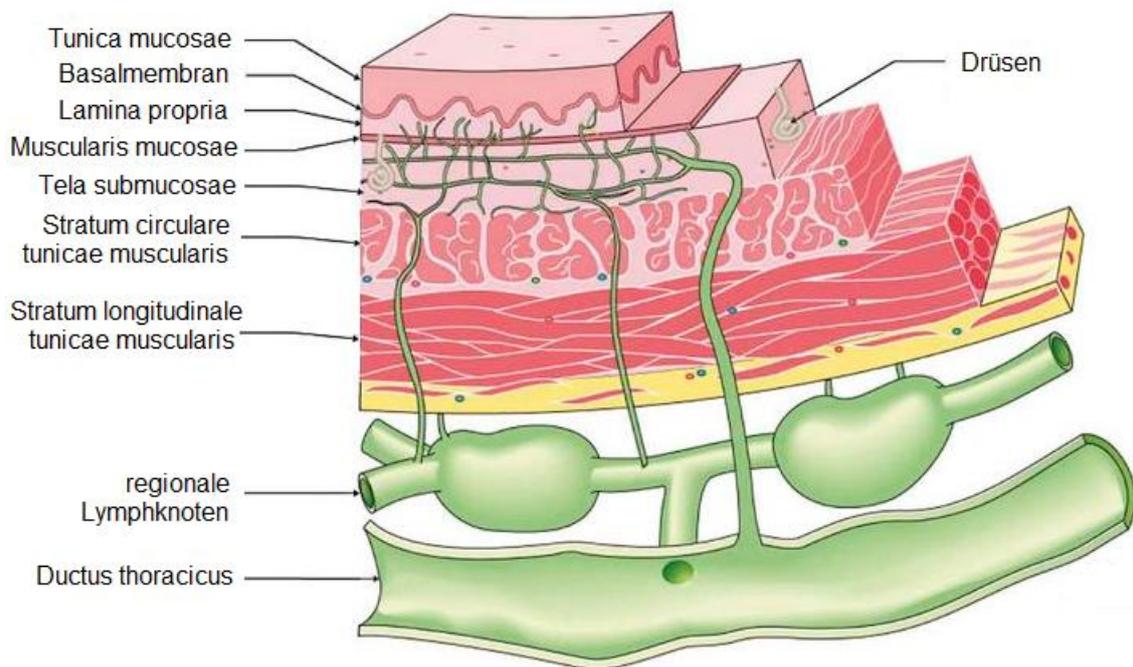
3. Ergebnisse .....	22
3.1. Expression des HRH1 in der Ösophagusschleimhaut der Barrett-Metaplasie mit Dysplasie .....	22
3.2. Expression des HRH1 in der Barrett-Metaplasie-Dysplasie-Karzinomsequenz .....	23
3.3. Koexpression und Korrelation von HRH1 mit dem Proliferationsmarker Ki-67 .....	26
3.4. Abhängigkeit der Expression von HRH1 vom Staging der Adenokarzinome des Ösophagus .....	28
3.5. Uni- und multivariate Überlebensanalysen .....	33
3.6. Adenokarzinom-Zelllinie OE-33 .....	37
4. Diskussion .....	39
4.1. Zusammenhang zwischen der Expression von Histamin-Rezeptor H1 in der Barrett-Metaplasie mit Dysplasie und Adenokarzinom .....	39
4.2. Betrachtung der HRH1-Expression im Kontext anderer Entzündungsmediatoren und Proliferationsmarker am gastroösophagealen Übergang .....	40
4.3. Vergleich der Ergebnisse mit anderen Tumorentitäten .....	43
4.4. Ungünstige Prognose für hohe HRH1-Expression .....	45
4.5. Einordnung der Häufigkeit der Barrett-Metaplasie bei Adenokarzinomen des Ösophagus .....	46
5. Zusammenfassung .....	48
6. Literaturverzeichnis .....	50
7. Abkürzungsverzeichnis .....	61

## 1. Einleitung

### 1.1. Bedeutung des Ösophaguskarzinoms

Als Ösophaguskarzinome wurden bösartige Neubildungen der Speiseröhre bezeichnet, die vom Epithel des Ösophagus ausgingen. Mit einer Inzidenz von 4,5/100000 waren Ösophaguskarzinome selten [1]. Eine klinische Herausforderung war das Fehlen von Frühsymptomen, weshalb diese Tumoren meist erst in lokal fortgeschrittenen Tumorstadien detektiert wurden. Eine Vorsorgestrategie war in Deutschland für das Ösophaguskarzinom nicht etabliert, außer der „Surveillance“ von Patienten mit dem als Präkanzerose des Adenokarzinoms angenommenen Barrett-Ösophagus [2, 3]: Es war das Screening bei Männern mit chronischen Symptomen der gastroösophagealen Refluxerkrankung mit mindestens zwei weiteren Risikofaktoren wie Übergewicht, Rauchen und positiver Familienanamnese in der amerikanischen Leitlinie [4, 5] und in den deutschen Leitlinien [6, 7] empfohlen, denn bei mehrjährig bestehenden Refluxbeschwerden sollte eine Endoskopie zur Aufdeckung eines Barrett-Ösophagus erfolgen.

Das Leitsymptom des fortgeschrittenen Ösophaguskarzinoms war die Dysphagie, welche bei Stenosierung des ösophagealen Lumens auftrat. Der morphologische Befund wurde mit der Ösophagoskopie erfasst. Mit dieser Untersuchung wurde das Ausmaß der Lumenobstruktion beim stenosierenden Tumorwachstum, die Höhenlokalisierung des Tumors, das gleichzeitige Vorliegen einer Hiatushernie, begleitende Schleimhautveränderungen wie das Vorliegen des präkanzerösen Barrett-Ösophagus beschrieben. Die Endosonographie (Endoskopischer Ultraschall, EUS) ermöglichte die Beurteilung der Tiefeninvasion des Tumors und war so die wesentliche Methode zum lokalen Staging des Primärtumorbefundes. Trotz der Ungenauigkeit dieser Methode [8] basierten die Therapiekonzepte heute weitgehend auf der mit der EUS festgelegten klinischen T-Kategorie [6]. Hierzu war die Kenntnis des histopathologischen Aufbaus der Speiseröhre essentiell:



**Abbildung 1: Histologischer Wandaufbau der Speiseröhre, modifiziert nach [9]**

Die Epithelschicht, auch Tunica mucosa (Schleimhaut) genannt, besteht oberflächlich aus mehrschichtigem unverhorntem Plattenepithel (Lamina epithelialis), das von einem Schleimfilm bedeckt ist. Der Schleim wird von mukösen Glandulae oesophageae propriae der Tela submucosa und in der Nähe des Magens durch Gl. oesophageae cardiae gebildet. Die Epithelschicht sitzt auf der Lamina propria aus lockerem Bindegewebe. Der Lamina propria folgt die Lamina muscularis mucosae. Die Tela submucosa ist eine Schicht aus lockerem Bindegewebe. An dieser Schicht hat das Gewebe Lymphgefäße. Es wurde postuliert, dass eine nodale Absiedlung erst in der Tela submucosa anfängt, was für die Therapie entscheidende Konsequenzen hat: Endoskopische Abtragungen nach histopathologischer Diagnose eines Adenokarzinoms mit endosonographischem Nachweis einer Tumordinfiltration in die Lamina muscularis mucosae könnten adäquate lokale, heilende Therapieoptionen sein [10], ab einem Befall des mittleren Drittels der Tela submucosa ist nur die Ösophagektomie mit radialer Lymphadenektomie [11] bei Staging nach Ausschluss von Fernmetastasierung eine kurative Maßnahme [6, 12]. Im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom des Ösophagus traten Lymphknotenmetastasen beim Adenokarzinom des distalen Ösophagus erst im

fortgeschrittenen lokalen Tumorwachstum, also bei größeren Tumoren, auf [13, 14].

Siewert und Kollegen haben 2001 die unterschiedlichen histologischen Tumorentitäten Plattenepithelkarzinom (ESCC) und Adenokarzinom (EAC) als unabhängige prognostische Parameter aufgezeigt [15]. Das Plattenepithelkarzinom hat die schlechtere Prognose.

Risikofaktoren waren beim Plattenepithelkarzinom Rauchen und Alkohol [16]; beim Adenokarzinom ist der Hauptrisikofaktor der gastroösophageale Reflux neben Adipositas, Rauchen und einer hereditären Komponente [6]. Weitestgehend ungeklärt war der Inzidenzanstieg von Adenokarzinomen der Speiseröhre in der weißen männlichen Population der westlichen Welt [17]. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten wurden derzeit um 23 % [1] angegeben. Den ungünstigen Überlebensraten entsprechend wurde nur etwa jeder siebte Tumor in einem noch frühen Stadium (T1) diagnostiziert, wobei Heilung begrenzt war auf frühe, chirurgisch resektable Tumorstadien, vor einer systemischen Dissemination des Krankheitsgeschehens [18].

Die Prognose des Ösophaguskarzinoms korrelierte mit dem postoperativen TNM-Stadium. Prätherapeutisch war ein Staging von entscheidender Bedeutung, da hiervon die Therapie abhängt [19].

**Tabelle 1: TNM-System beim Ösophaguskarzinom [20]**

Formel	Erklärung	
<b>T</b>	betreffend den Primärtumor	
T0	kein Anhalt für Primärtumor	
Tis	Carcinoma in situ	
T1a	Tumor infiltriert Lamina propria, Lamina muscularis mucosa	
T1b	Tumor infiltriert Tela submucosa	
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria	
T3	Tumor infiltriert Adventitia	
T4a	Tumor infiltriert Pleura, Perikard, Zwerchfell	
T4b	Tumor infiltriert andere Nachbarstrukturen wie Aorta, Trachea	
<b>N</b>	betreffend die Lymphknotenmetastasen	
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen	
N1	Metastasen in 1-2 Lymphknoten	
N2	Metastasen in 3-6 Lymphknoten	
N3	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten	
<b>M</b>	betreffend eine Fernmetastasierung	
M0	keine Fernmetastasen	
M1	Fernmetastasen	

## 1.2. Pathophysiologie des Barrett-Ösophagus und des Adenokarzinoms des Ösophagus

Der beschriebene Inzidenzanstieg schien ein Plateau zu erreichen [1, 21]. Bemerkte wurde dieser Trend vor allem in den USA [22] [23] [24], England [25] und Deutschland [1] [26]. Nach wie vor ungeklärt waren die Gründe für diese rapide Zunahme. Retrospektive Fall-Kontroll-Studien legten nahe, dass soziokulturelle Risikofaktoren - wie Lebensstil, Ernährungsweise und Körpergewicht der Patienten - die Entwicklung eines Adenokarzinoms maßgeblich beeinflussen [27] [22]. Als wichtigster Faktor wurde pathophysiologisch der Reflux von Magensäure und Galle angesehen, der zu Entzündung, Ulzeration und Strikturen des Ösophagus führen konnte [28]. Es wurde angenommen, dass bei lang anhaltendem chronischem Reflux eine Differenzierung der Stammzellen des Plattenepithels zu zylindrischen Zellen stattfindet, welche in Form eines einschichtigen intestinalen Epithels angeordnet

waren [29]. Dieser sogenannte "Endobrachyösophagus" wurde 1950 erstmalig von Norman Barrett beschrieben [30]. Er glaubte damals, einen kurz angelegten Ösophagus und einen intrathorakalen Magen zu beobachten. Diese Form der Umwandlung fand nämlich an der gastroösophagealen Übergangszone statt und ließ die Z-Linie oralwärts „verschieben“. Drei Jahre später legte Philip Allison anhand von Ösophagektomiepräparaten dar, dass es sich dabei um tubulären Ösophagus handelte, der mit Zylinderepithel ausgekleidet war [31]. Cohen gelang 1963 die Bestätigung mittels Nachweis einer kontinuierlichen Peristaltik zwischen ösophagealem Platten- und Zylinderepithel [32]. Bereits 1952 berichteten Morson und Belcher über eine Häufung von Adenokarzinomen bei Patienten mit Barrett-Ösophagus [33]. Adler postulierte, dass die Barrett-Metaplasie die Basis für die Entwicklung von Epitheldysplasien und assoziierten Adenokarzinomen des Ösophagus darstellte [34]. Dieser Prozess folgte dabei einer gut beschriebenen Sequenz histopathologischer Veränderungen, die sich von intestinaler Metaplasie, also das Vorhandensein von Zylinderepithel anstelle von mehrschichtigem Plattenepithel, über niedriggradige zur hochgradigen Dysplasie bis zum invasiven Karzinom abgrenzen ließen [35]. Die Dysplasie wurde definiert als das Vorhandensein von atypischen morphologischen Zell- und Zellkernveränderungen [29]. Auch wurde beobachtet, dass nicht alle Adenokarzinome des Ösophagus in chirurgischen Serien mit Barrett-Ösophagus assoziiert waren und nur bei einer Minderheit an Patienten mit Barrett-Ösophagus mit einer Inzidenz von 0,5-2% pro Jahr ließ sich ein Übergang zu einem invasiven Karzinom beobachten [36, 37]. *Shaheen et al.* wiesen hierbei vor allem auf den publication bias durch zu geringe Untersuchungszahlen in kleineren Studien hin [38]: Hier wurde wohl über hohe Raten der malignen Progression berichtet, da möglicherweise die Untersucher der kleinen Studien das Ergebnis nur für berichtenswert erachteten, wenn es eine hohe Progressionsrate zeigte und es somit zu einer Verzerrung kam. Neuere populationsbasierte Studien und eine Übersichtsarbeit zeigten nun eine jährliche Rate maligner Transformation von nur 0,4% pro Jahr [39, 40].

Auch bestanden Zweifel am Stellenwert des Barrett-Ösophagus als Präkanzerose [4, 41]. Möglicherweise könnte ein alternativer Erklärungsversuch

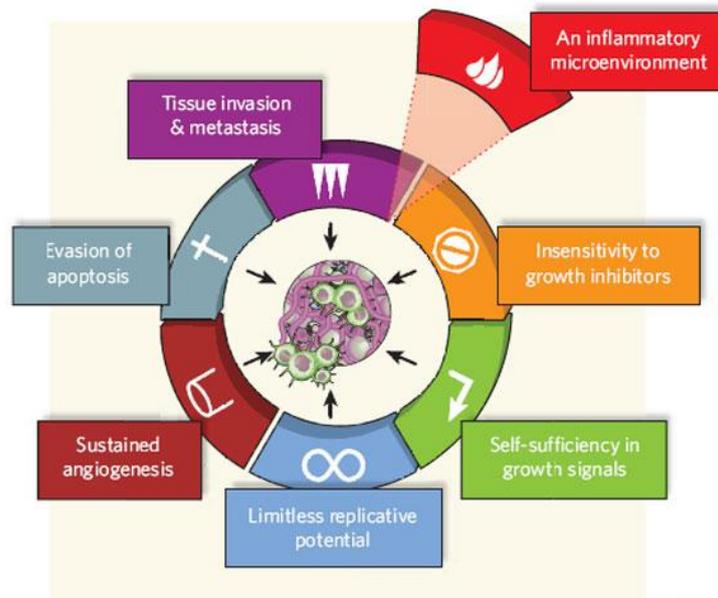
postuliert werden. Als wahrscheinlich galt lange die Annahme, dass die Tumorgenese im Zusammenhang mit einer chronischen Entzündung im Rahmen der Refluxerkrankung gesehen werden muss [41, 42], was inzwischen als bewiesen angesehen wurde auf Grundlage der Arbeit von *Lagergren et al.* [43]. Es waren aber möglicherweise wichtige Einflussfaktoren für die Tumorgenese noch nicht identifiziert, da limitierte Modellvorstellungen immer nur Teilannäherungen an die Realität zuließen. Das unterstützte die Suche nach weiteren möglichen zellulären Ursprüngen des ösophagealen Adenokarzinoms.

### 1.3. Kanzerogenese und chronische Entzündungsprozesse

#### 1.3.1. Entzündung und Bedeutung bei Krebserkrankungen

Bereits Rudolf Virchow beschrieb im 19. Jahrhundert die Endotheldysfunktion als einen Baustein der sog. Virchow-Trias, welcher ein Entzündungsgeschehen aufrechterhalten konnte, z. B. im Rahmen einer Thrombose [44, 45]. Als Entzündung ließ sich die Antwort des Organismus verstehen, einen Gewebeschaden mit einem komplexen Netzwerk an zellulären Reaktionen und chemischen Signalen zu reparieren. Dieser Prozess war normalerweise selbstlimitierend, aber eine Verlängerung dieses Zustandes konnte als Faktor angesehen werden, den Weg der Krebsentstehung für die Zellpopulation zu unterstützen [46]. Die Verbindungen zwischen zellulären und molekularen Mechanismen, die an Entzündung und Krebsentstehung beteiligt waren, wurden in den letzten Jahren definiert und eine zunehmende Zahl an molekularen Faktoren wie Antikörper oder Hemmstoffe wurde aufgrund dieser Ergebnisse als mögliche Ziele für die Krebstherapie gefunden [47]. Nicht alleine chronische Entzündungsvorgänge führten zur Entstehung einer malignen Erkrankung. *Mantovani et al.* hat als Ergänzung des Modells der „Six Hallmarks of Cancer“ von Hanahan und Weinberg das siebte „Hallmark“ Entzündung vorgeschlagen: Hierzu modifizierte er das Modell von Hanahan und Weinberg [48-51]: Die Entzündung spielte neben der Selbstversorgung durch Wachstumssignale, der Unempfindlichkeit gegenüber Antiwachstumssignalen,

der Resistenz gegenüber Apoptose, der Fähigkeit zur unbegrenzten Replikation und Angiogenese sowie zur Invasion und Metastasenbildung eine entscheidene Rolle:



**Abbildung 2: Sieben „Hallmarks of cancer“: Mantovani [49] modifizierte das Modell der „Six Hallmarks of Cancer“ nach Hanahan, Weinberg [50] und ergänzte die Komponente der Entzündung.**

### 1.3.2. Infektionen und gastrointestinale Tumorentstehung

Seit 1925 wurde anhand des Kolonkarzinoms postuliert, dass auch chronische Entzündungsprozesse in der Krebsentstehung eine entscheidende Rolle spielen könnten [52] – bei der Kanzerogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als Präkanzerose. Große epidemiologische Untersuchungen haben nahegelegt, dass entzündliche Krankheiten in verschiedenen Organen für die Krebsentstehung prädisponierend waren. Es war postuliert worden, dass mehr als 25% aller Krebserkrankungen mit Entzündungsprozessen assoziiert sind [53]. Im Jahr 2012 veröffentlichte Lancet Oncology einen WHO-Report, in dem abgeschätzt wurde, dass bei mehr als zwei Millionen Menschen weltweit eine Infektion ursächlich für die Krebsentstehung nach heutigem wissenschaftlichen Stand ist [54].

