

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. C.T. Germer

**Bedeutung der Expression von MMP-1 und MMP-13 beim Barrett
assoziierten Adenokarzinom**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Luisa Zeeb
aus Ulm

Würzburg, März 2019

mit Überarbeitungen vom September 2021



Referent: Prof. Dr. med. Burkhard von Rahden
Korreferent: Prof. Dr. med. Alexander Meining
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2022

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie Ösophaguskarzinom	1
1.2	Patientencharakteristik und Risikofaktoren.....	3
1.3	Stadieneinteilung und Prognose	3
1.4	Barrett-Ösophagus und Adenkarzinome des gastroösophagealen Übergangs	6
1.5	Pathogenese des Barrett-Ösophagus und des ösophagealen Adenokarzinoms	7
1.6	Tumorbiologie	9
1.7	Matrix-Metalloproteasen und potentielle Rolle in der Mehrstufenkarzinogenese.....	10
1.8	Cdx-2	12
1.9	Ki-67	13
1.10	Zielsetzung der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Patientenauswahl	15
2.2	Histopathologische Analyse, Tumor Staging	16
2.3	Zellkultur	17
2.4	Immunhistochemie.....	17
2.5	Immunfluoreszenz	18
2.6	Doppelfärbung	19
2.7	Quantifizierung der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	20
2.8	Real-Time-RT-Polymerase-Kettenreaktion	20
2.9	Statistische Analyse.....	23
3	Ergebnisse	25
3.1	MMP-1- und MMP-13-Expression im Zusammenhang mit BE und EAC	25
3.2	Analyse von MMP-1 Genexpression.....	28
3.3	Korrelation von MMP-1-Expression und Zellproliferation.....	29
3.4	Prognostischer Wert von MMP-1 in Adenokarzinomen	31
4	Diskussion	35

5	Zusammenfassung.....	42
6	Abkürzungen	44
7	Literaturverzeichnis	46

1 Einleitung

Die in der Speiseröhre des Menschen vorkommenden Krebsarten entwickeln sich aus unterschiedlichen Epithelzellen und lassen sich so histopathologisch in die zwei Haupttypen Plattenepithelkarzinom (ESCC) und Adenokarzinom (EAC) unterteilen. Diese beiden Entitäten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Epidemiologie, Ätiologie und Prognose [1]. Die Inzidenz des Adenokarzinoms ist in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen und somit kommt dieser Entität eine zunehmende klinische Bedeutung zu. Hinzu kommt, dass das Ösophaguskarzinom eine schlechte Prognose hat und Heilungschancen auf frühe Tumorstadien beschränkt sind. Das ESCC kann in jedem Abschnitt des Ösophagus entstehen, während das EAC fast ausschließlich im distalen Drittel des Ösophagus entsteht [2].

1.1 Epidemiologie Ösophaguskarzinom

Nach der Statistik des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg (DKFZ) stand im Jahr 2010 der Speiseröhrenkrebs bei Männern an neunter Stelle der häufigsten Krebstodesursachen [3]. Laut dem Krebsregister „Krebs in Deutschland“ des Robert Koch Instituts (RKI) verursachte das Ösophaguskarzinom 2009/2010 3% aller Krebssterbefälle der Männer und 1% der Frauen. Das Erkrankungsrisiko steigt mit dem Alter, wobei Männer mit 66 Jahren im Mittel vier Jahre früher als Frauen erkranken [4]. In den USA lag das mittlere Patientenalter bei Diagnosestellung in den Jahren 2005-2009 bei 68 Jahren. Die altersstandardisierte Erkrankungsrate in Deutschland im Jahr 2008 lag bei Männern bei 9,0 und bei Frauen bei 2,1 je 100.000 Einwohner. Entsprechende Zahlen für die USA aus dem Zeitraum 2005-2009 zeigen leicht niedrigere Inzidenzen. Hier lag die Erkrankungsrate der Männer bei 7,8 und die der Frauen bei 1,8 je 100.000 Einwohner [4, 5].

Mitte der 1970er Jahre waren der überwiegende Anteil der Ösophaguskarzinome Plattenepithelkarzinome. Die Inzidenz des ESCC ist seit der ersten Veröffentlichung des SEER Programms des NCI aus dem Jahr 1975 bis heute rückläufig. Die Inzidenz der EAC hingegen nimmt in den USA und den westeuropäischen Ländern stetig zu. So hat in diesen Ländern mittlerweile die Anzahl der EAC die der ESCC übertroffen. Um 1990 wurden erstmalig mehr EAC als ESCC neu diagnostiziert [6]. Nach Zahlen des NCI hat sich die Inzidenz der EAC in den USA in den Jahren von 1974 bis 2001 ungefähr versechsfacht. Das EAC hat somit die höchste Zuwachsrates aller Tumore. Dieser Anstieg lässt sich nicht alleine durch eine Verbesserung der Diagnostik sowie Ausweitung von Vorsorgeuntersuchungen erklären, denn im beobachteten Zeitraum von 1975 bis heute hat sich nahezu synchron zur Anzahl der Neuerkrankungen auch die Mortalität durch EAC von 2 auf 15 pro 1.000.000 Einwohner erhöht. Wäre der Anstieg der Inzidenz alleine durch verbesserte Diagnostik entstanden müsste die Mortalität unverändert bleiben [7].

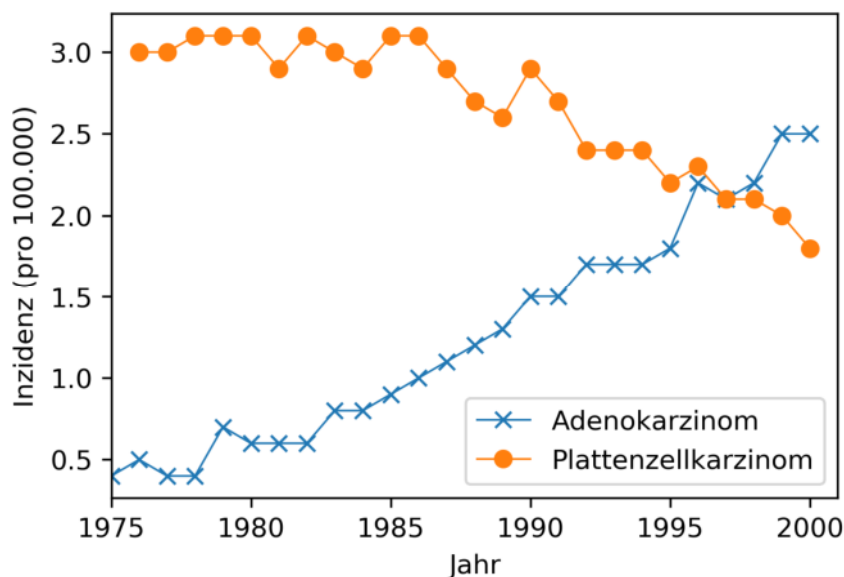


Abbildung 1: Inzidenzen von Speiseröhrenkrebs nach ihrer Histologie. Eigene Darstellung, erstellt mit den Daten aus dem SEER Programm des NCI mit Altersanpassung nach der US-Standardbevölkerung aus dem Jahr 2000.