Auch wurden wissenschaftliche Leistungen in diesem Gebiet ausgezeichnet: Der Nobelpreis wurde Harald zur Hausen 2008 verliehen für seine Entdeckung, dass virale Infektionen mit HPV-Viren zur Entstehung von Gebärmutterhalskrebs führen [55]. Bei den gastrointestinalen Organen zeigte sich ein enger Zusammenhang zwischen Krebsentstehung und chronischen Entzündungen: Das Risiko für Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn an Darmkrebs zu erkranken, war gegenüber der Allgemeinbevölkerung um mehr als das Doppelte erhöht [56]. Hepatitis B und C Infektionen waren Prädispositionsfaktoren für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms [57]. Auch stellten im Magen die Besiedlung und Infektion mit *Helicobacter pylori* die häufigste und wichtigste Ursache für Magenkrebs dar [58]. Auch die in der vorliegenden Arbeit betrachtete Reflux-assoziierte Karzinogenese konnte als Modell für den Zusammenhang zwischen Inflammation und Karzinogenese angesehen werden.

#### 1.4. Histaminstoffwechsel

Im menschlichen Organismus waren Histaminrezeptoren ubiquitär vorhanden [59]. Nachdem 1972 erstmals eine pharmakologische Unterscheidung zwischen dem Histamin H1- (HRH1) und H2-Rezeptor [60] erfolgte, wurde 1983 der H3-Rezeptor [61] und schließlich im Jahr 2000 nach der Entschlüsselung des humanen Genoms der H4-Rezeptor [62] beschrieben.

Den vier bisher bekannten Histaminrezeptorsubtypen war gemein, dass sie der Gruppe G-Protein gekoppelter Rezeptoren angehören und Histamin ein endogener Ligand war [63]. Seit der Entdeckung des Histamins durch Sir Henry Dale im Jahr 1910 wurden dieses kurzwirksame biogene Amin, das aus der Aminosäure Histidin durch die katalytische Aktivität des Enzyms Histidindecaboxylase synthetisiert wird, und deren Wirkungen umfassend erforscht.

Histamin wurde vor allem in Mastzellen, basophilen Granulozyten, Thrombozyten, enterochromaffinen Zellen (neuroendokrine Zellen im Epithelgewebe des Verdauungstrakts, spezialisierte Zellen der Darmschleimhaut und des Magens), histaminergen Neurone (Hypothalamus) und in Tumorzellen gebildet [64].

Durch Stimulation koppelten HRH1 als G-Proteine an Gq-Proteine, was zur Aktivierung von Phospholipase C, Produktion von Inositol-1,4,5-trisphosphat und Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führte [65, 66].

Dieser Rezeptorsubtyp wurde u.a. auf Endothel-, Epithelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert und vermittelte Vasodilatation und Bronchokonstriktion. Die Stimulation des HRH1 an Endothelzellen führte ebenfalls zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität vor allem in den postkapillären Venulen und zu einer Sekretion des von-Willebrand-Faktors [67].

Des Weiteren fand man HRH1 im zentralen Nervensystem an neuronalen Strukturen, wo durch diesen Rezeptorsubtyp u.a. der Schlaf-Wach-Rhythmus reguliert wird [68]. Experimente an HRH1-Knockout-Mäusen zeigten auch zahlreiche Funktionen des HRH1 auf: Dazu zählen Bewegung, exploratorisches Verhalten, kognitive Funktionen, sensorische Informationsverarbeitung, Schmerzempfinden und Essverhalten [69].

Der Histaminrezeptor gehört zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Diese bildeten die größte Familie von Zelloberflächenrezeptoren in Säugerzellen und den anteilmäßig häufigsten Angriffspunkt für Pharmaka. Im Speziellen hatte die Eigenschaft, Guanosin triphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP) zu hydrolysieren, diesen Proteinen ihren Namen, GTP-hydrolysierende Proteine, kurz G-Proteine, gegeben.

### 1.5. Bedeutung von Histamin und Antihistaminika bei anderen Erkrankungen

Auch bei anderen Erkrankungen war Histamin beteiligt. So spielte Histamin als Entzündungsmediator bei der Regulation von akuten Entzündungen eine entscheidende Rolle: Die Wirkung des Histamin Rezeptors H1 zeigte sich im Rahmen einer allergischen Reaktion anhand von Schmerzen, Juckreiz und Atemnot durch bronchiale Obstruktion wegen der Kontraktion der glatten Muskulatur [70]. Klinisch auffällig ist z. B. nach einem Insektenstich eine Rötung und Schwellung. Im Rahmen der Akuttherapie einer allergischen Reaktion war die Behandlung mit Antihistaminika Standard [71].

### 1.6. Bedeutung von Histamin bei anderen Tumorentitäten

Die Bedeutung von Histamin bei anderen Tumorerkrankungen war bisher gut und sehr vielfältig erforscht [72], jedoch gab es wenige Arbeiten zum Histamin 1- Rezeptor. Beim Mammakarzinom ist eine Abhängigkeit des Histaminspiegels zwischen Gewebe und Plasma gezeigt worden [73]. Frühere Forschungsarbeiten zeigten bei einer humanen Adenokarzinomzelllinie beim Pankreaskarzinom, PANC-1, dass diese Zellen die Histamin 1- und Histamin 2- Rezeptoren überexprimieren [66, 74]. Auch sezernierten diese Zellen, die eine Mutation des p53 tragen, Histamin in den Extrazellularraum. Hier konnte diese Substanz als autokriner oder parakriner Wachstumsfaktor die zelluläre Proliferation durch Bindung an z. B. HRH1 beeinflussen [75]. Dies induzierte eine Proliferation der Krebszelllinie, indem der Nervenwachstumsfaktor NGF sezerniert wurde und die mRNA-Expression von HRH1 stieg [76]. Ebenfalls untersucht wurde der HRH1 bei einer Prostatakarzinom-Zelllinie [77]: Histamin inhibierte hier die Proliferation der Zelllinie DU-145 durch die Aktivierung von HRH1. Gezeigt wurde dies durch die Stimulation mit Histamin und anschließender Antihistaminikagabe anhand unterschiedlicher Zellzahlen. Auch beim Oropharynxkarzinom war eine HRH1-Überexpression in der Studie von *Grimm et al.* sogar als unabhängiger prognostischer Parameter im untersuchten Patientenkollektiv identifiziert worden [78].

## 1.7. Fragestellungen der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Frage nach einer möglichen Bedeutung einer Histaminrezeptorexpression und damit Bedeutung des Histaminstoffwechsels für die Karzinogenese des Adenokarzinoms des distalen Ösophagus, die bislang nicht durch wissenschaftliche Untersuchungen adressiert wurde. Diese Frage sollte zunächst deskriptiv mittels immunhistochemischer Färbungen gegen den Histamin 1-Rezeptor, dann funktionell in der Zellkultur mit Stimulationsexperimenten an Adenokarzinomzelllinien untersucht werden. Der Histamin 1-Rezeptor wurde als zentraler Mediator des Histaminsignalwegs gewählt, auch im Hinblick auf die verfügbare und klinisch bereits gut etablierte Möglichkeit der Suppression mit den Histamin 1-Rezeptor-Antagonisten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patientenauswahl

Paraffinierte Gewebelöcke aus Operationspräparaten von 88 Patienten mit ösophagealen Adenokarzinomen und adhärenthem Barrett-Metaplasien (n = 60) und ösophagealen Plattenepithelkarzinomen (n = 10) sowie Biopsiematerial mit intestinaler Metaplasie ohne Dysplasie (n = 18) wurden vom Pathologischen Institut der Universität Würzburg aufgrund einer ICD-codierten Suche (Codes C15, K22.7) im SAP-System der Klinik nach zuvoriger Genehmigung durch den Datenschutzbeauftragten zur Verfügung gestellt.

Von den insgesamt untersuchten 88 Patienten waren 60 Patienten (8 weiblich, 52 männlich) im mittleren Alter von 66,75 Jahren ( $\pm$  8,9 Jahre), die im Zeitraum von 1998-2007 am Universitätsklinikum Würzburg operiert wurden, mit einem Adenokarzinom des Ösophagus eingeschlossen, 18 Patienten mit einem Barrett-Ösophagus ohne Dysplasien und 10 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Verglichen wurde die operierte Patientengruppe mit Adenokarzinom des Ösophagus innerhalb einer Subgruppenanalyse - dem Vorliegen assoziierten Barrett-Ösophagusproben - sowie mit der operierten Patientengruppe des Plattenepithelkarzinoms und einer Patientengruppe, bei welcher Probeexzisionen von Barrettschleimhaut untersucht wurden.

Die Tumorproben, wie auch die Barrettschleimhaut aus Probeexzisionen, wurden mit Einverständniserklärung der Patienten sofort nach Resektion in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt oder in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE), bis sie analysiert wurden. Berücksichtigt wurden nur Resektate von Patienten ohne neoadjuvante Vorbehandlung und mit kompletter Resektion der Tumore durch die Operation (R0-Resektion).

Alter, Geschlecht und Lymphknotenmetastasierung wurden bei Patienten, die in kurativer Absicht operiert wurden, ebenfalls in einer Datenbank für diese Arbeit erfasst wie die histologische Bestimmung der Tumoren anhand der 6. Auflage

der Union Internationale Contre le Cancer – TNM Klassifikation [79]. Tabelle 2 zeigte die Eigenschaften der Patienten mit Adenokarzinom des Ösophagus auf.

**Tabelle 2: Patientenkollektiv: Charakteristika der Patienten mit Adenokarzinom des Ösophagus**

Charakteristika	Patienten
	n=60
Alter (Jahre)	66,8±8,9 SD
Geschlecht	
männlich	52 (87%)
weiblich	8 (13%)
Grading	
G1/2	39 (66%)
G3/4	21 (33%)
Tiefeninvasion	
pT1/2	42 (70%)
pT3/4	18 (30%)
Lymphknotenmetastasierung	
pN0	23 (38%)
pN1-3	37 (62%)
UICC Stadium	
UICC I/II	42 (70%)
UICC III/IV	18 (30%)

Die Follow-Up Daten stammten aus dem lokalen Tumorregister Unterfranken und dem universitätseigenen Tumorregister. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 29 Monate bei einer Standardabweichung von ± 17,6 Monaten.

## 2.2. Immunhistochemische Färbungen

In dieser Arbeit wurden die Färbungen mit Histamin-1 Rezeptor-Antikörper an den Serienschritten der Proben durchgeführt. Die paraffinierten Gewebeblöcke wurden auf 2µm Dicke Schnitte geschnitten mit einem Schlittenmikrotom (Fa. Leica Microsystems, Wetzlar) und auf silanisierte Objektträger (Fa. Hartenstein, Würzburg) aufgebracht. Es erfolgte eine Entparaffinierung mit Xylol (Fa. J.T. Baker, Deventer Niederlande) für 2x15min, anschließend wurden die Schnitte rehydratisiert in absteigender Alkoholreihe (reiner Alkohol 2x10min, 90% Ethanol 2x3min, 80% Ethanol 2x3min, 70% Ethanol 2x3min, Aqua destilliert 2x5min, Pufferlösung 1x5min). Das Demaskieren der Antigene erfolgte im Dampfdrucktopf (1x8min) bei pH=6 mit Citratpuffer (Fa. Dako, Hamburg, REF 2369) entsprechend den Herstellerangaben. Anschließend wurden die Objektträger mit dem Primärantikörper oder dem Kontrollantikörper, verdünnt mit Tris-buffered-Saline-Lösung mit 0,5% Rinderserumalbumin (BSA) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Antikörper wurden, wie in Tabelle 2 angegeben, unkonjugierte polyklonale Antikörper gegen HRH1 sowie Isotyp Kontroll-Antikörper verwendet. Jeder Inkubation wurde eine Waschung mit Waschpuffer pH=7,44 (Fa. Dako, Hamburg) zwischengeschaltet. Im Anschluss erfolgte die weitere Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Fa. Dako, Hamburg, genannt LABEL, REF K0690) über 20min, dann mit einem HRP-konjugierten Streptavidin (Fa. Dako, Hamburg, genannt LINK, REF K0690) über den gleichen Zeitraum. Nun wurde die Inkubation der Objektträger mit Chromogen für HRP (Fa. Dako, Hamburg, REF HK124-5K) 7min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt: mit je 2 Tropfen Chromogen (Fa. Dako, Hamburg, REF HK126-5K) und einem Tropfen Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Nach Unterbrechung der Färbung in Leitungswasser wurde die Kernfärbung mit Hämatoxylin (Fa. Dako, Hamburg) für 3min bei RT durchgeführt.

Der Prozess des „Bläuens“ mittels Leitungswasser schloss sich an, ehe mit vorgewärmtem Glycergel (Firma Dako, Hamburg) die Objektträger eingedeckt wurden.

**Tabelle 3: Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen**

Antikörper	Herkunft	Firma
HRH1	Maus	Santa Cruz, Heidelberg: sc-19767
Ki-67	Maus	Acris, Hiddenhausen
Isotyp-Kontrollantikörper	Maus	Biogenex, San Ramon
Sekundärantikörper HRP	Hase	Acris, Hiddenhausen
Sekundärantikörper FITC	Hase	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk
Sekundärantikörper Cy3	Maus	Jackson ImmunoReserach Laboratories, Suffolk

Die Immunfluoreszenz hingegen wurde am ersten Tag mit den in Tabelle 3 aufgeführten Antikörpern in analoger Weise durchgeführt, am zweiten Tag wurde die Färbung mit einer halbstündigen Inkubation mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer fortgesetzt. Es schloss sich eine weitere Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper über Nacht bei 4°C an, ehe die Inkubation mit dem zweiten Cy3-konjugierten Sekundärantikörper vorgenommen wurde. Die Schnitte wurden dann mit DAPI (4´6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) gegengefärbt und mit Polyvinylalkohol mounting medium (Fa. Dako, Hamburg, genannt DABCO) eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Zeiss Durchlichtmikroskops.

In allen Proben wurde die Zellzahl ermittelt. Anhand sechs individuell repräsentativ gewählten hochauflösenden Feldern unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung (sog. High Power Fields (HPF)) wurde die Zellzahl sowie die gefärbte Zellzahl der Tumorzellen bestimmt. Hierbei wurde mit der Gegenfärbung die Zellmorphologie bewertet, so dass Tumorzellen eindeutig identifiziert wurden. Eine niedrige Expression wurde hierbei definiert als kleiner 50%, eine hohe Expression als über 50%.

Aussagekräftige Schnitte wurden mit Serienschnitten mit Immunfluoreszenzschnitten und anderen Biomarkern, wie dem Proliferationsmarker Ki-67, untersucht. Hierzu wurde ein Fluoreszenzmikroskop verwendet. Die mit einer Zeiss Kamera fotografierten Bilder wurden entweder importiert in den Microsoft Office Picture Manager oder im Falle der Immunfluoreszenzschnitte mit der Software Metamorph (Visitron Systems, Puchheim) semiquantitativ ausgewertet.

### 2.3. Stimulationsexperiment/Zellkultur

Mit einer Verdünnungsreihe von Histamin ( $10^{-1}$  mol bis  $10^{-5}$  mol) und unterschiedlichen Stimulationszeiten (10h, 20h, 22h, 30h, 40h) wurde die Beeinflussung von Zellen der Krebszelllinie OE-33 untersucht. Hierbei wurden nach vorheriger Vitalitätstestung mittels Trypanblau je  $5 \times 10^6$  Zellen verwendet.

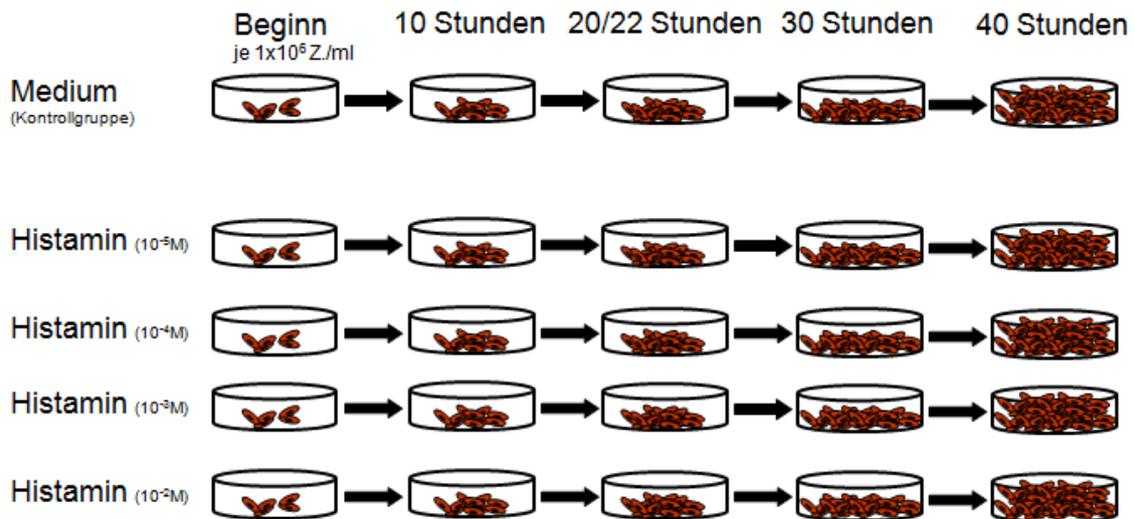


Abbildung 3: Ablauf des Stimulationsexperiments

Es wurde in Anlehnung an publizierte Methodik [80, 81] vorgegangen. Die Zelllinie OE-33 war die einzige kommerziell verfügbare Zelllinie mit Adenokarzinomzellen aus dem unteren Ösophagus mit nachgewiesener adhärenter Barrett Metaplasie (Firma Sigma-Aldrich, Steinheim). Sie stammte von einer 73-jährigen weiblichen Patientin und wurde im UICC Stadium IIA (nach dem Tumorstadium der Klassifikation von 2009).