1.2 Patientencharakteristik und Risikofaktoren

Vom ösophagealen Adenokarzinom ist vor allem die weiße männliche Bevölkerung der westlichen Industrienationen, mit einem Geschlechterverhältnis von 16:1, betroffen [8]. Als Hauptrisikofaktor für ein EAC gilt, wie in epidemiologischen Studien nachgewiesen, ein starker gastroösophagealer Reflux. Je häufiger ein Patient Symptome eines Refluxes wie Sodbrennen und Aufstoßen hat und je stärker die Symptome sind desto höher ist das Risiko an einem EAC zu erkranken [2]. Einen weiteren Risikofaktor für ein EAC stellt ein erhöhter Body-Mass-Index dar [9-12]. Eine Vermutung ist, dass der durch Adipositas bedingte erhöhte intraabdominellen Druck zu vermehrtem Reflux führt [13]. Insbesondere eine Stammfettsucht ist als Risikofaktor, um an einem EAC zu erkranken, identifiziert worden. Dies könnte eine Erklärung für das Geschlechterverhältnis sein, da diese Adipositasform bei Männern überwiegt, während bei Frauen eher eine hüft- und Oberschenkelbetonte Fettverteilung vorliegt [14]. Während das ESCC, wie alle Plattenepithelkarzinome des Hals-Kopfbereiches, in 87% der Fälle mit Tabak- und Alkoholkonsum in Verbindung gebracht werden kann, spielen diese Risikofaktoren beim EAC eine untergeordnete Rolle [15].

1.3 Stadieneinteilung und Prognose

Nach der TNM –Klassifikation der Ösophaguskarzinome (Tabelle 1) wird das Adenokarzinom in die fünf Stadiengruppen der UICC (Union International Contre le Cancer) (Tabelle 2) eingeteilt [16].

Tabelle 1: TNM Klassifikation des Ösophaguskarzinom einschließlich der Karzinome des ösophagogastralen Übergangs

T1	Lamina propria (T1a), Submukosa (T1b)
T2	Muscularis propria
T3	Adventitia
T4a	Pleura, Perikard oder Zwerchfell
T4b	Aorta, Wirbelkörper oder Trachea
N1	1 – 2 Lymphknoten
N2	3 – 6 Lymphknoten
N3	> 7 Lymphknoten
M1	Fernmetastasen

Tabelle 2: UICC Stadieneinteilung der Adenokarzinome des Ösophagus

Stadium 0	Tis N0 M0 G1
Stadium IA	T1 N0 M0 G1, G2, GX
Stadium IB	T1 N0 M0 G3 T2 N0 M0 G1, G2, GX
Stadium IIA	T2 N0 M0 G3
Stadium IIB	T3 N0 M0 jedes G T1, T2 N1 M0 jedes G
Stadium IIIA	T1, T2 N2 M0 jedes G T3 N1 M0 jedes G T4a N0 M0 jedes G
Stadium IIIB	T3 N2 M0 jedes G
Stadium IIIC	T4a N1, N2 M0 jedes G T4b jedes N M0 jedes G jedes T N3 M0 jedes G
Stadium IV	jedes T jedes N M1 jedes G

Das Ösophaguskarzinom ist ein schnell wachsender Tumor und zeigt erst spät klinische Symptome in Form von Dysphagie, Blutung, Anämie und Gewichtsverlust. Daher haben zum Diagnosezeitpunkt schon 35% der Patienten Fernmetastasen [5, 17]. Bei nachgewiesener Fernmetastasierung ist eine palliative Therapie die einzige Therapieoption. Die Fünfjahresüberlebensrate beider Entitäten zusammen liegt bei nur ca. 5%. Die Untersuchungsergebnisse zur Fünfjahresüberlebensrate des Adenokarzinoms zeigen in verschiedenen Studien leicht abweichende Ergebnisse. Gemeinsam ist ihnen allen jedoch, dass sich die Prognose von den 1970er Jahren an bis heute leicht verbessert hat (von einer relativen Fünfjahresüberlebensrate von ca. 5% 1970 auf 10,5% Anfang der 1990er Jahre bis hin zu ca. 14 % in den Jahren 2000-2008) [18, 19]. Auch die Fünfjahresüberlebensrate des Plattenepithelkarzinoms hat sich in den letzten Jahrzehnten von 3,8% in den 1960er Jahren auf 7 % in den 1990er Jahren verbessert [18]. Prognoseverschlechternde Faktoren bei beiden Tumorentitäten sind ein hohes Alter bei Erstdiagnose sowie das Tumorstadium. Mit nur 22% werden die wenigsten Tumore im lokalisierten auf den Primärtumor begrenzten Stadium diagnostiziert. In 30 % der Fälle sind bei Erstdiagnose bereits regionale Lymphknoten befallen und 35% der Patienten befinden sich zum Diagnosezeitpunkt in Stadium IV, das heißt es sind schon Fernmetastasen vorhanden [5].

Die Therapie des Ösophagokarzinoms erfolgt multimodal durch Operation, Bestrahlung und Chemotherapie abhängig von Tumorlokalisierung und Tumorstadium. Die einzige kurative Therapieoption ist die operative Tumorentfernung. Gute Heilungschancen sind daher bei beiden Entitäten, ESSC sowie EAC, auf frühe operable Tumorstadien ohne systemische Metastasierung beschränkt [20]. So liegt das relative 5-Jahres-Überleben bei einem zum Diagnosezeitpunkt lokalisiertem Tumor bei 37,8%, sinkt bei Befall regionaler Lymphknoten auf 19,8% und liegt bei Fernmetastasen zum Diagnosezeitpunkt bei 3,4% [5]. Für den Einsatz adjuvanter Chemo- oder Radiotherapie gibt es keinen evidenzbasierten Nachweis eines verbesserten Langzeitüberlebens [18]. Von einer neoadjuvanten Chemo- oder

Radiochemotherapie scheinen jedoch Patienten mit resektablem Ösophaguskarzinom zu profitieren [21].

Nach einer Operation zeigt das EAC, unabhängig von Tumorstadium und postoperativem Residualtumor, eine signifikant bessere Langzeitprognose als das ESCC [1].

1.4 Barrett-Ösophagus und Adenkarzinome des gastroösophagealen Übergangs

Die Adenokarzinome des ösophagogastralen Übergangs (AEG) umfassen Tumore unterschiedlicher histologischer und pathogenetischer Eigenschaften. Nach Siewert werden die AEG anhand ihrer Lagebeziehung zum ösophagealen Übergang klassifiziert (Tabelle 3) worin sich diese unterschiedlichen Eigenschaften widerspiegeln [22].

Tabelle 3: Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs

AEG I	Tumormasse im distalen Ösophagus
AEG II	Tumormasse auf Höhe der eigentlichen Kardia
AEG III	Tumormasse unterhalb der Kardia

Die AEG I kommen in über 80% der Fälle mit einem Barrett-Ösophagus (BE) assoziiert vor [22]. Der BE, benannt nach seinem Erstbeschreiber Norman Rupert Barrett im Jahr 1950, ist definiert als eine Umwandlung des mehrschichtigen Plattenepithels des distalen Ösophagus in ein endoskopisch sichtbares Zylinderepithel mit einer histologisch nachweisbaren intestinalen Metaplasie mit Becherzellen. Hierbei kommt es zu einer Verschiebung der sogenannten Z-Linie, dem physiologischen Übergang von Platten- in Zylinderepithel, nach oral [20]. Wenn das Zylinderepithelsegment länger als

3cm ist, wird von einem Long-Segment-Barrett gesprochen, bei einer Länge unter 3cm von einem Short-Segment-Barrett [23]. Auf dem Boden des Long- sowie des Short-Segment Barrett kann es zur Karzinomentwicklung kommen. Das Karzinorisiko scheint mit zunehmender Segmentlänge zu steigen [24]. Die Bedeutung des BE im Zusammenhang mit dem EAC ist nicht endgültig geklärt. 10% der Patienten mit gastroösophagealem Reflux entwickeln eine intestinale Metaplasie im distalen Ösophagus [25]. Die Studienergebnisse zum Risiko der Entwicklung eines EAC auf dem Boden eines BE variieren stark und liegen zwischen 0-3% pro Patientenjahr. Shaheen zeigte 2000 dass das Risiko negativ mit der Studiengröße korreliert: kleinere Studien ergaben ein höheres Risiko als große Studien [26]. Die im Jahr 2011 veröffentlichten Kohortenstudie von Hvid-Jensen mit über 11000 Patienten kam zu dem Ergebnis, dass das jährliche Risiko für die Entstehung eines EAC aus BE bei 0,12 % liegt [27].