#### 2.3.1. RNA-Extraktion

Die Zellen der Zelllinie OE-33 wurden unter dem Zeiss Mikroskop gezählt und anschließend in 500  $\mu$ l TRIzol lysiert. Mit Hilfe des RNA FFPE Kits (Stratagene, Waldbronn) wurde nach Herstellerangaben die gesamte zelluläre RNA extrahiert. Die RNA wurde gebunden und Fremdmaterial abgewaschen. Reine,

konzentrierte RNA wurde in Wasser eluiert und für weitere Analysen bei -70°C gelagert.

### 2.3.2. UV-Spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen

Der Gehalt an Gesamt-RNA wurde anhand der Absorption von Licht bei 260nm Wellenlänge bestimmt. Hierbei wurde ein Fotometer verwendet (Sigma-Aldrich, Hamburg), wobei als Lichtquelle für das optische System eine Xenonlampe diente. Diese konnte je nach Filtereinsatz entsprechend genau und diskret Messwellenlängen emittieren. Die Messwellenlängen betragen 230, 260, 280, 320, 562 und 595nm. Bei 260nm, dem Absorptionsmaximum von RNA, erfolgte die direkte Messung der Nukleinsäurekonzentrationen (dsDNA, ssDNA, RNA, Oligonukleotid), die der Proteine hingegen bei 280nm. Eine A<sub>260</sub>-Einheit entspricht 50µg/ml dsDNA, 37µg/ml ssDNA, 40µg/ml RNA oder 30µg/ml einzelsträngigem Oligonukleotid. Den Quotienten A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> bezeichnete man als Ratio, er gab den Reinheitsgrad der Nukleinsäure an. Dieser Wert lag in einem Bereich von 1,8 - 2,0, so dass die RNA-Präparate nicht durch Proteine verunreinigt waren. Niedrige Werte waren ein Hinweis auf Verunreinigungen durch Proteine oder organische Lösungsmittel, so dass die Probe unbrauchbar für weitere Methoden war, wie z. B. cDNA-Synthese. Als Probe wurden in das Fotometer der Firma Sigma 2µl eingesetzt und mit 68µl H<sub>2</sub>O in einer Kunststoffeinmalküvette (Uvette 220nm-1600nm) verdünnt, wobei als Leerwert stets 70µl H<sub>2</sub>O diente.

### 2.3.3. cDNA-Synthese

Die Reverse Transkription von RNA in cDNA wurde mit Hilfe von iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Herkules, CA, USA) ausgeführt.

#### 2.3.4. qPCR

Die Software Primer Express (Fa. Life Technologies, Carlsbad, USA) wurde verwendet, um Primer zu entwerfen und dann kurze Segmente von 50 - 150 Basenpaaren der Ziel cDNA zu vervielfältigen.

Für die relative Quantifizierung der cDNA wurde das Housekeeping Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die Sequenz des Primers war 5'-ATC CCA TCA CCA TCT TCC AGG -3', die Sequenz des Rückwärtsprimers war 5'-CGC CCC ACT TGA TTT TGG-3', hergestellt von Biomers.net (Ulm, Artikel-Nr. 00091774\_1 und 00091774\_2)

Parallel wurde zur Qualitätskontrolle das Housekeepinggen  $\beta$ -Actin verwendet: Die Sequenz des  $\beta$ -Actin-Primerpaars war nicht bekannt, da diese von der Firma Qiagen (Hilden) nicht bekanntgegeben wurde (Katalog Nr. PPH00073E). Als Histamin-1 Rezeptor Genamplifikator wurden die Primer 5'-AGC CTC TCG GTG GCG GAC TT-3' (Biomers.net, Ulm) und 5'-GAG GCA GAG AGG ACG GCC CA-3' (Biomers.net, Ulm) sowie ein Primerpaar der Firma Qiagen (Hilden) verwendet, dessen Sequenz nicht bekannt ist (Katalog Nr. PPH02592A).

Diese Primer wurden mit einem Gradientenprotokoll auf die beste Annealing-Temperatur getestet.

Nach Anfertigen von Verdünnungen mit 50ng/ $\mu$ l DNA/RNA Hybrid wurden RT-PCRs mit folgendem Protokoll mit dem DNA Engine Opticon 2 System (Fa. Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) durchgeführt: Jede PCR-Reaktion wurde mit einem Volumen von 25 $\mu$ l mit 12,5 $\mu$ l Sensi Mix, 0,5 $\mu$ l SYBR Green, 1 $\mu$ l Vorwärtsprimer[10pmol/ $\mu$ l], 1 $\mu$ l Rückwärtsprimer[10pmol/ $\mu$ l], 1 $\mu$ l Template DNA (150 $\mu$ g) und 9 $\mu$ l peqGOLD RNase-freiem Wasser (peqlab Biotechnologie, Erlangen) durchgeführt.

Als erstes erfolgte eine Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstranges bei 94°C. Anschließendes Abkühlen auf 50–65°C ermöglichte die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer mit der komplementären Matrizen-DNA (sog. Annealing). Bei Verwendung von Primerpaaren mit unterschiedlicher Annealingtemperatur wurde die niedrigere Temperatur verwendet. Im dritten Schritt, der Elongation, synthetisierte die DNA-Polymerase von dem 3'terminalen Ende dieser

Oligonukleotidprimer ausgehend jeweils in 5'→ 3' Richtung bei 72°C den komplementären DNA-Gegenstrang. Die neusynthetisierten DNA-Stränge dienten in den folgenden Zyklen wiederum als Matrizen. Standardmäßig wurden in dieser Arbeit jeweils 35 Zyklen verwendet, um eine exponentielle Zunahme der DNA zu erreichen. Zwei zusätzliche Reaktionsschritte wurden nur einmal durchgeführt: vor Beginn der Zyklen eine vollständige Denaturierung der Nukleinsäure bei 94°C und zum Schluss einer PCR-Reaktion eine Phase zur Beendigung aller begonnenen Polymerisationen bei 72°C.

Bei der Real-Time PCR wurde das fluoreszierende Molekül SYBR Green I verwendet, um die Quantität an DNA mit einem proportionalen Anstieg des fluoreszierenden Signals detektieren zu können. Die Moleküle veränderten durch ihre unspezifische Bindung an doppelsträngige DNA ihre Fluoreszenz um das 1000fache. Insgesamt konnte also die Stärke des Fluoreszenzsignals als Größe für die Menge an neu synthetisierter doppelsträngiger DNA angesehen werden, welche durch die Vervielfältigung des Zielgenes erhöht wurde. Zur exakten Ermittlung eines reinen Syntheseprodukts anstatt einer Vielzahl unterschiedlicher, zufälliger Reaktionsprodukte wurde am Ende der Vervielfältigungskaskade eine Schmelzpunktbestimmung des Produkts durchgeführt. Durch geringe Temperaturzunahmen von 0,2°C über ein großes Suchtemperaturintervall von 45-90°C wurde die Reinheit der Synthese analysiert. Da die doppelsträngige DNA in diesem Temperaturfenster denaturierte, also ihre Doppelsträngigkeit verlor, verminderte sich das Fluoreszenzsignal. Diese negative Signaländerung wurde als Funktion der Temperatur aufgetragen: Ein charakteristischer Peak unterschied das spezifische Produkt von anderen doppelsträngigen DNA-Produkten wie z. B. Primerdimere oder unspezifische Produkte, welche aufgrund ihrer anderen Basenzusammensetzung und Basenlänge bei anderen Temperaturen denaturierten.

Parallel wurden für jeden Durchgang mit maximal 96 Proben Negativkontrollen ohne Matrize produziert. Der mittlere Wert des Schwellenzyklus (threshold cycle, Ct) wurde berechnet als die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz eine feste Schwelle erreichte. Es wurde die Differenz ( $\Delta Ct$ ) zwischen

durchschnittlichen Ct-Werten der Proben mit den Zielgenen und jenen des Haushaltgenes GAPDH oder  $\beta$ -Actin ermittelt, gefolgt von der Berechnung der Differenz zwischen den Durchschnitts  $\Delta$ Ct-Werten der Tumorproben bzw. stimulierten Zellen (TG) für jedes Zielgen und dem  $\Delta$ Ct-Wert der Normalgewebe für dieses Zielgen ( $\Delta\Delta$ Ct). Der relative Quantifizierungswert, die relative „fold-difference“ „x-fache Differenz“ zum Normalgewebe (Mittelwert) wurde angegeben als  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Die Berechnung der Expression des Zielgens wurde also relativ zum Normalgewebe bzw. unstimulierten Zellen (NG) angegeben (= relative Quantifizierung) und nach den folgenden Formeln berechnet:

$$FD = 2^{[(Ct\ HRH1\ in\ NG - Ct\ GAPDH\ in\ NG) - (Ct\ HRH1\ im\ TG - Ct\ GAPDH\ im\ TG)]}$$

$$FD = 2^{[(Ct\ HRH1\ in\ NG - Ct\ bActin\ in\ NG) - (Ct\ HRH1\ im\ TG - Ct\ bActin\ im\ TG)]}$$

$$FD = 2^{[Ct(NG) - Ct(TG)]}$$

#### 2.4. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS und MedCalc Software (Mariakerke, Belgien) vorgenommen. Alle Werte wurden als Median  $\pm$  Interquartil Range (IQR) dargestellt, da der D'Agostino-Person Test keine Normalverteilung der Daten für die Gen- und Proteinanalyse ergab. Als rezidivfreies Überleben wurde die Zeit definiert, die von der Tumorresektion bis zum Wiederauftreten einer tumorbedingten Erkrankung wie Metastasierung, Rückfall oder Tod verging. Die Gesamtüberlebenszeit in Bezug auf die quantitative Auswertung der Histamin-Rezeptor-markierten Tumorzellen wurde mit der Kaplan-Meier Methode [82] univariat und mittels der multivariaten Cox-Regression [83] ermittelt.

Zur Analyse von Assoziationen oder Unterschieden der quantitativen Auswertung von Histamin-Rezeptor-markierten Tumorzellen mit klinischen Merkmalen wurde der Chi-Quadrat-Vierfeldertest durchgeführt. Sollten die Voraussetzungen nicht erfüllt sein, z. B. wegen zu geringer Stichprobengröße, wurde der exakte Fisher Test (Fisher-Yates-Test) verwendet.

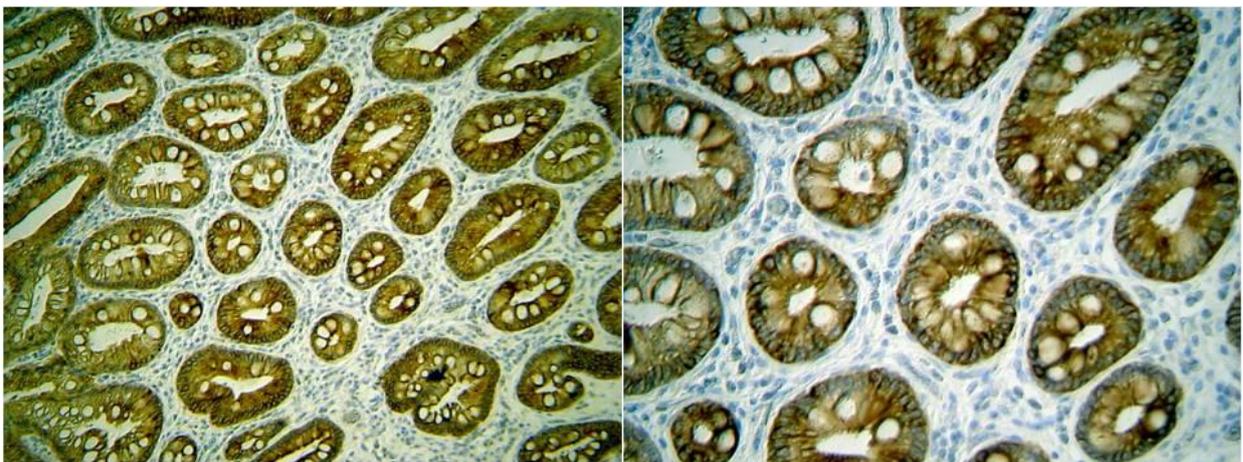
Unterschiede auf Signifikanz der Daten wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Tests analysiert. P-Werte  $<0,05$  wurden hierbei als statistisch signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Expression des HRH1 in der Ösophagusschleimhaut der Barrett-Metaplasie mit Dysplasie

In den immunhistochemischen Färbungen wurde der HRH1 markiert mit einem Antikörper und anschließend braun gefärbt sowie eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. Es zeigte sich bei Schleimhaut mit Barrett-Ösophagus mit Dysplasie eine Signalintensität an der Zelloberfläche (siehe Abbildung 4) der Epithelzellen, welche dem Vorhandensein des Histamin 1-Rezeptors entspricht. Das Stroma färbte sich hierbei nicht. Die Kerngegenfärbung war hellblau. Normale Ösophagusschleimhaut mit Plattenepithelzellen zeigte keine Expression des Histamin 1-Rezeptors.

In der Abbildung 4 waren repräsentative Bilder immunhistochemischer Färbungen von Histamin-Rezeptor H1 in Mucosae von Patienten mit Barrett-Ösophagus mit Dysplasie dargestellt. Charakteristikum der intestinalen Metaplasie waren die Becherzellen. Kriterium für Dysplasie stellten die Zelltypen dar.



**Abbildung 4** Expression von Histamin-Rezeptor H1 in der Ösophagusschleimhaut. Als Vergrößerungen wurden 200x (links) und 400x (rechts) gewählt.

Die quantitative Analyse ergab bei 32 von 41 Präparaten mit dysplastischem Barrett-Ösophagus in Nachbarschaft des Adenokarzinoms einen immunhistochemischen Nachweis von HRH1 an Epithelzellen.

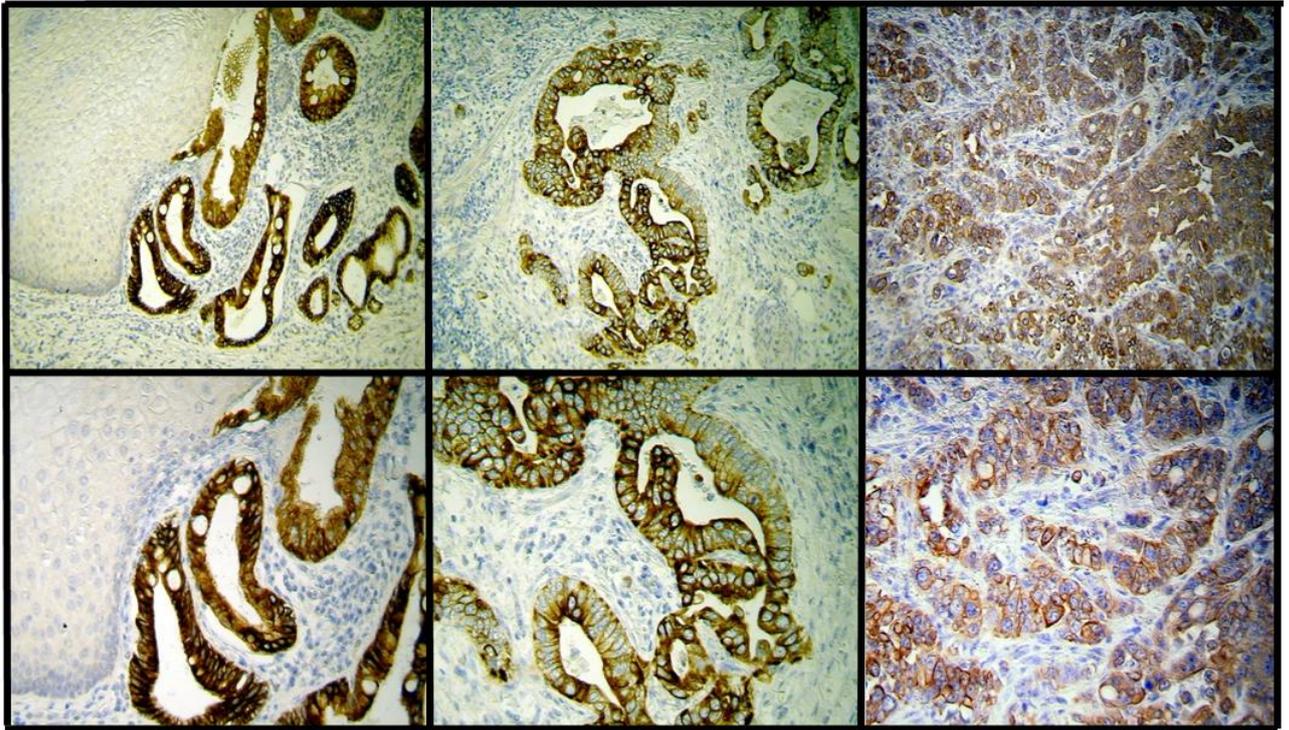
### 3.2. Expression des HRH1 in der Barrett-Metaplasie-Dysplasie-Karzinomsequenz

Die entarteten Epithelzellen der unterschiedlichen Präparate hatten sich vor allem braun angefärbt in den immunhistochemischen Schnitten. Es fanden sich unterschiedliche Färbeintensitäten bei gleichzeitig gefärbten Schnitten. Es wurden benachbarte Serienschnitte angefertigt mit wiederum gleichzeitiger Färbung und gleichem Ergebnis.

Untersucht wurde aufgrund der Anfärbung der Epithelzellen mit Nachweis von HRH1 die unterschiedliche Expression des HRH1 in den verschiedenen Stadien der Barrett Metaplasie-Dysplasie-Karzinomsequenz.

Im Adenokarzinom des Ösophagus zeigten die Tumorzellen eine geringe Expression, während sich im Barrett-Ösophagus mit Dysplasie eine hohe Expression des Rezeptors bei den Epithelzellen nachweisen ließ.

Im normalen Plattenepithel des Ösophagus, wie auch dem umgebenden Bindegewebe, zeigte sich in der Immunhistochemie keine Histaminrezeptorexpression.

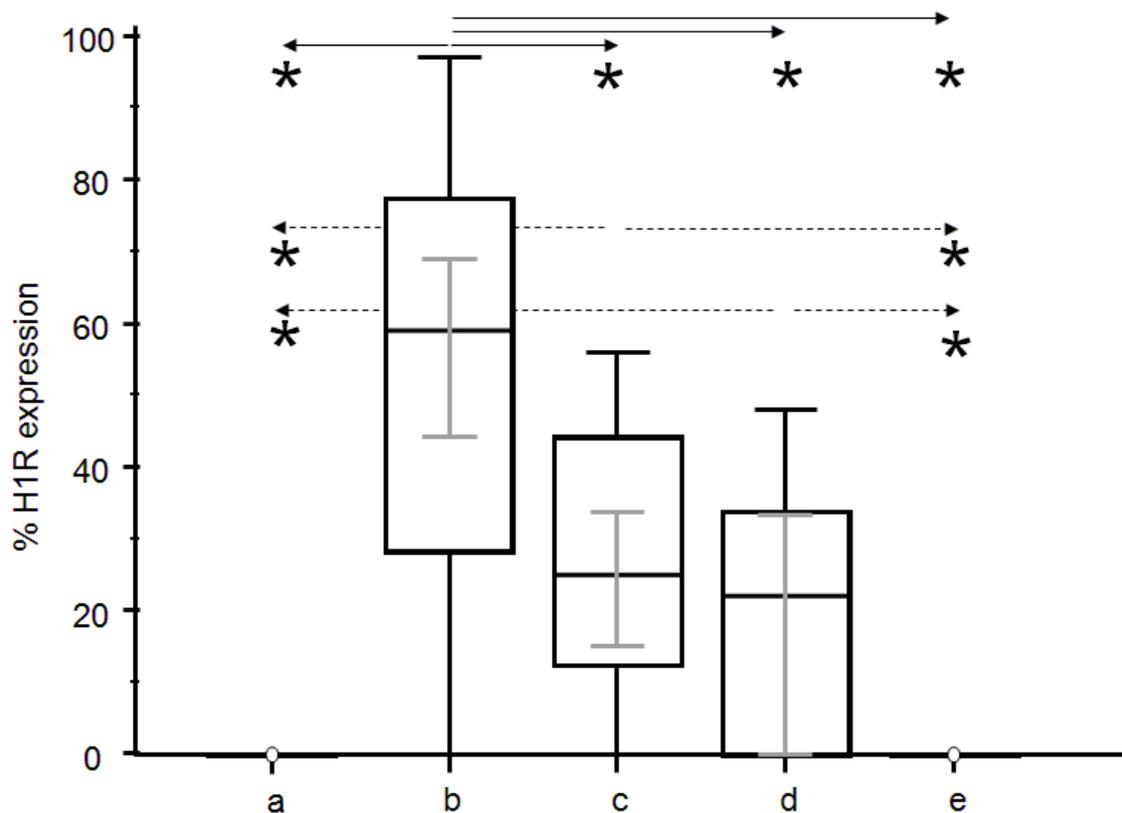


**Abbildung 5:** Der Histamin-Rezeptor H1-Expression charakterisierte verschiedene Stadien in der Barrett Metaplasie-Dysplasie-Karzinomsequenz: Repräsentative Bilder immunhistochemischer Färbungen (braun) von Histamin-Rezeptor H1 (HRH1) in Mucosae von einem Patienten mit Normalgewebe (Plattenepithel, links oben innerhalb des Bildes) und angrenzender Barrett-Metaplasie mit geringen Dysplasien (linke Spalte) zeigten eine starke Expression in Epithelzellen wie bei einem Patienten mit starken Dysplasien (mittlere Spalte). Bei einem Patienten mit Adenokarzinom des Ösophagus (rechte Spalte) sah man eine geringe Expression in den Tumorzellen. Vergrößerungen 40x in der oberen Zeile, 100x in der unteren Zeile.

Eine quantitative Analyse des HRH1 bezüglich der unterschiedlichen histopathologischen Einordnungen der verschiedenen Gewebeproben ergab folgendes Bild, siehe Abbildung 6: Weder beim Barrett-Ösophagus ohne Dysplasie (Spalte a, (n = 0/18, Median 0%)) noch in Plattenepithelkarzinomproben (Spalte e, (n=0/10, Median 0%)) war der Rezeptor immunhistochemisch nachweisbar. Der höchste Anteil an Zellen mit Expression von HRH1 war mit 59% in Barrett-Ösophagusschleimhaut mit Dysplasie in der Analyse nachweisbar in der Umgebung eines Adenokarzinoms (Spalte b, (n= 32/41, 95% KI: 44,0 zu 69,0)). Die Unterschiede waren statistisch signifikant zu allen anderen untersuchten Gruppen.

Bei adhärentem Adenokarzinom (d.h. mit Barrett-Ösophagus in Nachbarschaft) war im Median 25% (Spalte c, (n=32/41, 95% KI: 15,0 zu 33,18)) HRH1 exprimiert nachweisbar. Bei Patienten mit Adenokarzinom ohne BE betrug die Expression im Median 22% und somit geringer (Spalte d, (n=10/19, 95% KI: 0 zu 33,22)) bei großer Varianz.

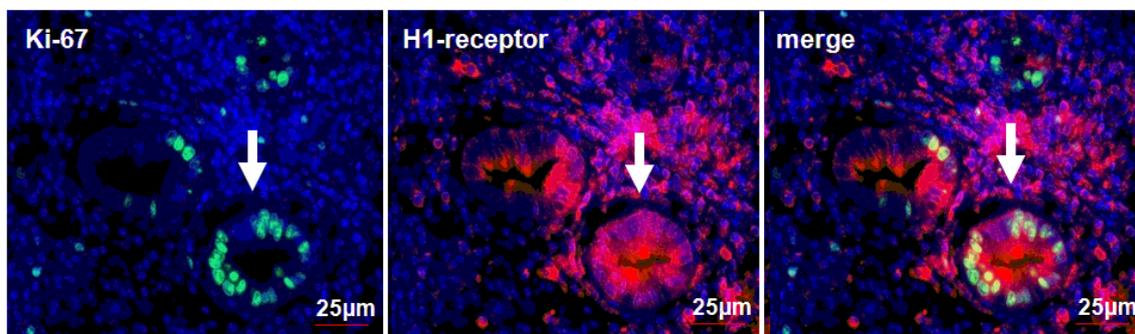
Auch signifikant unterschiedlich war die Expression des HRH1 bei Tumorzellen des Adenokarzinoms zu den Zellen des Plattenepithelkarzinoms und des Barrett-Ösophagus ohne Dysplasien.



**Abbildung 6: Prozentualer Anteil HRH1-positiver Zellen (HRH1-Expression > 50%) in Abhängigkeit der histopathologischen Charakterisierung des Gewebes. Die Pfeile mit \* gaben einen signifikanten Unterschied zur jeweils anderen Gruppe wieder. Grau war das Konfidenzintervall eingezeichnet.**

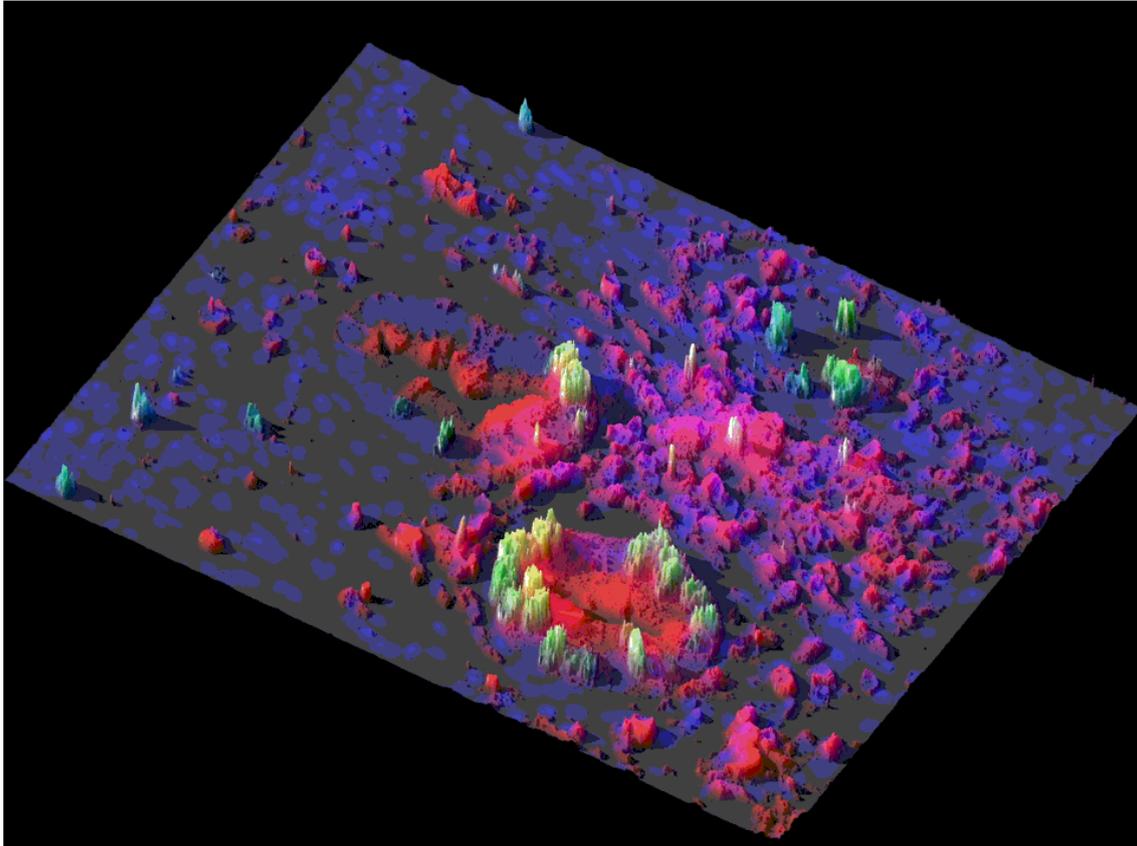
### 3.3. Koexpression und Korrelation von HRH1 mit dem Proliferationsmarker Ki-67

Mit dem etablierten Proliferationsmarker Ki-67 wurden in der Immunfluoreszenz die proliferierenden Zellen in den unterschiedlichen Geweben dargestellt. Es zeigten sich in der Barrett-Ösophagusschleimhaut mit Dysplasien proliferierende Epithelien und auch einzelne proliferativ aktive Zellen. Durch die Methode der Doppelmarkierung ließ sich so zeigen, dass HRH1-positive Zellen auch proliferativ sind. Beispielhaft sah man in Abbildung 7 die Koexpression von HRH1 mit dem Proliferationsmarker Ki-67.



**Abbildung 7: Ko-Expression von HRH1 mit dem Proliferationsmarker Ki-67 mit Fluoreszenzmikroskopie: Repräsentative Bilder immunfluoreszierender Färbungen zeigten die Expression von Ki-67 (FITC, grün, linkes Bild) und HRH1 (Cy3, rot, mittleres Bild). Mit Pfeil markiert waren die Barrett-Ösophaguszellen mit Dysplasie, welche beide Marker gleichzeitig exprimierten, was im Bild rechts in Kombination („merge“) durch die gelbe Färbung (physikalisch bedingt) dargestellt wurde. Vergrößerung 100x.**

Es gab Speiseröhrenschleimhaut mit Barrett-Dysplasiezellen, die eindeutig proliferativ aktiv war und sowohl den Proliferationsmarker Ki-67 als auch den HRH1 exprimierte. Diese Ergebnisse wurden in einem sog. Wireframe mit semiquantitativer Messung der fluoreszierenden Antikörper dargestellt; so war eine deutliche Korrelation bei diesen Zellen visualisiert worden (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Korrelation zwischen HRH1 und Ki-67 in BE mit Dysplasie: Diese dreidimensionale sogenannte „Wireframe“-Analyse mit semiquantitativer Darstellung der Antikörperfluoreszenzen stellte die deutliche Korrelation im Bereich der Barrett-Dysplasie dar (Pearson's correlation  $r = 0,743$ , Ki-67, grün (FITC) HRH1, rot (Cy3)). Die Fläche mit x- und y-Achse stellte den repräsentativen Ausschnitt des histopathologischen Präparats dar, die z-Achse farbige die semiquantitative Analyse: Je größer der Wert der z-Achse, desto größer die Expression des entsprechenden Rezeptors an dieser Stelle.**

### 3.4. Abhängigkeit der Expression von HRH1 vom Staging der Adenokarzinome des Ösophagus

Im Folgenden wurde eine Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern für die Adenokarzinome des Ösophagus untersucht. Hierbei wurde eine niedrige Expression des HRH1 (cut-off 50%) von einer hohen Expression semiquantitativ unterschieden.

Die Tiefeninvasion des Tumors wurde in Abhängigkeit der Expression an HRH1 analysiert:

Lokal limitierte Tumore (pT1/2, n=28+14) haben hierbei signifikant häufiger eine niedrigere Expression an HRH1. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren (pT3/4, n=5+13) war die hohe Expression des HRH1 hingegen signifikant unterschiedlich ( $p = 0,0099$ ).

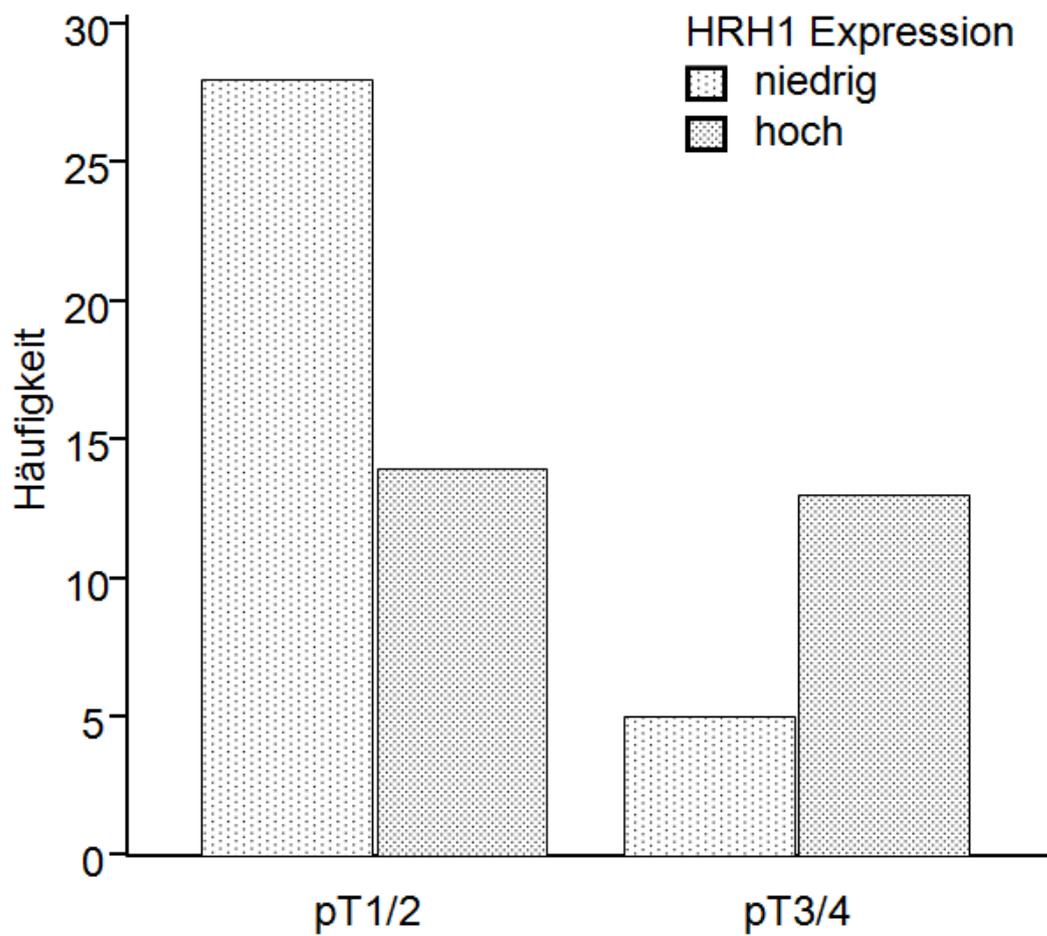
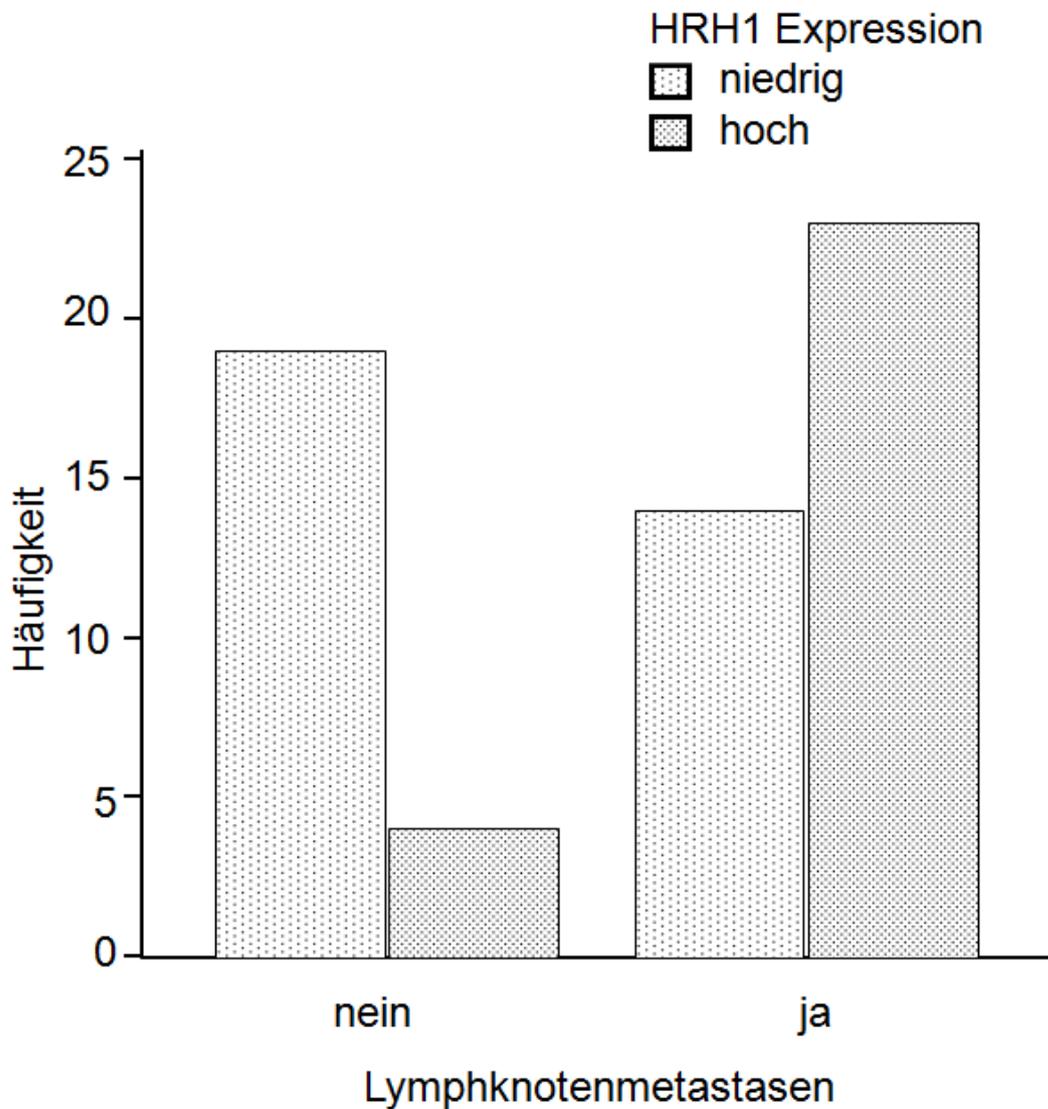