1.5 Pathogenese des Barrett-Ösophagus und des ösophagealen Adenokarzinoms

Die genaue Pathogenese des Barrett-Ösophagus ist unbekannt. Durch den gastroösophagealen Reflux von Magensäure und Gallensekret entsteht eine Refluxösophagitis. Als zelluläre Anpassung auf diese chronische Entzündung kann sich eine Metaplasie entwickeln. Bei der Metaplasie wird differenziertes Gewebe reversibel in ein anderes differenziertes Gewebe umgewandelt. Im Fall der Barrett-Metaplasie wandelt sich das Plattenepithel in ein intestinales Zylinderepithel mit Becherzellen um. Die zunächst erstellte Hypothese der Migration von Zellen des proximalen Magens in die Speiseröhre, welche dort das vom Reflux geschädigte Plattenepithel ersetzen, wurde wieder verlassen da es sich hierbei nicht um intestinale Zellen handelt und der BE auch inselförmig vorkommt [28].

Eine andere Hypothesen ist, dass die Umwandlung des Epithels direkt durch Transdifferenzierung einer adulten Zelle in eine andere adulte Zelle geschieht

[29]. Dass eine Transdifferenzierung von Zellen grundsätzlich möglich ist wurde bereits anhand von Fibroblasten und Fettzellen gezeigt [30].

Die Umwandlung des Epithels könnte jedoch auch über gewebespezifische Stammzellen geschehen, welche durch Aktivierung stamzelltypischer Signalwege den einen oder den anderen Phänotyp ausbilden. Nach verschiedenen Theorien stammen die Stammzellen entweder aus den basalen Schichten des Ösophagusepithels des gastroösophagealen Übergangs [31] oder es werden hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark rekrutiert [32]. Es wird vermutet, dass durch den gastroösophagealen Reflux die oberen Schichten des ösophagealem Plattenepithels zerstört werden und gleichzeitig die Stammzellen der Basalschicht zu einer Differenzierung stimuliert werden. Diese Stammzellen könnten von einer Körperstammzelle als auch von einer bereits differenzierten Zelle abstammen die sich dedifferenziert hat [33]. Die durch den Reflux hervorgerufene Entzündungsreaktion erhöht die Permeabilität des Plattenepithels und die undifferenzierten Zellen der Basalschicht werden Säuren und Gallensalzen ausgesetzt. Diese Faktoren könnten die Zellen zu einer Expression von Cdx-2 und BMP-4 stimulieren, welche wiederum an der Differenzierung in intestinales Epithel beteiligt sind [28]. Die Metaplasie kann zu genetisch veränderten Zellen führen und so zur Krebsentstehung prädisponieren. Sie könnte aus protektiven Gründen entstehen, da sie resistenter gegen Noxen wie Säure und Verdauungssäfte zu sein scheint als das Ursprungsgewebe. Aus bisher unbekanntem Gründen ist die Metaplasie jedoch auch mit einer erhöhten Rate an maligner Progression verbunden. Innerhalb des Barrett-Ösophagus entstehen zunächst niedriggradige und in hochgradige intraepitheliale Neoplasien, welche sich bis hin zum invasiven Adenokarzinom entwickeln [31].

1.6 Tumorbiologie

Im Modell wird die Karzinomentstehung als ein komplexer mehrstufiger Prozess angenommen, bei dem sich über Zwischenstufen ein invasiv wachsender Tumor entwickelt [34]. Anhand von Untersuchungen zur Entstehung von Hauttumoren bei Mäusen wurde ein dreistufiges Modell bestehend aus Initiation, Promotion und Progression entwickelt [35]. Beim ersten Schritt, der Initiation, wird davon ausgegangen, dass es zu einer irreversiblen Veränderung eines „kritischen Gens“ einer oder weniger Zellen kommt, wodurch es unter anderem zu einer veränderten Zellreaktion auf Signale zur terminalen Differenzierung kommt. Bei der Promotion folgt die klonale Expansion durch Stimulation des Wachstums bzw. durch Verhinderung der Apoptose. Der Prozess der Promotion ist größtenteils reversibel und spielt sich auf epigentischer Ebene ab. Durch weitere Mutationen kommt es bei der Progression mittels autonomen Wachstums zu Invasivität und Bildung von Metastasen [35]. Es wird davon ausgegangen, dass ein Karzinom aus einer einzigen Ursprungszelle entsteht. Es wurde gezeigt, dass in vielen Primärtumoren in allen Tumorzellen der gleiche abnorme Karyotyp vorliegt. Bei der Tumourinitiation kommt es demnach zu einer Veränderung einer einzelnen Zelle, welche dieser einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber den normalen Zellen verschafft. Im weiteren Verlauf kommt es durch genetische Instabilität zu weiteren Mutationen, jedoch nur die wenigen Zellen mit einem Überlebensvorteil, zum Beispiel in Form von metabolischen oder immunologischen Eigenschaften, gegenüber den normalen Zellen überleben. So kommt es zu einer Selektion einer Subpopulation welche eine zunehmende Anomalie hat [36].

Die Krebsstammzelltheorie geht davon aus, dass viele Krebsarten, analog zu normalem Gewebe, hierarchisch organisiert sind. Demzufolge entsteht eine Neoplasie auf dem Boden einer kleinen Subpopulation an Krebsstammzellen welche das Wachstum und die Metastasierung ermöglichen und nicht alle Krebszellen besitzen die Eigenschaft der starken Proliferation und Metastasierung. Hiernach wäre für eine erfolgreiche Therapie nicht das

Eliminieren aller Krebszellen notwendig sondern nur die Bekämpfung der Stammzellen. Die Stammzelltheorie und die Theorie der klonalen Tumorentwicklung schließen sich gegenseitig nicht aus, es wird davon ausgegangen, dass die klonale Evolution auch in Krebsstammzellen vorkommt [37].

Jeon et al. übertrug diese Modelle auf die Entwicklung des Adenokarzinoms im Barrettgewebe. Eine Stammzelle im BE erleidet demnach eine Serie an irreversiblen Mutationen. Diese Mutationen führen zu einem Verlust der Wachstums- und Differenzierungskontrolle und es kommt zu einer symmetrischen Zellteilung und Vermehrung klonaler Zellen welche sich im Barrett-Segment ausbreiten [38].

1.7 Matrix-Metalloproteasen und potentielle Rolle in der Mehrstufenkarzinogenese

Matrix-Metalloproteasen (MMPs) gehören zu der Familie der Proteasen. Sie sind calciumabhängige zinkbindende Enzyme, welche als Endopeptidasen wirken und somit Peptidbindungen innerhalb eines Proteins spalten. Sie werden von verschiedenen Zellen des Bindegewebes und proinflammatorischen Zellen wie z.B. Fibroblasten, Osteoblasten, Endothelzellen, Makrophagen und Lymphozyten gebildet [39]. MMPs befinden sich in der extrazellulären Matrix (EZM) und können diese abbauen. Außerdem sind die MMPs an der Prozessierung einer großen Anzahl von bioaktiven Molekülen beteiligt. Neben ihrer Hauptaufgabe, dem Abbau von EZM, nehmen sie an vielen anderen physiologischen Prozessen wie der Morphologie von Geweben, Wundheilung und der Angiogenese teil. Sie spielen aber auch bei pathologischen Vorgängen wie der Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen und Tumorwachstum und –metastasierung eine Rolle [40]. Es wird angenommen, dass MMPs einen großen Stellenwert in der Zellproliferation, -migration und -differenzierung, sowie in der Angiogenese und Apoptose haben. Des Weiteren können MMPs die Basalmembran von Gefäßen abbauen, was essentiell für die Tumordinvasion in

Blut und Lymphgefäße ist. Ihre Expression wird unter anderem durch Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine und onkogene Zelltransformation reguliert [41].

Die MMP-Familie besteht aus mehr als 25 Mitgliedern, welche, je nach ihrer Substratspezifität, in Kollagenasen (MMP-1, MMP-8 und MMP-13), Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9), Stromelysine (MMP-3 und MMP-10), Matrilysin (MMP-7 und MMP-26) und den membranständigen MMPs (MMP-14 bis MMP-17, und MMP-24) unterteilt werden. [39].

Fast alle MMPs haben die gleichen Strukturdomänen, welche aus einem Pro-Peptid, einer katalytische Domäne und einer C-terminalen Domäne bestehen. MMPs werden als inaktive Vorstufen sezerniert. Durch die Abspaltung des N-terminalen Pro-Peptides wird das Enzym aktiviert. Die größten endogenen Inhibitoren der MMPs sind die gewebespezifischen Inhibitoren der Metalloproteinasen, TIMP-1 bis TIMP-4, welche mit der C-terminalen Domäne interagieren [42-44].

MMP-1, auch Kollagenase-1 genannt, ist eine Fibroblastentyp- oder interstitielle Kollagenase und wird von Tumorzellen, aber auch von Fibroblasten, Keratinozyten und Makrophagen sezerniert, welche durch Interaktion mit den Tumorzellen zur Sekretion stimuliert werden. MMP-13, auch als Kollagenase-3 bezeichnet, ist eine weitere tumorassoziierte MMP welche ebenfalls beim Abbau der EZM mitwirkt. MMP-1 und MMP-13 können tripelhelikale Kollagenfibrillen vom Kollagen Typ I spalten. [40]

Es wird vermutet, dass MMPs eine wichtige Rolle bei dem Model der mehrstufigen Karzinogenese spielen [42]. Dies könnte auch auf die Entstehung des EAC zutreffen. Bisher wurde eine erhöhte Expression von MMP-1 unter anderem in humanem Gewebe des Kolorektalen-, Pankreas-, Zevix-, Mamma-, Magen- und hepatozellulären Karzinoms nachgewiesen. Die erhöhte Expression ging häufig einher mit eine verstärkten Metastasierungsrate und einer schlechteren Prognose im Vergleich zu Tumoren mit niedriger Expression von MMP-1 [45-50].

Auch MMP-13 wurde bereits im Kolorektalen-, Mamma- und hepatozellulären Karzinom nachgewiesen [48, 49, 51]. Das Gewebe der oben genannten Studien war jeweils formalinfixiert und in Paraffin eingebettet.

Bisher gibt es keine Studien, welche eine Verbindung zwischen der Expression von MMPs im BE und dem verwandten EAC mit dem Tumorproliferationsmodell der Mehrstufenkarzinogenese in Verbindung bringen.

1.8 Cdx-2

Das Genprodukt des Caudale-Homöobox-Gens Cdx-2 ist für die frühe Differenzierung und den Erhalt des intestinalen Epithels notwendig. Es wird im gesamten Dün- und Dickdarm exprimiert. Die proximalste Stelle der Expression ist physiologisch auf Höhe des gastroduodenalen Übergangs [52]. In der gesunden Plattenepithelmukosa des normalen Ösophagus kommt Cdx-2 nicht vor, wird jedoch in den Zellkernen von Zellen mit spezialisierter intestinaler Metaplasie stark exprimiert [53].

Cdx-2 ist daher in den vergangenen Jahren als Marker für intestinale Metaplasien im Bereich eines BE etabliert worden. Eine Cdx-2 mRNA-Expression ist ab dem Stadium einer Refluxösophagitis nachweisbar. Die Expression im BE ist jedoch signifikant höher. Es wird vermutet, dass die Expression von Cdx-2 ein frühes Ereignis in der Entwicklung zum BE ist [54]. Am Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten durch Exposition bestimmter Gallensäuren (Cholsäure und Dehydrocholsäure) vermehrt Cdx-2 exprimieren [55]. In einer anderen Studie an humanen Zellkulturen ergab, dass die Exposition von Säure und Gallensäure durch Promoterdemethylierung zur Cdx-2-Expression führen [56]. Diese Studienergebnisse unterstützten die Vermutung einer refluxassoziierten Karzinogenese.

1.9 Ki-67

Ki-67 ist ein Protein das mit einem Antigen reagiert, welches ausschließlich in Kernen humaner proliferierender Zellen exprimiert wird. Ki-67 ist während aller aktiven Phasen des Zellzyklus (G(1), S, G(2) und Mitose) nachweisbar. In ruhenden Zellen (G(0)) kann Ki-67 hingegen nicht nachgewiesen werden. Daher eignet sich das Ki-67 Protein sehr gut zur quantitativen Erfassung der Zellproliferation und wird als Proliferationsmarker eingesetzt. Die Fraktion von Ki-67 positiven Tumorzellen korreliert oft mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung [57].

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Bisher gibt es keine Untersuchungen zur Expression von MMP-1 und MMP-13 im BE und EAC. Da diese Kollagenasen bereits in anderen Tumoren nachgewiesen wurden (siehe oben) und angenommen wird, dass sie eine wichtige Rolle in der mehrstufigen Karziogenese spielen könnten ist das Ziel dieser Arbeit die Expression von MMP-1 und MMP-13 im EAC (mit und ohne assoziiertem BE), sowie im nicht-dysplastischen BE und als Vergleichsgruppe im ESCC durch Protein- und Genexpression zu untersuchen.

Des Weiteren soll die potentielle Rolle von MMP-1 und MMP-13 als präinvasiver Faktor im BE erläutert werden, sowie ein Vergleich der Expressionslevel im angrenzenden EAC. Zur Analyse der Expression im Zusammenhang mit der intestinalen Metaplasie wurde die Koexpression mit Cdx-2, als Marker für intestinale Metaplasie, untersucht. Um die mögliche Rolle von MMP-1 bei der Tumorexpansion zu untersuchen wurde die Koexpression zusammen mit der des Proliferationsmarkers Ki-67 untersucht.

Außerdem soll der potentieller Einfluss auf das Überleben, sowie die Korrelation der Expression mit klinischpathologischen Eigenschaften erläutert werden.

Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Welche Bedeutung hat die Expression von MMP-1 und MMP-13 im Barrett-Ösophagus und im Adenokarzinom des Ösophagus?
2. Welche Rolle könnten MMPs im Modell der klonalen Tumorentwicklung spielen?
3. Was ist die Bedeutung der MMP-1-Expression als Prognosefaktor?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenauswahl

Das Gewebematerial für diese Arbeit stammt von insgesamt 70 Patienten, bei denen zwischen Januar 2001 und Juni 2004 aufgrund eines Ösophaguskarzinoms eine Ösophagusresektion durchgeführt worden war. Alle Patienten waren kurativ (R0) reseziert worden. Bei 41 der insgesamt 70 Patienten war die Resektion aufgrund eines EAC mit angrenzendem BE erfolgt, bei 19 Patienten aufgrund eines EAC ohne angrenzenden BE und bei 10 Patienten aufgrund eines ESCC. Außerdem stand Biopsiematerial von 18 weiteren Patienten mit nicht-dysplastischem Barrett-Ösophagus zur Verfügung. Anhand dieser Materialauswahl werden alle histopathologische Zwischenstufen der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz abgebildet.