Abbildung 9: HRH1-Expression in Abhängigkeit der Invasivität der Tumoren: Angegeben wurde die absolute Häufigkeit der gefärbten Präparate mit Adenokarzinom des Ösophagus.

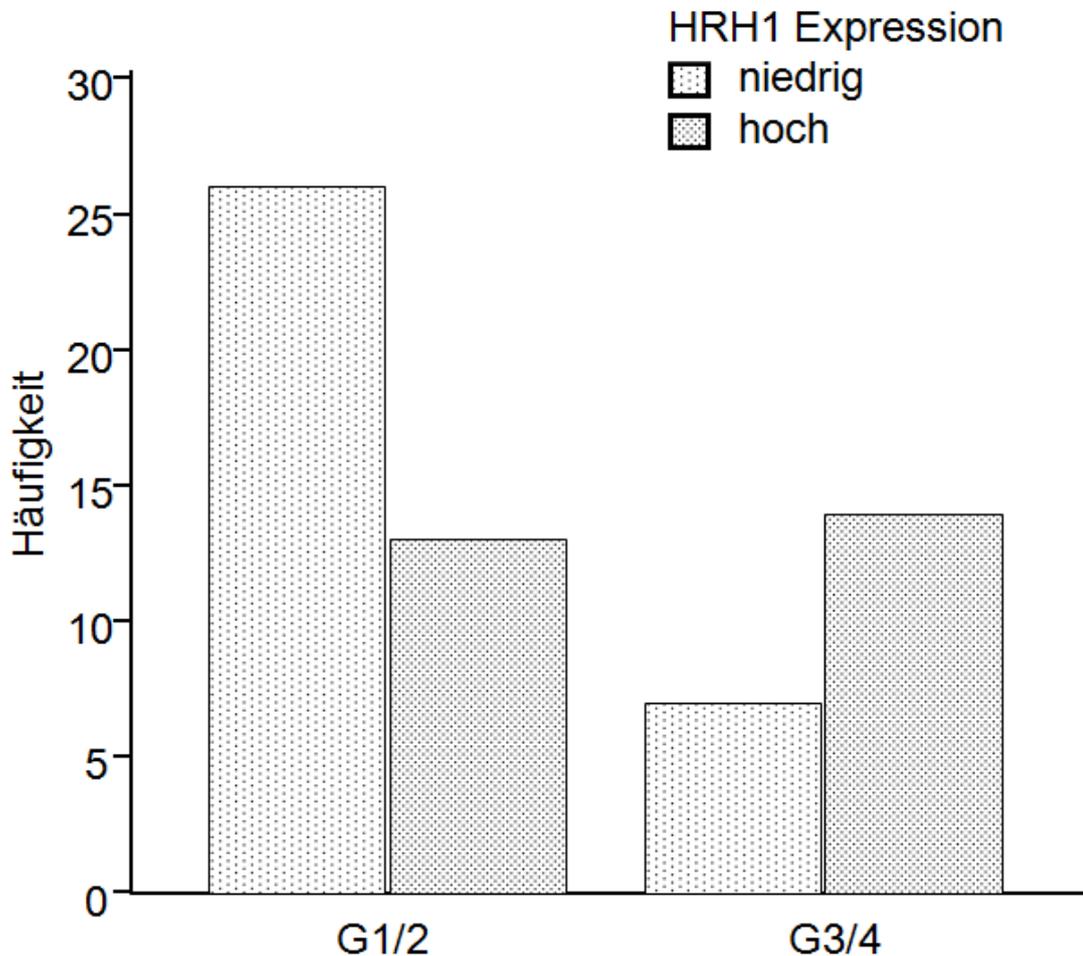
Es wurde untersucht, positiver oder negativer Nodalstatus mit hoher oder niedriger Histaminrezeptorexpression korrelierte.



**Abbildung 10: HRH1-Expression abhängig von der Lymphknotenmetastasierung: Angegeben wurde die absolute Häufigkeit der gefärbten Präparate mit Adenokarzinom des Ösophagus.**

Bei hoher HRH1-Expression war bei einem klinisch fortgeschrittenen Tumorleiden mit Vorliegen von Lymphknotenmetastasen auszugehen (n=23 von 27). Dies stellt sich auf dem Signifikanzniveau von 95% deutlich dar ( $p = 0,0011$ ). Bei negativem Nodalstatus (n=23) waren 19 Proben mit geringer HRH1-Expression zu zählen.

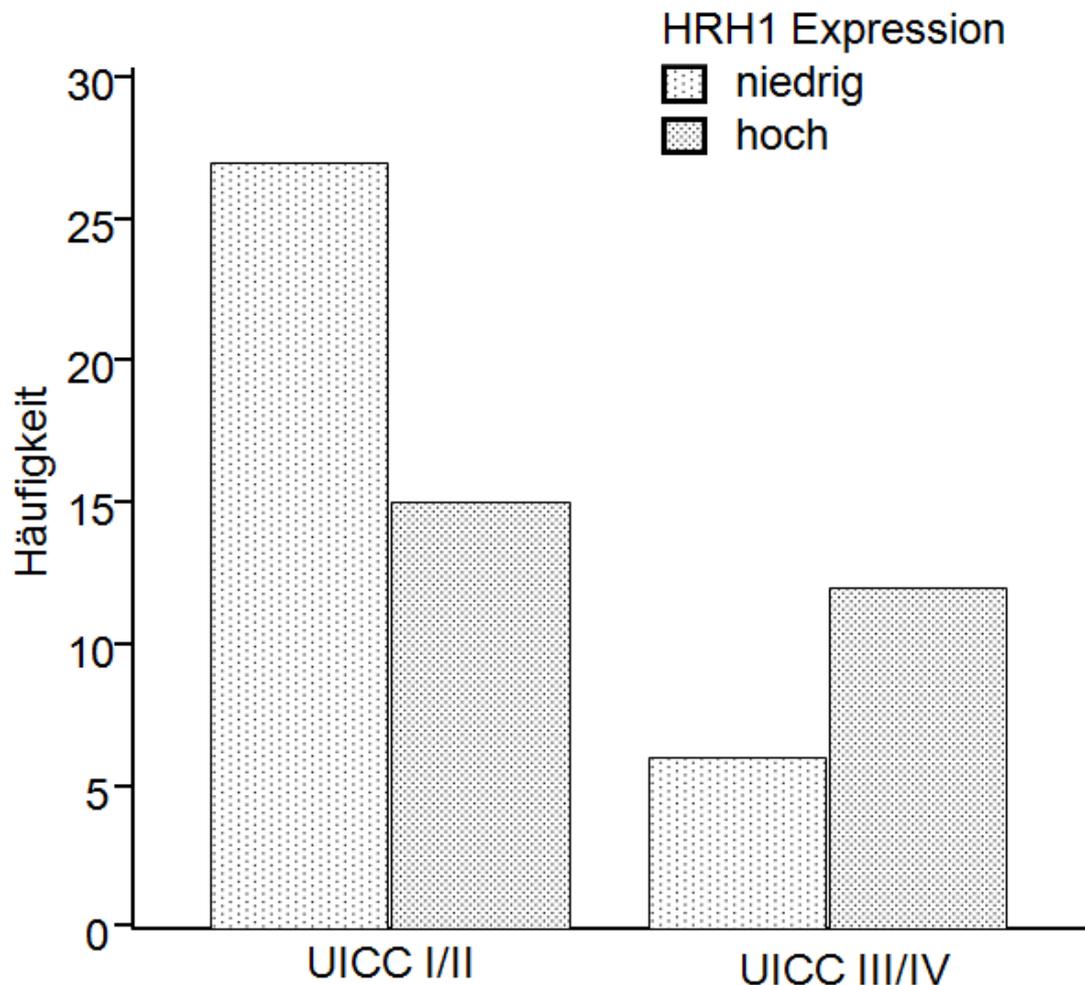
Auch wurde diese Korrelation zwischen der HRH1-Expression und der Differenzierung der Tumoren aufgezeigt:



**Abbildung 11: HRH1-Expression abhängig von der Differenzierung des Adenokarzinoms des Ösophagus: Angegeben wurde die absolute Häufigkeit der gefärbten Präparate mit Adenokarzinom des Ösophagus.**

Eine niedrige HRH1-Expression ging mit einer guten Differenzierung einher, hohe Expression wurde bei schlecht differenzierten Adenokarzinomen signifikant häufiger beobachtet ( $p = 0,0165$ ).

Schließlich wurde die Abhängigkeit der HRH1-Expression von der Einteilung in die gruppierten UICC-Stadien (I und II vs. III und IV) betrachtet:



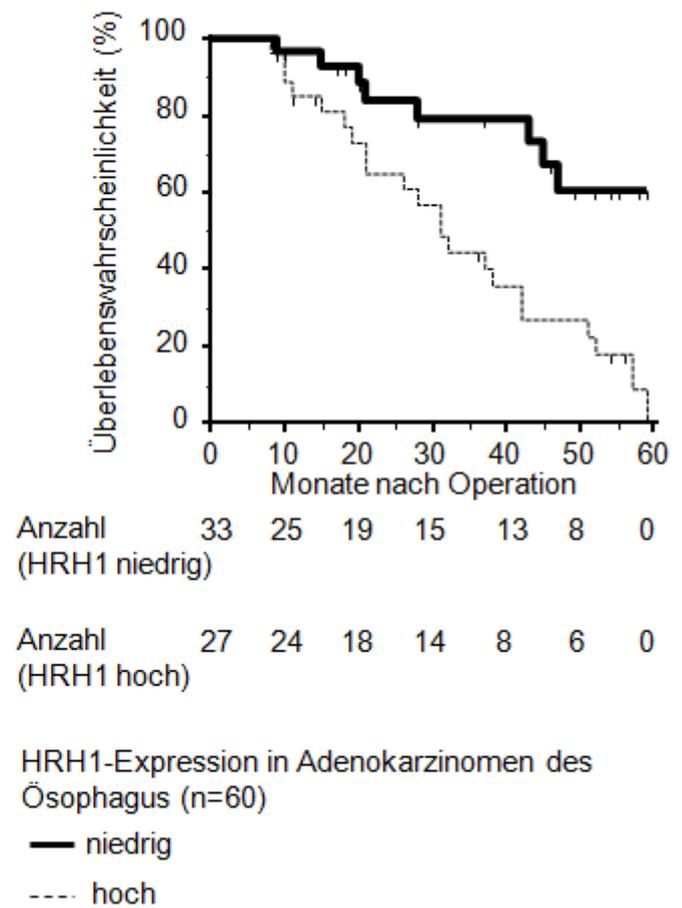
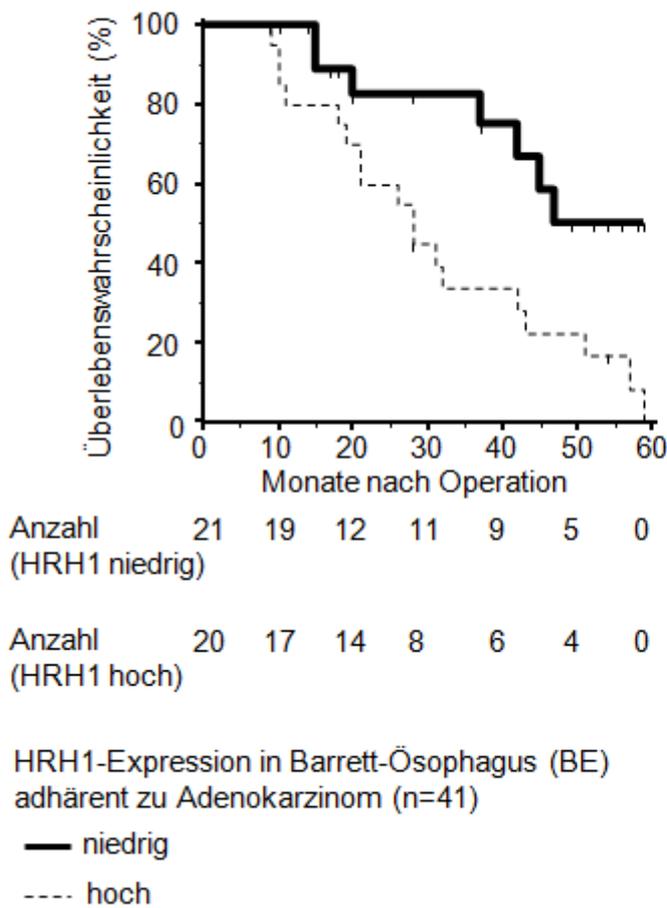
**Abbildung 12: HRH1-Expression abhängig von der gruppierten UICC-Einteilung des Adenokarzinoms des Ösophagus: Angegeben ist die absolute Häufigkeit.**

Patienten mit klinisch fortgeschrittenem Tumorleiden wiesen signifikant häufiger eine erhöhte HRH1-Expression auf ( $n=13/19$ , entsprechend 68,4% aller Proben), während Patienten mit frühem klinischem Stadium (UICC I/II) signifikant häufiger noch eine niedrigere HRH1-Expression zeigten ( $n=27/42$ , entsprechend 64% aller Proben). Folglich befanden sich  $n=27/33$ , d. h. 82% aller Patienten, mit niedriger HRH1-Expression noch im klinischen Stadium UICC I oder II.

### 3.5. Uni- und multivariate Überlebensanalysen

Die Arbeit untersuchte auch die Überlebenszeiten der operierten Patienten mit Adenokarzinom des Ösophagus mittels Kaplan-Meier-Analyse. Dies wurde jeweils univariat durchgeführt. Kriterium für die Stratifizierung in Gruppen für die univariate Analyse war die semiquantitative HRH1-Expression einerseits von adhärentem Barretepithel an Adenokarzinomausschnitten und andererseits von Karzinomgewebe.

Bei der univariaten Analyse der Zellen in einem dem Adenokarzinom adhärenen Barrett-Ösophagus zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Überlebenszeit bei hoher HRH1-Expression ( $p = 0,0074$ , HR 3,0522 bei KI 1,3896 zu 6,7043). Dies bedeutete, dass bei Patienten mit einem Adenokarzinom eine hohe HRH1-Expression im adhärenen Barrett-Ösophagus mit einer ungünstigen Prognose einherging. Im Fall des untersuchten Adenokarzinomgewebes war der Unterschied der Expression signifikant ( $p = 0,0007$ , HR 3,6280 bei KI 1,7614 zu 7,4727). Auch hier war die Prognose bei hoher HRH1-Expression ungünstig.



**Abbildung 13: Univariate Überlebenskurven nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der HRH1-Expression: Aufgezeigt wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der postoperativen Monate. Links wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit postoperativ anhand der semiquantitativen HRH1-Expression der den Adenokarzinomen adhärenz Barrett-Ösophagusschleimhaut (n=41) aufgezeigt, rechts wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit postoperativ anhand der semiquantitativen HRH1-Expression der untersuchten Adenokarzinomausschnitte (n=60) dargestellt. Tabellarisch aufgetragen war jeweils die absolute Zahl der Patienten zum Zeitpunkt.**

In der multivariaten Analyse verlor die T-Kategorie, das Grading und die Histaminrezeptorexpressionsrate ihre statistische Signifikanz. Nur der Nodalstatus (nodal positiv vs. nodal negativ) war in der Cox Regression statistisch signifikant und somit ein unabhängiger Prognosefaktor (siehe Tabelle 4 und Abbildung 14).

**Tabelle 4: Multivariate COX-Regressionsanalyse in Abhängigkeit der Parameter fortgeschrittener Tumor (pT3/4), positiver Nodalstatus, schlechte Differenzierung und hohe HRH1-Expression.**

Covariate	b	SE	p	HR	95% CI HR
pT3/4	0,1793	0,7652	0,8147	1,1964	0,2691 zu 5,3197
N+	1,9075	0,7914	0,0159	6,7365	1,4396 zu 31,5235
G3/4	0,6677	0,7883	0,397	1,9497	0,4191 zu 9,0689
HRH1 hoch	0,6469	0,4332	0,1354	1,9095	0,8205 zu 4,4440

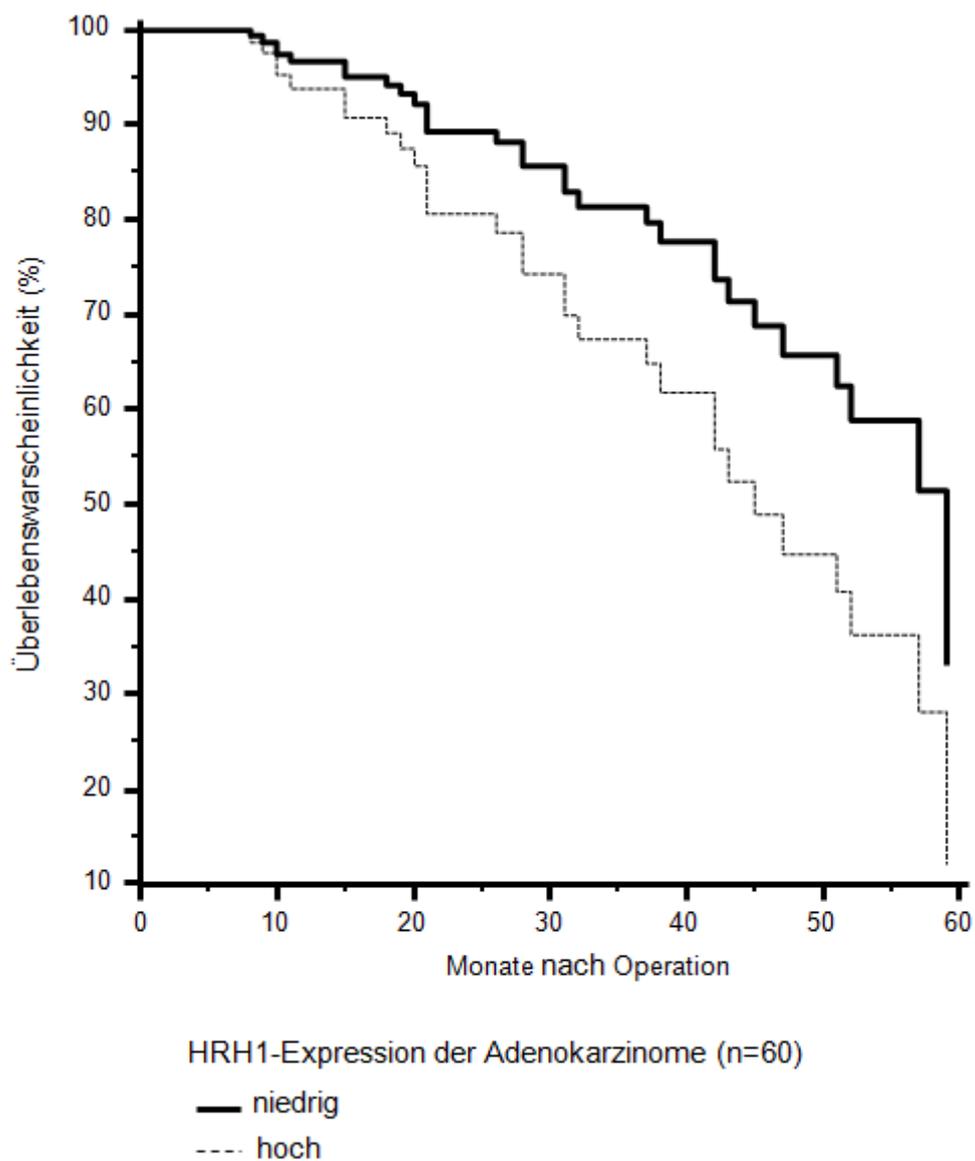


Abbildung 14: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier in der multivariaten Cox-Regression: Dargestellt war die prozentuale Überlebenschance in Abhängigkeit der postoperativen Monate und der semiquantitativen HRH1-Expression im Adenokarzinom des Ösophagus. Für die Covariate „hohe HRH1-Expression“ war die Überlebenszeit nicht signifikant ( $p=0,1354$  nach Log Rank Test).

### 3.6. Adenokarzinom-Zelllinie OE-33

Im Stimulationsexperiment zeigte sich unabhängig von der Inkubationszeit der Zellen mit Histamin unterschiedlicher Konzentrationen eine Suppression der HRH1-Genexpression, da in der qPCR die fold difference niedriger als 1 war.

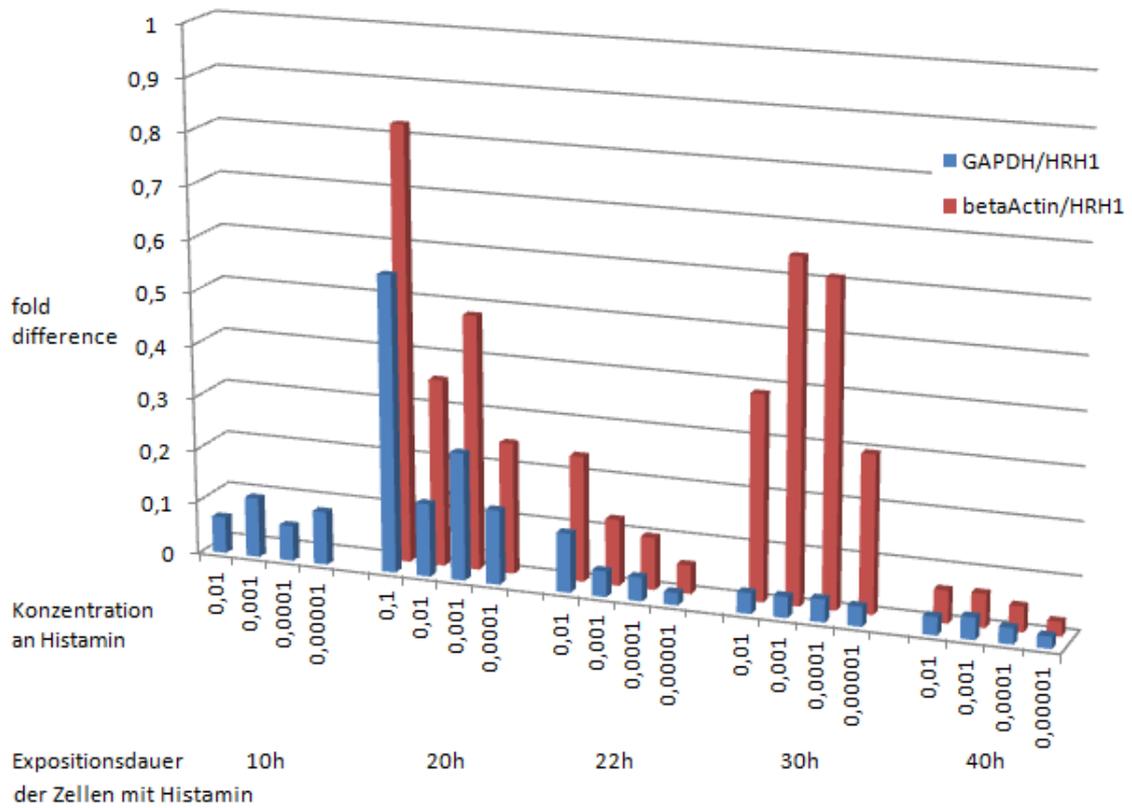
Die DNA-Mengen, die in diesem Experiment produziert werden, zeigten also die Veränderung des Gentranskripts, sprich die RNA-Menge an.

Bei 22h Exposition mit Histamin war die Suppression auch konzentrationsabhängig: Je geringer die Konzentration an Histamin zur Beeinflussung der Zellen, desto niedriger die detektierte DNA-Menge an HRH1. Verglichen wurde die DNA-Menge mit den Housekeeping-Genen GAPDH und Beta-Actin. Die HRH1-Genaktivität war somit geringer.

Bei 20h Expositionsdauer der Zellen in Histamin zeigte sich ein ähnliches Verhalten auf einem höheren Niveau, d. h. die Suppression war weit geringer, aber vorhanden.

Bei einer Expositionsdauer der Zellen in Histamin von 30h waren besonders die Unterschiede zwischen den zwei Housekeeping-Genen auffällig. Bei Beta-Actin als Housekeeping-Gen wurde eine größere „fold difference“ berechnet, d. h. es wurden im Vergleich zu GAPDH veränderte Konzentrationen zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen gemessen.

Bei 40h und 10h Expositionsdauer zeigte sich eine nahezu vollständige Suppression der HRH1-Genaktivität.



**Abbildung 15:** Darstellung der „fold difference“ in Abhängigkeit der Expositionsdauer der Zellen in Histamin, der Histaminkonzentration und des Housekeeping-Gens: Eine Suppression der HRH1-Genaktivität wurde über alle Expositionsauern und Histaminkonzentrationen, angegeben in mol/l, nachgewiesen.

## 4. Diskussion

### 4.1. Zusammenhang zwischen der Expression von Histamin-Rezeptor H1 in der Barrett-Metaplasie mit Dysplasie und Adenokarzinom

Die Arbeit untersuchte erstmalig retrospektiv an 60 Patienten, die wegen eines Adenokarzinoms des Ösophagus chirurgisch reseziert worden waren, die Expression des Histamin Rezeptors H1.

Besonders interessant waren hierbei die betrachteten adhärennten Ausschnitte mit Barrett-Metaplasie und dysplastischen Anteilen. Diese 41 Proben zeigten die Sequenz von der Präkanzerose der Barrett-Ösophagusschleimhaut, welche in mehreren Stufen in ein Adenokarzinom des Ösophagus übergeht, auf. Hier war die HRH1-Expression in den immunhistologischen Untersuchungen am höchsten.

Zur Vorstellung von der Pathogenese des Adenokarzinoms über einen chronischen Entzündungsprozess passte die Beobachtung, dass die hohe HRH1-Expression einen chronischen Entzündungsprozess in dem dysplastischen Anteil aufzeigte, der als ein Faktor des vielschichtigen Prozesses der Kanzerogenese das Entstehen des Adenokarzinoms des Ösophagus begünstigen könnte. Dieser Unterschied war signifikant zu allen anderen untersuchten Subgruppen, also zum einen zur Barrett-Metaplasie ohne Dysplasien, zum anderen zum adhärennten Adenokarzinom und zu den 19 Proben von Patienten ohne angrenzenden Barrett-Ösophagus. Betrachtete man alle 60 Proben mit Adenokarzinom des Ösophagus, so zeigte sich keine Signifikanz zwischen denjenigen mit adhärenntem Barrett-Ösophagus und den Proben, die mutmaßlich nicht der beschriebenen Sequenz folgten.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass der Entzündungsprozess, unterhalten durch Histamin, nach Entstehen eines Adenokarzinoms des Ösophagus abschwächt.

#### 4.2. Betrachtung der HRH1-Expression im Kontext anderer Entzündungsmediatoren und Proliferationsmarker am gastroösophagealen Übergang

Das Wachstum und die Entwicklung von Tumoren ist ein komplexer Vorgang, welcher von vielfältigen genetischen und epigenetischen Veränderungen ausgeht. Entwicklungen kanzerogener Prozesse waren auch, wie auch beim Barrett-Ösophagus, an Geweben sichtbar, die chronischen Entzündungsvorgängen unterlagen [84].

Es gibt verschiedene Modellvorstellungen für die Kanzerogenese: die hier aufgeführte Barrett Metaplasie-Dysplasie-Karzinomsequenz ist ein Modell für die Kanzerogenese des ösophagealen Adenokarzinoms neben dem Modell der Stammzellhypothese, das eine neue Theorie über den zellulären Ursprung und die Organisation von Tumoren postuliert [85].

Auch bei der Entwicklung des Ösophagus wurden Subpopulationen von Zellen identifiziert, die Eigenschaften von Stammzellen aufweisen [86]. Es gab Hinweise, dass einige Tumoren – ähnlich wie normales Gewebe – von solchen Zellen abstammten und unterhalten wurden, zum Beispiel beim Magenkarzinom [87]. Analog zu den Stammzellen des normalen Gewebes wurden diese speziellen Zellen der Tumoren als Krebsstammzellen bezeichnet.

Alle Modelle lieferten für unterschiedliche Gesichtspunkte eine Erklärung, konnten sich aber auch ergänzen. So konnte der Ursprung der Kanzerogenese bislang nicht klar eruiert werden: Am gastroösophagealen Übergang konnte die Migration von Magenepithelzellen in die Schleimhaut der Speiseröhre nicht ausgeschlossen werden, so dass dem Ursprung einer möglichen „Krebsstammzelle“ besondere Bedeutung zukommen könnte [88]. Als intestinaler Stammzellmarker wurde unter anderem hierbei LgR5 identifiziert [89, 90], ein Protein des Wnt-Signalwegs, welches sowohl in Magenkrebszellen als auch im Barrett-Ösophagus nachgewiesen wurde [91]. Hans Clevers identifizierte diesen G-Protein-gekoppelten Rezeptor näher im Magen: Einerseits befanden sich diese LgR5-positiven Zellen im Isthmusbereich, also zwischen Drüsen- und Trichterbereich, also am Ort, an dem die Zellproliferation

hauptsächlich stattfand. Andererseits zeigten Untersuchungen vom gleichen Autor, dass diese Zellen sich ähnlich der intestinalen Anordnung auch am Boden der Drüsenarchitektur nachweisen ließen. Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, dass sich LgR5-positive Zellen zu proliferativen Zellen differenzierten, welche zum Isthmusbereich migrierten und dort zur Proliferation und Aufrechterhaltung des Epithels entscheidend beitrugen.

Die eigenen Beobachtungen, nämlich die der Koexpression vom Proliferationsmarker Ki-67 und HRH1, ergänzten diese Betrachtungsweise mit mehreren koexistenten Erklärungsmodellen, so dass die Information über eine hohe HRH1-Expression zusätzlich auch für die Identifikation von „Stammzellen“ dienen könnte: Mit den gleichen histopathologischen Proben zeigte unsere Arbeitsgruppe die Expression dieses „Stammzellmarkers“ beim Adenokarzinom des Ösophagus [92], so dass diesen proliferierenden Zellen mit sowohl Nachweis einer Ki-67-Expression als auch HRH1-Expression und zusätzlich einer LgR5-Expression wohl eine besondere Bedeutung zukam. Der Ursprung dieser Zellen konnte dabei nicht eindeutig charakterisiert werden. Des Weiteren konnte dieses Ergebnis im Kontext mit der analog untersuchten Expression [93] von Matrixmetalloproteinasen (MMP1) gewertet werden: Matrix Metalloproteinasen spielten bei der Kanzerogenese im Modell der oben dargestellten Sequenz oder auch in einer Stammzellhypothese eine Rolle [94, 95]. Dies waren extrazelluläre Proteine, die die Matrix umbauten [96]. In einer analogen Untersuchung unserer Arbeitsgruppe zeigte sich, dass dieses Protein ebenfalls als präinvasiver Faktor in der Kanzerogenese angesehen werden konnte [93].

Abgrenzen ließ sich hierbei das erwartete Ergebnis, dass die Proben mit ösophagealem Plattenepithelkarzinom keine HRH1-Expression zeigten: Dies ist aus dem Ursprungsepithel entartetes Gewebe und stammte nicht vom intestinalen Epithel ab. Auch folgte es nicht der dargestellten histopathologischen Sequenz.

HRH1 sind durch selektive Antihistaminika beeinflussbar ähnlich wie die Cyclooxygenasen, wo bereits anhand von epidemiologischen großen Studien

ein sinkendes Krebsrisiko bei regelmäßiger Einnahme von nicht steroidalen Antirheumatika festgestellt wurde [97, 98]. Von *Rahden et al.* stellten die Expression von Cyclooxygenasen ebenfalls als einen Baustein des inflammatorischen Prozesses bei der Kanzerogenese des Adenokarzinoms des Ösophagus dar [99]. Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit und dem Vorliegen von Antihistaminika, die bei der Behandlung verschiedener akut entzündlicher Erkrankungen – vorwiegend allergischer Art – Standard waren, schien es somit Erklärungsmöglichkeiten zu geben, dass der Einsatz dieser Medikamente die Kanzerogenese zu einem Teil unterdrücken oder aufhalten könnte, wie am Beispiel des Magenkarzinoms zu sehen [100]. Diese Zellkulturstudie mit drei verschiedenen humanen Magenkarzinomzelllinien wies nach, dass Cimetidine, ein Histamin-Rezeptor 2 Antagonist, die Adhäsion dieser Zellen zu Endothelzellen supprimiert. Eigene Ergebnisse aus dem Zellkulturexperiment mit Stimulation durch Histamin sind analog zu dieser Studie zu sehen: Auch hier kam es zu einer Unterdrückung einer anderen tumorösen Funktion von Tumorzellen, der Proliferation. Neben dieser Zellkulturstudie gibt es mittlerweile es mehrere Arbeiten [101], die die Funktion von Histamin und die Histaminrezeptorregulation bei der Kanzerogenese untersuchten: Eine Übersichtsarbeit [102] kam zum Schluss, dass Antihistaminika eine geeignete Therapiemöglichkeit für Krebs sein könnten, jedoch eine Monotherapie einen geringeren Effekt zur vollständigen Eradikation von Krebszellen erwarten ließe, so dass eine Kombinationstherapie mit etablierten Chemotherapien angestrebt wurde. Jedoch war die Beeinflussung der Histaminrezeptorregulation an der Kanzerogenese momentan kontrovers diskutiert. Vor allem schien unabhängig von der Tumorentität die Rezeptorexpression des HRH1 unterschiedlich zu sein [103], so dass als eine Schlussfolgerung dieser Arbeit für jeden Tumor individuell der Nutzen der Pharmakotherapie anhand der Expression des Rezeptors untersucht werden sollte.