Die Karzinome der 19 Patienten ohne BE befanden sich im distalen Ösophagus. Sie wurden ausdrücklich als AEG Typ I Tumore nach Siewert und Stein klassifiziert [22] und waren explizit nicht im Bereich der anatomischen Kardia (AEG Typ II) lokalisiert. Zum Nachweis der Barrett-Metaplasie habe ich systematisch histopathologisch alle Tumorböcke aufgearbeitet und nach spezialisierten intestinalen Metaplasien in Form von Becherzellen durchsucht. Um auch kleine Bereiche intestinaler Metaplasie zu entdecken habe ich zusätzlich zur histopathologischen Untersuchung eine immunhistochemische Färbung mit Cdx-2 Antikörpern durchgeführt, welche, wie oben beschrieben, als frühe Marker für intestinale Metaplasie verwendet werden. EAC mit BE wurden so bezeichnet, wenn zumindest kleine Foci von intestinaler Metaplasie aufgrund der Cdx-2-Färbung auffindbar waren. EAC ohne BE wurde als solches bezeichnet, wenn keine intestinale Metaplasie im gesamten Tumorböck auffindbar war.

Das verwendete Gewebe war formalinfixiertes und paraffineingebettetes (FFPE; formalin-fixed, paraffin-embedded) Archivmaterial aus der histopathologischen Routine, welches unter standardisierten Bedingungen

hergestellt wurde. Die Resektate bzw. Biopsien waren mit Einverständnis der Patienten archiviert worden, entsprechend den Vorgaben der lokalen Ethikkommission.

Keiner der Patienten der Studie hatte eine neoadjuvante Radio-, Chemo- oder Radiochemotherapie erhalten. Für alle Patienten ist ein Follow-up verfügbar, welches im Rahmen von Nachuntersuchungen der Patienten nach jeweils 6, 12 und 18 Monaten und anschließend jährlich erhoben wurde. Informationen von Patienten die nicht zur Nachuntersuchung erschienen wurden über den Hausarzt eingeholt. Die entsprechenden Daten stammen aus dem lokalen Würzburger Tumorregister des Comprehensive Cancer Center Mainfranken. Die mittlere Nachbeobachtungszeit lag bei 29 Monaten mit einer Standardabweichung von 17,6 Monaten. Patienten- und Tumorcharakteristika sind in Tabelle 7 und 8 zusammengestellt.

2.2 Histopathologische Analyse, Tumor Staging

Die Auswahl geeigneter Gewebepblöcke wurde von zwei im Bereich der Gastrointestinalpathologie erfahrenen Pathologen (Stefan Kircher, Stefan Gattenlöhner) anhand von Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbten Routinepräparaten getroffen. Geblindet des vorangegangenen histopathologischen Befundes wurden die Präparate aller verfügbaren Tumorblöcke der ausgewählten Patienten einer intensiven histopathologischen Beurteilung unterzogen. Dabei wurden die Tumor infiltrierenden Areale (EAC/ESCC), das umgebende Stroma und die infiltrierenden Immunzellen sorgfältig beurteilt. Die Einteilung der Tumorstadien erfolgte gemäß der 7. Auflage des TNM Staging Systems der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) und der American Joint Committee on Cancer (AJCC) aus dem Jahr 2009 [16]. Das Grading wurde anhand der Kriterien der WHO durchgeführt [58]. Patienten- und Tumormerkmale wie die UICC Stadien, pT-, pN-, cM-Kategorien, Zahl der entfernten Lymphknoten, Zahl der befallenen Lymphknoten, residualer

Tumorstatus und Lokalisation wurden in einer Datenbank dokumentiert (Excel, Microsoft).

2.3 Zellkultur

Für die Zellkultur wurde die Zelllinie OE-33 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um Zellen eines Barrett-Adenokarzinoms des distalen Ösophagus einer 73-jährigen Patientin. Der Tumor ist ein Stadium IIa Tumor und zeigte eine geringe Differenzierung. An Zellen dieser Zelllinie wurde die MMP-1- und MMP-13-Expression an Cytospin-Präparaten untersucht.

2.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie und die Immunfluoreszenz dienen dem Nachweis bestimmter Antigene auf Proteinebene. An Serienschnitten der, wie oben beschrieben, ausgewählten Gewebeblöcke habe ich immunhistochemische Färbungen für MMP-1, MMP-13, Cdx-2 und Ki-67 durchgeführt. Zunächst wurden von den Gewebeblöcken mittels Mikrotom Serienschnitte von 2µm Dicke hergestellt und auf adhäsive Objektträger (Hartenstein, Würzburg) aufgebracht. Diese Präparate habe ich in Xylen und in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend mit Wasser rehydriert.

Um die Antigenbindung zu verbessern habe ich das Antigen zunächst hitzeinduziert demaskiert (heat induced epitope retrieval). Für die hitzeinduzierte Demaskierung wurden die Präparate 20 Minuten in einem Dampfgarer in Citratpuffer pH=6 (Dako, Hamburg, Deutschland) gekocht. Dies geschah unter der Vorstellung, dass hierdurch die Quervernetzungen der Epitope, welche durch die Formalinfixierung und Paraffineinbettung entstehen und die Antigenität stören, aufgehoben werden [59]. Zur Blockierung

unspezifischer Antikörperbindungsstellen habe ich die Präparate bei Raumtemperatur (RT) 20 Minuten in Normalserum (2%) und Rinderserumalbumin (BSA) (0,5%) inkubiert. Außerdem habe ich das Gewebe für 5 Minuten in einer 3% Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blocken. Endogenes Biotin wurde durch die Verwendung des Avidin/Biotin Blocking Kits (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) geblockt. Dann habe ich die Gewebeschnitte mit den unkonjugierten Primärantikörpern (Tabelle 4) oder den Kontrollantikörpern über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Anschließend habe ich einen biotinylierten Sekundärantikörper appliziert und das Präparat mit HRP-konjugiertem Streptavidin (LSAB2 System, HRP, Dako, Hamburg, Deutschland) inkubiert.

Daraufhin habe ich das Gewebe für 5 Minuten mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Biogenex) inkubiert. HRP oxidiert das Chromogen zu einem braunfarbigen Endprodukt.

Schließlich habe ich die Zellkerne mit Hämalaun gegengefärbt und mit Glycergel (Dako) eingedeckt.

2.5 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbung habe ich das Gewebe wie bei der Immunhistochemie vorbehandelt. Wie oben beschrieben habe ich das Gewebe entparaffiniert, rehydriert, hitzeinduziert demaskiert und geblockt. Dann habe ich den Primärantikörper Ki-67 hinzugegeben und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Den mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierte affinitätsgereingte Esel-anti-Hase IgG Sekundärantikörper (Tabelle 4) habe ich anschließend für 30 Minuten bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Dann habe ich die Präparate über Nacht mit dem zweiten Primärantikörper MMP-1, welcher in Tris Puffer Saline (TBS) und 0,5% Rinderserumalbumin verdünnt wurde, bei 4°C inkubiert. Daraufhin habe ich die Präparate mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 konjugiertem und affinitätsgereinigtem Esel-anti-Maus

Sekundärantikörper IgG (Tabelle 4) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Objektträger habe ich mit DAPI (4',6-Diamindino-2-Phenylindoldihydrochlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zur Kernfärbung gegengefärbt und mit Polyvinyl-Alkohol mounting medium (DABCO, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) eingedeckt. Zur Analyse habe ich eine Zeiss Kamera (Jena, Deutschland) verwendet.

Tabelle 4: Zusammenfassende Darstellung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistologie, sowie Angaben über Verdünnung, Herkunft und Hersteller der Antikörper.

Zielprotein	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
MMP-1	Maus	1:200	Acris, Hiddenhausen, Deutschland
MMP-13	Maus	ready to use	Neo Markers, Asbach, Deutschland
Cdx-2	Maus		Biogenex, San Ramon, USA
Ki-67	Hase	1:25	Acris, Hiddenhausen, Deutschland
Isotyp-Kontroll-Antikörper			Acris, Hiddenhausen, Deutschland
Sekundärantikörper FITC	Esel	1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (Suffolk, England)
Sekundärantikörper Cy3	Esel	1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (Suffolk, England)

2.6 Doppelfärbung

Zur Untersuchung der Koexpression habe ich immunhistochemische Doppelfärbungen für MMP-1 und Cdx-2 durchgeführt sowie Immunfluoreszenzdoppelfärbungen für MMP-1 und den Proliferationsmarker Ki-67.

2.7 Quantifizierung der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Für die Auswertung der mit MMP-1 und Ki-67 immunhistochemisch markierten Präparate habe ich in jedem Präparat sechs - für das gesamte Tumor-/Metaplasiegewebe repräsentative - Areale ausgewählt. In diesen Bereichen habe ich das Verhältnis der angefärbten Tumor-/Metaplasiezellen zur Gesamtzahl der Tumor-/Metaplasiezellen bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Die Präparate wurden von einem weiteren Untersucher unabhängig voneinander ausgezählt. Im Fall von Unstimmigkeiten wurden die Präparate gemeinsam untersucht und ein Konsens gebildet.

Auch in den immunfluoreszenzgefärbten Schnitten habe ich jeweils sechs repräsentative Bereiche pro Präparat ausgewählt und die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen aller MMP-1 positiven Zellen ausgezählt.

2.8 Real-Time-RT-Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Real-Time-quantitative-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time-RT-PCR) lassen sich kurze definierte DNA-Sequenzen replizieren und anschließend quantifizieren.

Um die Genexpression von MMP-1 mit einer Real-Time RT-PCR an FFPE Gewebe zu untersuchen wurden zunächst von Gewebelöcken beider zu untersuchenden Gruppen, Barrett-Metaplasie und Adenokarzinom, mit dem Mikrotom 10µm dicke Schnitte angefertigt. Es wurde jeweils die gleiche Anzahl von Gewebeschnitten mit BE und EAC hergestellt. Aus diesen Schnitten habe ich anschließend je zwei repräsentative Bereiche von 1,5cm² Größe mikrodissiziert. Die vollständige zelluläre RNA wurde unter Anwendung des Absolutely RNA FFPE Kit von Stratagene (Waldbronn, Deutschland), extrahiert. Für die Extraktion der RNA der OE-33 Zelllinie habe ich nach der Homogenisierung 75%-ige, zur RNase Inaktivierung mit Diethylcarbonat (DEPC) versetzte, Ethanollösung zum Lysat hinzugefügt. Die RNA habe ich mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach

Herstellerangaben isoliert. Dazu habe ich das Lysat in die mitgelieferten Extraktionssäulen (RNeasy Mini spin column) gegeben, welche die RNA spezifisch binden. Die reine, konzentrierte RNA wurde in Wasser gelöst und bei -70°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die Konzentration der gesamten RNA wurde spektralphotometrisch durch optische Dichtemessung bei einer Wellenlänge von 260nm (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren, bestimmt. Die Reinheit der RNA wurde durch den Quotienten aus OD_{260} und OD_{280} , dem Absorptionsmaximum für Proteine, ermittelt. Das Verhältnis lag in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,0. Dies zeigte, dass die aufbereitete RNA nicht kontaminiert war.

Die Primer wurden mit der Primer Express Software hergestellt. Es wurden kurze Segmente mit einer Länge von 50-150 Basenpaaren der Ziel-cDNA amplifiziert. Die Sequenz für den MMP-1 Vorwärtsprimer war 5'-TGCTGCTGCTGCTGTTCTGGG-3' und die Sequenz für den Rückwärtsprimer 5'-GGCCGATGGGCTGGACAGGA-3'. Als Kontrolle diente menschliche ösophageale cDNA der Firma BioChain (Hayward, CA, USA).

Für die relative Quantifizierung wurde die Genexpression des Zielgens auf die eines konstitutiv regulierten Housekeeping-Gens, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), bezogen. Die GAPDH Vorwärtsprimer Sequenz war 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAGG-3', die GAPDH Rückwärtsprimer Sequenz 5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'.

Da bei der PCR DNA-Polymerasen verwendet werden, die DNA-abhängig sind und nicht in der Lage sind RNA zu amplifizieren ist es notwendig zunächst eine Reverse Transkriptase einzusetzen, die RNA in cDNA umschreibt. Diese cDNA kann im Anschluss als Ausgangsmaterial für eine PCR verwendet werden. Für die cDNA-Synthese wurde das AffinityScript QPCR cDNA Synthese Kit von Stratagene benutzt.

Die gesamt RNA wurde von Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (MMLV-RT) in cDNA umgeschrieben. Dabei habe ich, gemäß den Herstellerangaben, in 20 μl 200 Einheiten MMLV-RT sowie Primer in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verwendet. Alle PCR Reaktionen habe ich mit

einem DNA Engine Opticon 2 System (MJ Research, Biozym, Oldendorf, Deutschland) ausgeführt.

Jede PCR Reaktion habe ich in einem Volumen von 25 μ l ausgeführt, welches sich aus 12,5 μ l Sensi Mix (Peqlab, Erlangen, Deutschland), 0,5 μ l SYBR Green, 10 pmol/ μ l Vorwärtsprimer, 10pmol/ μ l Rückwärtsprimer, 1 μ l (150ng) Matrizenstrang-DNA und 9 μ l peqgold RNase freies Wasser zusammensetzt. Initial wurde diese Mischung bei 95°C für 10 Minuten denaturiert. Darauf folgten 38 Zyklen mit jeweils den folgenden Schritten: Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden, Primerhybridisierung bei 60,9°C für 30 Sekunden, Elongation bei 72°C für 40 Sekunden.

Die gewonnene DNA wurde durch Fluoreszenzmessung quantifiziert. Da der Farbstoff fluoresziert wenn er an dsDNA gebunden ist nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Die dsDNA Konzentration wird in Referenz zu einer Standard-Lösung gemessen. Um die Amplifikationsspezifität nachzuweisen, wurden die PCR-Produkte jedes Primerpaares einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen, wodurch die Fragmentlängen bestimmt werden, um zum Beispiel Primer-Dimere auszuschließen. In jedem Durchlauf liefen Kontrollen ohne Matrizenstrang mit. Die Quantifizierung wurde mit der LightCycler Analysesoftware durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit habe ich durch eine unabhängige Wiederholung der PCR bestätigt. Da in der ersten Phase der Amplifikation die Template begrenzt sind und in der letzten Phase viele Substrate verbraucht sind findet nur in der mittleren Phase ein exponentieller und somit quantifizierbarer Anstieg statt. Für den Beginn der exponentiellen Phase wird daher ein Ct-Wert (engl. Cycle Threshold für Schwellenwert-Zyklus) verwendet. Der Ct-Wert beschreibt den Punkt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Der Vergleich des Ct-Wertes zweier Proben zeigt, welche Probe vor der Amplifizierung mehr cDNA enthielt. Für den Vergleich wurde die Differenz (Δ Ct) zwischen dem durchschnittlichen Ct-Wert der cDNA von MMP-1 und denen der cDNA mit dem Haushaltsgen GADPH bestimmt. Darauf folgte die Berechnung der Differenz zwischen den durchschnittlichen Ct-Werten der MMP-1 cDNA in

den Tumorproben und dem Ct-Wert für MMP-1 in Normalgewebe ($\Delta\Delta Ct$). Der relative Quantifizierungswert, die relative „x-fache Differenz“ zum Normalgewebe (Mittelwert) wurde als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ angegeben. Die Berechnung der Expression von MMP-1 wird also relativ zum Normalgewebe angegeben (=relative Quantifizierung).