### 4.3. Vergleich der Ergebnisse mit anderen Tumorentitäten

Arbeiten zum Histamin-1 Rezeptor und der Kanzerogenese gab es zum Beispiel zum hepatozellulären Karzinom [104]. Hier stellten die Autoren die Beeinflussbarkeit einer Zelllinie des hepatozellulären Karzinoms durch Histamin dar und wiesen ein beschleunigtes Wachstum nach. Ein Ergebnis dieser Arbeit war die Suppression von Histamin-1-Rezeptor Expression auf RNA-Ebene und deckte sich somit mit dem Ergebnis der Zellkultur. Insgesamt zeigte sich die vorliegende Studie konklusiv zur Arbeit von *Valencia et al.*, die 2001 bei der Prostatakarzinomzelllinie DU-145 abhängig von der Zellzahl ein ähnliches Verhalten, nämlich die Hemmung der Proliferation, nachweisen konnten [77].

Auf Genomebene untersuchten *Wang et al.* [103] bei verschiedenen Tumoren die Expression von HRH1. Von den 153 getesteten Tumorproben unterschiedlicher Entitäten zeigten 23 eine Assoziation zwischen Genexpressionslevel und Prognose. Hierbei waren sehr unterschiedliche Tumore untersucht worden, unter anderem das kolorektale Karzinom mit der größten Stichprobenanzahl von 6 aus 50 Tumoren mit HRH1-Überexpression. Da auch hier Epithel aus dem Gastrointestinaltrakt entartete, waren Ähnlichkeiten festzustellen, nahm man das Barrett-Epithel als fakultativen Ursprung des distalen Adenokarzinoms des Ösophagus an.

Zusammenfassend war aber davon auszugehen, dass die Mechanismen, die der HRH1-Expression zugrunde lagen, multidimensional auch innerhalb einer Tumorentität waren, d. h. Histamin sowohl dadurch als Tumorsuppressor als auch als Tumorstimulans wirken könnte.

Im Gegensatz dazu schien bei konstant hohen Konzentrationen an Histamin die Unterdrückung der lokalen Immunantwort gegen Krebszellen im Vordergrund zu stehen, wie es auch ein Ergebnis dieser Arbeit im zellkulturellen Stimulationsexperiment darstellt: Die „fold difference“ war deutlich kleiner als 1 und somit konnte eine Suppression der HRH1-Genexpression der Tumorzelllinie durch Histamin abgeleitet werden. Hierzu war es nötig, die

Regulation der Histaminkonzentration in der Zelle und im Gewebe zu verstehen, welche allein durch die Beeinflussung der Histamindecarboxylase gesteuert werden konnte: Die Histamindecarboxylase ist das einzige Enzym des menschlichen Körpers, das Histamin aus L-Histidin herstellen kann [105]. Hierzu wurde die Hypothese vertreten, dass Histamin auch das Wachstum von Tumorzellen beeinflusste durch eine Überexpression dieses Enzyms, welches wahrscheinlich durch die Transkription des Protoonkogens c-fos gesteuert wurde [106]. Bereits 1988 hat eine Forschergruppe die Beeinflussung dieses Enzyms bei der Kanzerogenese des kolorektalen Karzinoms nachgewiesen [107]. Histamin wurde in unmittelbarer Nähe dieser Tumorzellen nachgewiesen, so dass hier ein sehr potentes proinflammatorisches Molekül die Zellvermehrung, welches durch die Aktivierung des Histaminrezeptors intrazellulär vermittelt wurde, aufhielt. Die Ergebnisse des eigenen Stimulationsexperiments deckten sich hierbei mit Forschungsergebnissen mit humanen Zellen: Histamin induzierte eine Verminderung der Expression von HRH1-Rezeptoren durch einen Desensibilisierungsmechanismus [108]. Allerdings waren die eigenen Ergebnisse des Stimulationsexperiments uneinheitlich: Theoretisch sollten die Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Housekeeping-Genen GAPDH und  $\beta$ -Actin klein sein, da diese Gene konstant von den Zellen exprimiert wurden. Jedoch war mittlerweile gezeigt worden, dass sich diese Methodik nicht auf eine Tumorzelle übertragen ließ [109]. Hypothetisch könnten so die eigenen Ergebnisse im Stimulationsexperiment möglicherweise nicht nur den sehr kleinen Probenmengen von 1  $\mu$ l geschuldet sein, so dass hier im Laufe des Experiments durch die Verdünnungskaskaden und Aufreinigungen kleine Unterschiede eine große Ungenauigkeit erzeugen konnten.

#### 4.4. Ungünstige Prognose für hohe HRH1-Expression

Die univariate Überlebensanalyse zeigte einen negativen prognostischen Effekt der HRH1-Expression im Adenokarzinom des Ösophagus. Patienten mit hoher HRH1-Expression hatten ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben. In der multivariaten Analyse verliert die HRH1-Expression ihre statistische Signifianz, d. h. der prognostische Effekt ist nicht unabhängig von anderen starken negativen Prädiktoren des Überlebens (pT3/4, N+, G3/4). Dies bedeutete, dass Tumoren, die aufgrund ihrer Nodal-Positivität eine schlechte Prognose hatten, nicht unbedingt auch die Tumore darstellten, die dieses inflammatorische Milieu mit hoher HRH1-Expression vorwiesen.

Der Lymphknotenstatus war bei der Patientengruppe mit Adenokarzinom des Ösophagus in der multivariaten Analyse nämlich der einzige unabhängige prognostische Parameter. Dieses Ergebnis deckte sich mit der Literatur:

In einem Review zur Rolle des positiven Nodalstatus beim Ösophaguskarzinom [110] fassten *Akutsu et al.* die Ergebnisse konkordant zu dieser Arbeit zusammen: Bei allen Entitäten des Ösophaguskarzinoms zeigte *Hsu et al.* [111] bei einem großen Patientenkollektiv den Lymphknotenstatus „negativ“ als unabhängigen prognostischen Parameter genauso auf wie es beim Adenokarzinom der Arbeitsgruppe um *Gu et al.* [112] gelang, den Lymphknotenstatus als prädiktiven Faktor herauszuarbeiten.

Zusätzlich zum ungünstigen prognostischen Effekt der HRH1-Expression in den Karzinomen fanden wir bei der Analyse der Ergebnisse Hinweise darauf, dass die HRH1-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“ bedingten Effekt interpretiert werden, wonach die Zellen in einem Bereich, der karzinogenen Einflüssen ausgesetzt war, leichter entarten können: Bei der Kanzerogenese von Lungenkrebs wurde dies beschrieben [113]. Möglicherweise ging eine erhöhte HRH1-Expression im

benachbarten Barrett-Ösophagus mit einer erhöhten zellulären karzinogenen Tendenz einher, die mit einem schlechteren Überleben assoziiert war. Analog zu dieser Arbeit stellten *Grimm et al.* [78] beim Oropharynxkarzinom eine hohe HRH1-Expression sogar als negativen unabhängigen Prognosefaktor dar.

#### 4.5. Einordnung der Häufigkeit der Barrett-Metaplasie bei Adenokarzinomen des Ösophagus

In der Analyse unterschied diese Arbeit zwischen Adenokarzinomen mit und ohne adhärentem Barrett-Epithel. Diese Subgruppen wurden im Hinblick darauf gebildet, ob sich mögliche Hinweise auf die Rolle der Barrett-Metaplasie in der Karzinogenese des Adenokarzinoms zeigten. Die Frage, wie häufig eine Präkanzerose in Form des Barrett-Ösophagus gefunden wurde, konnte so retrospektiv aufgearbeitet werden [36, 37].

In dieser Arbeit war bei zwei Drittel der Adenokarzinome histopathologisch Barrettschleimhaut nachweisbar. Ein Literaturvergleich ließ hier eine große Streuung bei ähnlichen Arbeiten mit unterschiedlicher Anzahl an untersuchten Adenokarzinomen erkennen: Während bei 38 untersuchten Karzinomen 87% ein Barrett-Epithel aufwiesen [114], zeigte die Arbeitsgruppe um *Sabel et al.* dies bei untersuchten 178 Patienten mit Adenokarzinom nur in 37% der Fälle [36]. Vorliegende eigene Arbeit ließ sich mit 68% Nachweis von adhärentem Barrett-Epithel mit zwei größeren Arbeiten von *Zhang et al.* [115] und *Lagergren et al.* [43] vergleichen: Hier waren bei 64% der 121 Patienten, respektive bei 62% der 189 Patienten Barrett-Ösophagusschleimhaut nachgewiesen worden. Es gab mehrere Hypothesen, die eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse lieferten: Bei größeren und lokal fortgeschrittenen Tumoren wurden seltener adhärente Barrett-Dysplasien nachgewiesen als bei kleineren Tumoren [36]: Eine mögliche Erklärung war die Verdrängung oder ein „Überwachsen“ des Tumors, so dass im Operationspräparat kein Barrett-Epithel detektiert werden konnte [114]. Bei neoadjuvanter Behandlung lokal fortgeschrittener Tumore zeigten *Theisen et al.* einen deutlich höheren Anteil der Barrett-

Dysplasien, so dass womöglich das Adenokarzinom die Barrett-Ösophagusschleimhaut „versteckt“ [116]. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass bei der Ösophagoduodenoskopie sehr kleine Bezirke an Barrett-Schleimhaut übersehen werden, die Ursprung der Karzinome sind [117].

Aufgrund dieser retrospektiv unzureichenden Beschreibung der Patientenkohorte mit dem höchsten Risiko für Adenokarzinome des Ösophagus wurde die Surveillance heftig diskutiert, wie eingangs beschrieben: Zum Beispiel war in Japan die Bereitschaft der Bevölkerung zur Gastroskopie als Vorsorgemaßnahme – aufgrund der hohen Inzidenz an Magenkarzinomen – sehr hoch [118]. Deswegen wurden hier auch viele auffällige Befunde am Ösophagus beschrieben [119]. Durch die gewonnenen und zu gewinnenden Erkenntnisse daraus kann in Zukunft die Kanzerogenese des Adenokarzinoms des Ösophagus möglicherweise besser charakterisiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Das Adenokarzinom des distalen Ösophagus war ein Tumor von wachsender klinischer Bedeutung, aufgrund eines weitestgehend unerklärten Inzidenzanstiegs bei weißen Männern in der westlichen Welt. Die Karzinogenese folgte einer gut charakterisierten Sequenz histopathologischer Veränderungen, ausgehend von der als Präkanzerose angenommenen Barrett-Metaplasie. Hauptrisikofaktor war der chronisch schädigende Effekt von gastroösophagealem Reflux, der den zur Karzinogenese führenden Inflammationsprozess unterhielt, weshalb das Adenokarzinom des distalen Ösophagus auch als weiteres Modell für „Inflammation & Kanzerogenese“ dienen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Bedeutung des in der Inflammation bedeutenden Histaminstoffwechsels untersucht.

Es wurden 88 Patientenproben des Ösophagus, davon 60 Patienten mit operiertem Adenokarzinom des Ösophagus immunhistochemisch untersucht und mit einem Histamin-1 Rezeptor Antikörper gefärbt. Die operierten Patienten wurden nachbeobachtet und so die Überlebenskurven in Abhängigkeit der Histaminrezeptorexpression angefertigt. Ein Stimulationsexperiment unter zeitabhängiger Histamineinwirkung mit einer Adenokarzinomzelllinie des Ösophagus untersuchte den quantitativen Nachweis von Histamin-1 Rezeptor-RNA.

Mittels immunhistochemischen Färbungen an Adenokarzinomen mit adhärenter Barrett-Metaplasie vergleichend mit Barrett-Metaplasie aus Probeexzisionen und Plattenepithelkarzinomen zeigte diese Arbeit signifikant eine hohe HRH1-Expression bei adhärentem Barrett-Ösophagus im Vergleich zu allen anderen Gruppen. HRH1 war nicht in gesunder Schleimhaut, im Barrettösophagus ohne Dysplasie und auch nicht im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus nachweisbar. Auch zeigte sich eine Koexpression von HRH1 mit dem etablierten Proliferationsmarker Ki-67 bei Barrett-Ösophagi mit Dysplasie. Eine hohe HRH1-Expression fand sich bevorzugt und statistisch signifikant bei lokal

fortgeschrittenen Tumoren (T3, T4), dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N1-3) und einer schlechten Differenzierung des Tumors (G3/G4).

Dies zeigte sich in der Prognose der Patienten: eine hohe HRH1-Expression war mit einer erhöhten statistisch signifikanten 5-Jahres-Mortalität verbunden. In einem zellkulturellen Stimulationsexperiment ergaben sich erste Hinweise auf eine Suppression der HRH1-Genaktivität unter Histamineinwirkung.

Die HRH1-Expression könnte aufgrund der Ergebnisse der Studie durchaus einen klinischen Prognosefaktor für das Überleben der Patienten darstellen, wobei dies allerdings in der multivariaten Analyse nicht die gesetzte Signifikanzschwelle erreichte.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut, *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015. **10. Auflage**.
2. van Blankenstein, M., *Barrett's esophagus: so what!* Dis Esophagus, 2002. **15**(1): p. 1-4.
3. Kastelein, F., et al., *Surveillance in patients with long-segment Barrett's oesophagus: a cost-effectiveness analysis*. Gut, 2015. **64**(6): p. 864-71.
4. Spechler, S.J. and R.F. Souza, *Barrett's esophagus*. N Engl J Med, 2014. **371**(9): p. 836-45.
5. Shaheen, N.J., et al., *ACG Clinical Guideline: Diagnosis and Management of Barrett's Esophagus*. Am J Gastroenterol, 2016. **111**(1): p. 30-50; quiz 51.
6. Porschen, R., et al., *Leitlinie zur Diagnostik und Behandlung von Ösophaguskarzinomen*. Z Gastroenterol, 2015. **53**(11): p. 1288-347.
7. Koop, H., et al., *Leitlinie Gastroösophageale Refluxkrankheit [S2k guideline: gastroesophageal reflux disease guided by the German Society of Gastroenterology: AWMF register no. 021-013]*. Z Gastroenterol, 2014. **52**(11): p. 1299-346.
8. Nishimaki, T., et al., *Evaluation of the accuracy of preoperative staging in thoracic esophageal cancer*. Ann Thorac Surg, 1999. **68**(6): p. 2059-64.
9. Ahmed Absi, D.J.A., Thomas Rice. *Esophageal Cancer*. 2012; Available from:  
<http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/esophageal-cancer/>.
10. Dickinson, K.J., et al., *Esophagectomy Outcomes in the Endoscopic Mucosal Resection Era*. Ann Thorac Surg, 2017. **103**(3): p. 890-897.
11. Blackham, A.U., et al., *The prognostic value of residual nodal disease following neoadjuvant chemoradiation for esophageal cancer in patients with complete primary tumor response*. J Surg Oncol, 2015. **112**(6): p. 597-602.

12. Gockel, I., et al., *Risk of lymph node metastasis in submucosal esophageal cancer: a review of surgically resected patients*. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011. **5**(3): p. 371-84.
13. Natsugoe, S., et al., *Micrometastasis and tumor cell microinvolvement of lymph nodes from esophageal squamous cell carcinoma: frequency, associated tumor characteristics, and impact on prognosis*. *Cancer*, 1998. **83**(5): p. 858-66.
14. Mueller, J.D., et al., *Frequency and clinical impact of lymph node micrometastasis and tumor cell microinvolvement in patients with adenocarcinoma of the esophagogastric junction*. *Cancer*, 2000. **89**(9): p. 1874-82.
15. Siewert, J.R., et al., *Histologic tumor type is an independent prognostic parameter in esophageal cancer: lessons from more than 1,000 consecutive resections at a single center in the Western world*. *Ann Surg*, 2001. **234**(3): p. 360-7; discussion 368-9.
16. J. R: Siewert (Hrsg.), H.J.S.H., *Chirurgie*. 9. Auflage ed. 2012: Springer.
17. de Jonge, P.J., et al., *Barrett's oesophagus: epidemiology, cancer risk and implications for management*. *Gut*, 2014. **63**(1): p. 191-202.
18. Spechler, S.J., *Clinical practice. Barrett's Esophagus*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(11): p. 836-42.
19. Blank, S., et al., *Preoperative therapy of esophagogastric cancer: the problem of nonresponding patients*. *Langenbecks Arch Surg*, 2013. **398**(2): p. 211-20.
20. Wittekind, C., *[2010 TNM system: on the 7th edition of TNM classification of malignant tumors]*. *Pathologe*, 2010. **31**(5): p. 331-2.
21. Pohl, H., B. Sirovich, and H.G. Welch, *Esophageal adenocarcinoma incidence: are we reaching the peak?* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010. **19**(6): p. 1468-70.
22. Blot, W.J., et al., *Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia*. *JAMA*, 1991. **265**(10): p. 1287-9.