2.9 Statistische Analyse

Die Statistische Analyse wurde mit der MedCalc Software (Mariakerke, Belgien) ausgeführt. Da der D'Agostino-Pearson Test keine Normalverteilung der Gen- und Proteinexpression zeigte wurden alle Werte als Median \pm Interquartilsabstand (IQR=interquartile range) angegeben.

Das Gesamtüberleben wurde definiert als der Zeitraum zwischen chirurgischer Tumorentfernung bis zum Tod des Patienten. Rezidivfreies Überleben wurde als der Zeitraum von chirurgischer Tumorresektion bis zum klinischen Nachweis eines Rezidivs definiert. Das Gesamtüberleben im Zusammenhang mit der MMP-1-Expression wurde nach Kaplan-Meier-Methode beurteilt [60]. Um die Unterschiede im Gesamtüberleben und im Tumor assoziierten Überleben der Patienten nach erfolgreicher kurativer (R0) Resektion des ösophagealen Adenokarzinoms zu analysieren, wurden die Patienten in zwei Untergruppen aufgeteilt (dichotome Variable).

Der mediane Grenzwert für hohe oder geringe MMP-1-Expression wurde bei 35% für MMP-1-Expression im BE (n=41), 48% für MMP-1-Expression im angrenzenden EAC (n=41) und 46% für MMP-1-Expression in allen EAC (n=60) angesetzt. Der Log Rank Test wurde verwendet um die Überlebenszeiten zu vergleichen.

Die multivariate Analyse aller Faktoren wurde durch das Cox-Hazard-Modell analysiert [61]. Es wurden alle Parameter, die in der univariaten Analyse als Signifikant beurteilt wurden, eingeschlossen. Die Korrelationsanalyse wurde mit dem parameterfreien Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman's Rho) durchgeführt. Der exakte Test nach Fisher (exakter Chi-

Quadrat-Test) wurde verwendet um die Relation zwischen zwei kategorischen Variablen zu untersuchen.

Unterschiede in der Signifikanz der Daten wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test oder, wenn mehr als zwei Gruppen verglichen wurden, mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 MMP-1- und MMP-13-Expression im Zusammenhang mit BE und EAC

Im normalen gesunden ösophagealen Plattenepithel wurde immunhistochemisch weder MMP-1, MMP-13 noch Cdx-2 nachgewiesen. Alle Präparate (100%) mit EAC ohne BE exprimierten im Zytoplasma der Tumorzellen MMP-1 (n=19/19). Mit 95% war die Expression von MMP-1 innerhalb des Tumors in den Präparaten, in denen EAC mit BE assoziiert vorkam (n=39/41) vergleichbar hoch. Die Biopsien, in denen BE ohne IN vorlag, exprimierten nur zu 56% MMP-1 (n=10/18). Von den ESSC-Präparaten waren 60% positiv für MMP-1 (n=6/10). Die MMP-1-Expression in den Stromazellen war deutlich geringer und in allen Fällen war die Expression stark mit niedrig- und hochgradiger IN innerhalb der Barrettschleimhaut sowie mit Tumorzellen assoziiert.

Die Anzahl der Zellen, welche das Protein exprimieren, wurde, wie oben beschrieben, prozentual im Verhältnis zur Gesamtzellzahl durch Auszählung der Zellen bestimmt. Alle ausgezählten Zellen wurden nach Vorläuferläsion, ihrer Tumorentität bzw. anhand ihrer relativen Nähe zu Tumorgewebe, aufgeschlüsselt und beurteilt. Im Vergleich zum Barrett ohne IN war die MMP-1-Expression bei BE, welcher mit EAC assoziiert vorkam, und bei EAC mit BE und ohne BE, signifikant erhöht. Die starke Expression von MMP-1 im EAC mit BE war vergleichbar mit der MMP-1-Expression im EAC ohne assoziierten BE (Tabelle 5, Abbildung 2A). Die mediane MMP-1-Expression aller EACs (n=60) lag bei 46% (IQR 39,0 – 55,5%; 95% CI 43,0 -54,0%). Zwischen niedrig- und hochgradigen IN innerhalb der Barrettmukosa war kein Unterschied in der MMP-1-Expression feststellbar.

Das ESCC zeigte im Vergleich zu allen EACs, mit und ohne BE, eine signifikant geringere MMP-1-Expression. Die MMP-1-Expression innerhalb des ESCC war auch im Vergleich zur Expression im BE geringer, unterschied sich jedoch nicht signifikant (Tabelle 5, Abbildung 2A).

Bei der Färbung der Zytozentrifugationspräparate der Zelllinie OE-33, welche als zusätzliche Positivkontrolle diente, waren 65 % der Zellen MMP-1 positiv (Abbildung 3).

Tabelle 5: MMP-1-Expression in verschiedenen Geweben

Gewebe	Anzahl	Mediane Expression (%)	IQR (%)	95% CI	p-Wert
BE ohne IN oder CA	18	4	0-11	0-10.603	
BE mit angrenzendem EAC	41	35	23.0-41.5	31.284-39.0	<0.05 [†]
EAC mit angrenzendem BE	41	48	39.0-56.5	43.0-54.239	<0.05 ^{††}
EAC ohne BE	19	44	39.0-55.8	39.0-55.218	<0.05 ^{††}
ESCC	10	27	0-50.2	0-29.2	<0.05 ^{†††}

[†]Signifikanz im Bezug zu BE ohne IN oder CA ; ^{††}Signifikanz im Bezug zu BE mit angrenzenden EAC; ^{†††}Signifikanz in Bezug zu allen EACs

Die Abbildung 2B zeigt ein repräsentatives Beispiel der MMP-1-Expression im frühen BE. In Bereichen, in welchen die MMP-1-Expression innerhalb des BE untersucht wurde, wurde zur Sicherung der intestinalen Metaplasie eine Doppelfärbung mit Cdx-2 durchgeführt (Abbildung 2b). In Abbildung 2c wird ein charakteristisches Beispiel für die MMP-1-Expression im EAC gezeigt.

Die Expression von MMP-13 war in allen Humanpräparaten negativ, ebenso in den Zytozentrifugations-Präparaten der Tumorzelllinie OE-33. Nur in Stromazellen konnte eine geringe Expression nachgewiesen werden.

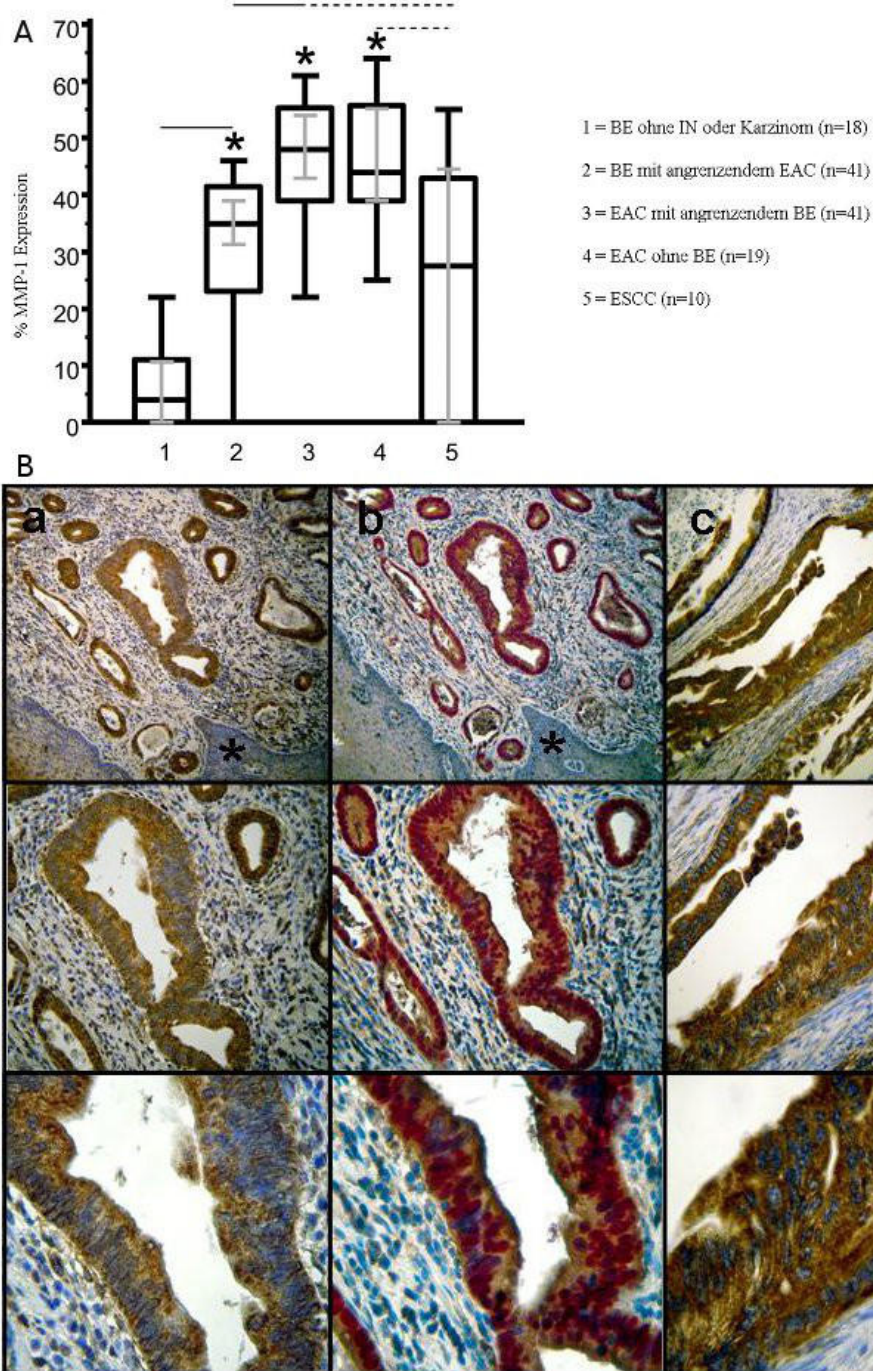


Abbildung 2: Auswertung (A) und Beispiele (B) der immunhistochemischen Markierung von MMP-1 in menschlichem BE und EAC. (A) Die Auswertung bezieht sich auf den Prozentsatz aller positiven der gezählten Zellen. Graue Linien zeigen das 95%-Konfidenzintervall an. Statistisch signifikante Werte ($p < 0,05$) von BE und ESCC zu allen EACs sind mit Sternchen markiert. **B (a)** Markierung von MMP-1 im frühen BE durch Braunfärbung des Zytoplasmas. Angrenzendes normales Gewebe färbt sich negativ für MMP-1 (Sternchen). **(b)** Bestätigung der intestinalen Metaplasie durch zusätzliche Doppelmarkierung mit Cdx-2 (fuchsrote Färbung der Zellkerne). **(c)** EAC mit deutlicher MMP-1-Markierung. Obere Reihe 100-fache Vergrößerung, mittlere Reihe 200-fache Vergrößerung, untere Reihe 400-fache Vergrößerung.

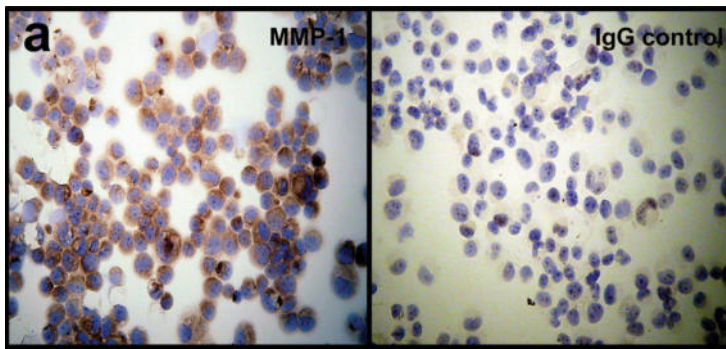


Abbildung 3: Immunhistochemische MMP-1-Markierung der OE-33 Adenokarzinom Krebszelllinie. Links: Zytozentrifugationspräparat der OE-33-Adenokarzinom-Krebszelllinie mit MMP-1-Markierung. Rechts: IgG-Kontrolle.

3.2 Analyse von MMP-1 Genexpression

Um die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung zu bestätigen, wurde mit einer RT-PCR die Genexpression von MMP-1 in humanem BE- (n=5) und in humanem EAC- (n=4) Gewebe untersucht. Der BE (Median 3,6-fache Differenz im Vergleich zu Normalgewebe; IQR 3,275 bis 4,625-fache Differenz, n=5) zeigte im Vergleich zum EAC (Median 7,9-fache Differenz im Vergleich zu Normalgewebe; IQR 6,300 bis 8,950-fache Differenz, n=4) eine signifikant ($p=0,01$) niedrigere MMP-1 Genexpression (Abbildung 4). Die Ergebnisse der RT-PCR bestätigten somit die Ergebnisse der Immunhistochemie. In beiden Fällen wurde eine erhöhte MMP-1-Expression im BE im Vergleich zu Normalgewebe, sowie eine signifikant höhere Expression von MMP-1 im EAC ohne BE im Vergleich zu BE festgestellt.

Eine MMP-1-Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR wurde ebenfalls für die OE-33 Adenokarzinom-Zelllinie durchgeführt. Hier zeigte sich eine, im Vergleich zum Normalgewebe 4,1-fach höhere Genexpression.

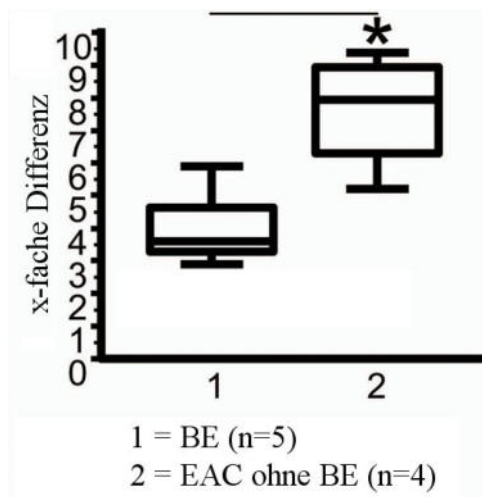


Abbildung 4: Genexpression von MMP-1 in menschlichem BE- und EAC-Gewebe. Normalgewebe wird als 1-fach angesehen. Statistisch signifikante Werte sind mit Sternchen markiert.

3.3 Korrelation von MMP-1-Expression und Zellproliferation

Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen MMP-1-Expression und Zellproliferation wurden in BE- und EAC-Serienschnitten durch Immunfluoreszenzfärbung das Protein MMP-1