23. Blot, W.J., S.S. Devesa, and J.F. Fraumeni, Jr., *Continuing climb in rates of esophageal adenocarcinoma: an update*. JAMA, 1993. **270**(11): p. 1320.
24. Blot, W.J. and J.K. McLaughlin, *The changing epidemiology of esophageal cancer*. Semin Oncol, 1999. **26**(5 Suppl 15): p. 2-8.
25. Fitzgerald, R.C., et al., *British Society of Gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of Barrett's oesophagus*. Gut, 2014. **63**(1): p. 7-42.
26. Stein, H.J., M. Feith, and J.R. Siewert, *Cancer of the esophagogastric junction*. Surg Oncol, 2000. **9**(1): p. 35-41.
27. Zheng, S., et al., *Northwestern China: a place to learn more on oesophageal cancer. Part one: behavioural and environmental risk factors*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2010. **22**(8): p. 917-25.
28. Triadafilopoulos, G., *Acid and bile reflux in Barrett's esophagus: a tale of two evils*. Gastroenterology, 2001. **121**(6): p. 1502-6.
29. Falk, G.W., *Updated Guidelines for Diagnosing and Managing Barrett Esophagus*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2016. **12**(7): p. 449-51.
30. Barrett, N.R., *Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'*. Br J Surg, 1950. **38**(150): p. 175-82.
31. Allison, P.R. and A.S. Johnstone, *The oesophagus lined with gastric mucous membrane*. Thorax, 1953. **8**(2): p. 87-101.
32. Cohen, B.R., et al., *Correlation of Manometric, Oesophagoscopy, and Radiological Findings in the Columnar-Lined Gullet (Barrett Syndrome)*. Gut, 1963. **4**: p. 406-12.
33. Morson, B.C. and J.R. Belcher, *Adenocarcinoma of the oesophagus and ectopic gastric mucosa*. Br J Cancer, 1952. **6**(2): p. 127-30.
34. Adler, R.H., *The lower esophagus lined by columnar epithelium. Its association with hiatal hernia, ulcer, stricture, and tumor*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1963. **45**: p. 13-34.
35. Phillips, W.A., et al., *Barrett's esophagus*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26**(4): p. 639-48.

36. Sabel, M.S., et al., *Adenocarcinoma of the esophagus with and without Barrett mucosa*. Arch Surg, 2000. **135**(7): p. 831-5; discussion 836.
37. de Jonge, P.J., et al., *Risk of malignant progression in patients with Barrett's oesophagus: a Dutch nationwide cohort study*. Gut, 2010. **59**(8): p. 1030-6.
38. Shaheen, N.J., et al., *Is there publication bias in the reporting of cancer risk in Barrett's esophagus?* Gastroenterology, 2000. **119**(2): p. 333-8.
39. Bhat, S., et al., *Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(13): p. 1049-57.
40. Hvid-Jensen, F., et al., *Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus*. N Engl J Med, 2011. **365**(15): p. 1375-83.
41. Jamieson, G.G., *Antireflux surgery, barrett esophagus, and adenocarcinoma: there is still room for doubt*. Ann Surg, 2007. **246**(1): p. 22-3.
42. Williamson, W.A., et al., *Effect of antireflux operation on Barrett's mucosa*. Ann Thorac Surg, 1990. **49**(4): p. 537-41; discussion 541-2.
43. Lagergren, J., et al., *Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma*. N Engl J Med, 1999. **340**(11): p. 825-31.
44. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
45. Kumar, D.R., et al., *Virchow's contribution to the understanding of thrombosis and cellular biology*. Clin Med Res, 2010. **8**(3-4): p. 168-72.
46. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
47. Grivennikov, S.I. and M. Karin, *Inflammation and oncogenesis: a vicious connection*. Curr Opin Genet Dev, 2010. **20**(1): p. 65-71.
48. Colotta, F., et al., *Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability*. Carcinogenesis, 2009. **30**(7): p. 1073-81.

49. Mantovani, A., *Cancer: Inflaming metastasis*. Nature, 2009. **457**(7225): p. 36-7.
50. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
51. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
52. Crohn, H.R.u.B., *The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis (non-specific)*. American Journal Medical Science, : p. 220–8.
53. Hussain, S.P. and C.C. Harris, *Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials*. Int J Cancer, 2007. **121**(11): p. 2373-80.
54. de Martel, C., et al., *Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis*. Lancet Oncol, 2012. **13**(6): p. 607-15.
55. zur Hausen, H., *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 342-50.
56. Eaden, J.A., K.R. Abrams, and J.F. Mayberry, *The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis*. Gut, 2001. **48**(4): p. 526-35.
57. Collazos, J., *Risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver diseases*. N Engl J Med, 1993. **329**(25): p. 1896-7; author reply 1897-8.
58. Bornschein, J., et al., *H. pylori infection is a key risk factor for proximal gastric cancer*. Dig Dis Sci, 2010. **55**(11): p. 3124-31.
59. Chang, R.S., V.T. Tran, and S.H. Snyder, *Heterogeneity of histamine H1-receptors: species variations in [3H]mepyramine binding of brain membranes*. J Neurochem, 1979. **32**(6): p. 1653-63.
60. Black, J.W., et al., *Definition and antagonism of histamine H2 -receptors*. Nature, 1972. **236**(5347): p. 385-90.
61. Arrang, J.M., M. Garbarg, and J.C. Schwartz, *Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor*. Nature, 1983. **302**(5911): p. 832-7.

62. Nakamura, T., et al., *Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **279**(2): p. 615-20.
63. Panula, P., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors*. *Pharmacol Rev*, 2015. **67**(3): p. 601-55.
64. Masini, E., et al., *Histamine and histidine decarboxylase up-regulation in colorectal cancer: correlation with tumor stage*. *Inflamm Res*, 2005. **54 Suppl 1**: p. S80-1.
65. Francis, H., et al., *Histamine regulation of biliary proliferation*. *J Hepatol*, 2012. **56**(5): p. 1204-6.
66. Francis, T., et al., *Histamine regulation of pancreatitis and pancreatic cancer: a review of recent findings*. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2013. **2**(4): p. 216-26.
67. Kubes, P. and S. Kanwar, *Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event*. *J Immunol*, 1994. **152**(7): p. 3570-7.
68. Shimamura, T., et al., *Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin*. *Nature*, 2011. **475**(7354): p. 65-70.
69. van Ruitenbeek, P., et al., *Histamine H1 receptor blockade predominantly impairs sensory processes in human sensorimotor performance*. *Br J Pharmacol*, 2009. **157**(1): p. 76-85.
70. Thurmond, R.L., E.W. Gelfand, and P.J. Dunford, *The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(1): p. 41-53.
71. Zuberbier, T., et al., *The EAACI/GA(2) LEN/EDF/WAO Guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria: the 2013 revision and update*. *Allergy*, 2014. **69**(7): p. 868-87.
72. Cianchi, F., M.C. Vinci, and E. Masini, *Histamine in cancer: the dual faces of the coin*. *Cancer Biol Ther*, 2008. **7**(1): p. 36-7.
73. von Mach-Szczypinski, J., et al., *Metabolism of histamine in tissues of primary ductal breast cancer*. *Metabolism*, 2009. **58**(6): p. 867-70.

74. Cricco, G., et al., *Histamine inhibits cell proliferation and modulates the expression of Bcl-2 family proteins via the H2 receptor in human pancreatic cancer cells*. *Anticancer Res*, 2006. **26**(6B): p. 4443-50.
75. Cricco, G., et al., *Histamine modulates cellular events involved in tumour invasiveness in pancreatic carcinoma cells*. *Inflamm Res*, 2006. **55** **Suppl 1**: p. S83-4.
76. Wang, Z.Y., et al., *Nerve growth factor and receptors are significantly affected by histamine stimulus through H1 receptor in pancreatic carcinoma cells*. *Mol Med Rep*, 2010. **3**(1): p. 103-9.
77. Valencia, S., et al., *Histamine H(1) receptor activation inhibits the proliferation of human prostatic adenocarcinoma DU-145 cells*. *Prostate*, 2001. **48**(3): p. 179-87.
78. Grimm, M., et al., *Prognostic value of histamine H1 receptor expression in oral squamous cell carcinoma*. *Clin Oral Investig*, 2013. **17**(3): p. 949-55.
79. Christian Wittekind (Hrsg.), H.A.H., James D. Brierley (Hrsg.), *TNM Atlas, 6th Edition*. 2014.
80. Cricco, G.P., et al., *Histamine as an autocrine growth factor in experimental mammary carcinomas*. *Agents Actions*, 1994. **43**(1-2): p. 17-20.
81. Jeannin, P., et al., *Histamine induces interleukin-8 secretion by endothelial cells*. *Blood*, 1994. **84**(7): p. 2229-33.
82. Kaplan, E., *Nonparametric estimation from incomplete observations*. *J American Statist Assn*, 1958. **53**(282): p. 457.
83. R. Cox, *Regression Models and Life-Tables*. *Journal of the Royal Statistical Society*, 1972. **34**(2): p. 187-220.
84. Medina, V.A. and E.S. Rivera, *Histamine receptors and cancer pharmacology*. *Br J Pharmacol*, 2010. **161**(4): p. 755-67.
85. Mavroudi, M., et al., *Stem cells' guided gene therapy of cancer: New frontier in personalized and targeted therapy*. *J Cancer Res Ther*, 2014. **2**(1): p. 22-33.

86. Zhang, Y., et al., *Development and stem cells of the esophagus*. Semin Cell Dev Biol, 2017. **66**: p. 25-35.
87. Bekaii-Saab, T. and B. El-Rayes, *Identifying and targeting cancer stem cells in the treatment of gastric cancer*. Cancer, 2017. **123**(8): p. 1303-1312.
88. Lavery, D.L., et al., *The stem cell organisation, and the proliferative and gene expression profile of Barrett's epithelium, replicates pyloric-type gastric glands*. Gut, 2014. **63**(12): p. 1854-63.
89. Becker, L., Q. Huang, and H. Mashimo, *Lgr5, an intestinal stem cell marker, is abnormally expressed in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma*. Dis Esophagus, 2010. **23**(2): p. 168-74.
90. Becker, L., Q. Huang, and H. Mashimo, *Immunostaining of Lgr5, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue*. ScientificWorldJournal, 2008. **8**: p. 1168-76.
91. Zheng, Z.X., et al., *Intestinal stem cell marker LGR5 expression during gastric carcinogenesis*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(46): p. 8714-21.
92. von Rahden, B.H., et al., *LgR5 expression and cancer stem cell hypothesis: clue to define the true origin of esophageal adenocarcinomas with and without Barrett's esophagus?* J Exp Clin Cancer Res, 2011. **30**: p. 23.
93. Grimm, M., et al., *MMP-1 is a (pre-)invasive factor in Barrett-associated esophageal adenocarcinomas and is associated with positive lymph node status*. J Transl Med, 2010. **8**: 99.
94. Bradbury, P.A., et al., *Matrix metalloproteinase 1, 3 and 12 polymorphisms and esophageal adenocarcinoma risk and prognosis*. Carcinogenesis, 2009. **30**(5): p. 793-8.
95. Murray, G.I., et al., *Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer*. J Pathol, 1998. **185**(3): p. 256-61.
96. Zhang, H.Y., S.J. Spechler, and R.F. Souza, *Esophageal adenocarcinoma arising in Barrett esophagus*. Cancer Lett, 2009. **275**(2): p. 170-7.

97. Thun, M.J., S.J. Henley, and C. Patrono, *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(4): p. 252-66.
98. Wang, R., et al., *Chemoprevention of cancers in gastrointestinal tract with cyclooxygenase 2 inhibitors*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(1): p. 115-25.
99. von Rahden, B.H., et al., *Coexpression of cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and vascular endothelial growth factors (VEGF-A, VEGF-C) in esophageal adenocarcinoma*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5038-44.
100. Liu, F.R., et al., *Cimetidine inhibits the adhesion of gastric cancer cells expressing high levels of sialyl Lewis x in human vascular endothelial cells by blocking E-selectin expression*. Int J Mol Med, 2011. **27**(4): p. 537-44.
101. V.A. Medina, et al., *Histamine receptors as potential therapeutic targets for cancer drug development*. Drug development - a case study based insight into modern strategies, 2011: p. 75-100.
102. Faustino-Rocha, A.I., et al., *Antihistamines as promising drugs in cancer therapy*. Life Sci, 2017. **172**: p. 27-41.
103. Wang, M., et al., *Integrative genomic analyses of the histamine H1 receptor and its role in cancer prediction*. Int J Mol Med, 2014. **33**(4): p. 1019-26.
104. Lampiasi, N., et al., *Histamine and spontaneously released mast cell granules affect the cell growth of human hepatocellular carcinoma cells*. Exp Mol Med, 2007. **39**(3): p. 284-94.
105. Hough, L.B., *Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(3): p. 415-9.
106. Wang, L.D., et al., *Activation of the human histamine H2 receptor is linked to cell proliferation and c-fos gene transcription*. Am J Physiol, 1997. **273**(6 Pt 1): p. C2037-45.

107. Garcia-Caballero, M., et al., *Increased histidine decarboxylase (HDC) activity in human colorectal cancer: results of a study on ten patients.* Agents Actions, 1988. **23**(3-4): p. 357-60.
108. Horio, S., et al., *Identification of amino acid residues responsible for agonist-induced down-regulation of histamine H(1) receptors.* J Pharmacol Sci, 2004. **94**(4): p. 410-9.
109. Oparina, N.Y., et al., *[Differential expression of genes that encode glycolysis enzymes in kidney and lung cancer in humans].* Genetika, 2013. **49**(7): p. 814-23.
110. Akutsu, Y. and H. Matsubara, *The significance of lymph node status as a prognostic factor for esophageal cancer.* Surg Today, 2011. **41**(9): p. 1190-5.
111. Hsu, W.H., et al., *The metastatic lymph node number and ratio are independent prognostic factors in esophageal cancer.* J Gastrointest Surg, 2009. **13**(11): p. 1913-20.
112. Gu, Y., et al., *The number of lymph nodes with metastasis predicts survival in patients with esophageal or esophagogastric junction adenocarcinoma who receive preoperative chemoradiation.* Cancer, 2006. **106**(5): p. 1017-25.
113. Gazdar, A.F. and J.D. Minna, *Multifocal lung cancers--clonality vs field cancerization and does it matter?* J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(8): p. 541-3.
114. Chandrasoma, P., et al., *Is intestinal metaplasia a necessary precursor lesion for adenocarcinomas of the distal esophagus, gastroesophageal junction and gastric cardia?* Dis Esophagus, 2007. **20**(1): p. 36-41.
115. Zhang, X., et al., *Outcome of oesophagectomy for adenocarcinoma of the oesophagus and oesophagogastric junction.* ANZ J Surg, 2005. **75**(7): p. 513-9.
116. Theisen, J., et al., *Preoperative chemotherapy unmasks underlying Barrett's mucosa in patients with adenocarcinoma of the distal esophagus.* Surg Endosc, 2002. **16**(4): p. 671-3.

117. Pohl, H., et al., *Length of Barrett's oesophagus and cancer risk: implications from a large sample of patients with early oesophageal adenocarcinoma*. Gut, 2016. **65**(2): p. 196-201.
118. Sugano, K., *Screening of gastric cancer in Asia*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2015. **29**(6): p. 895-905.
119. Matsushashi, N., et al., *Surveillance of patients with long-segment Barrett's esophagus: A multicenter prospective cohort study in Japan*. J Gastroenterol Hepatol, 2017. **32**(2): p. 409-414.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

BE	Barrett's Esophagus, Barrett-Epithel
BSA	bovine serum albumin, Serumalbumin von Rindern
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ct	threshold cycle, Schwellenzyklus
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAC	esophageal adenocarcinoma, ösophageales Adenokarzinom
ESCC	esophageal squamous-cell carcinoma, ösophageales Plattenepithelkarzinom
EUS	endoscopic ultrasound, endoskopische Sonographie
FBS	fetal bovine serum, fetales Rinderserum
FD	fold difference, relativer Quantifizierungswert
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GERD	gastroesophageal reflux disease, gastroösophageale Refluxkrankheit
GPCR	G-protein coupled receptor, G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
Gl.	Glandulae, Drüsen
GTP	Guanosintriphosphat
HRH1	Histamin Rezeptor H1
HRP	horseradish peroxidase, Peroxidase aus Meerrettich extrahiert
HPF	High power Field, hochaufgelöstes Untersuchungsfeld
HPV	Humane Papilloma Viren
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Internationale Klassifikation der Krankheiten

IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IQR	interquartile range, Interquartilspannweite
KI	Konfidenzintervall
LgR5	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 G-Protein gekoppelter Rezeptor, der eine Leucinreiche Wiederholungssequenz enthält
MMP1	Matrix-Metalloproteinase 1
NG	Normalgewebe (nicht stimuliert)
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
RNA	Ribonukleinsäure
RKI	Robert Koch Institut, Berlin
RT	Raumtemperatur
qPCR	real-time quantitative reverse transcription-polymerase- chain-reaction, quantitative Echtzeit-PCR
TBS	Tris-buffered saline, Salzlösung gepuffert mit Tris
TG	Tumorgewebe (stimuliert)
UICC	Union internationale contre le cancer, Internationale Vereinigung gegen Krebs
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

## Danksagung

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Burkhard H. A. von Rahden für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Übernahme des Referates und hilfreiche Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Privatdozent Dr. Dr. Grimm und Frau Müller für die Betreuung im Labor des Zentrums für operative Medizin an der Universitätsklinik Würzburg.

Bei Frau Dipl.-Math. Sabine Karl bedanke ich mich für die wertvollen Anregungen und Hilfestellungen bei der statistischen Auswertung.

Der größte Dank gilt meiner Familie, Ihnen bin ich von Herzen dankbar für den moralischen Rückhalt und jegliche Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit.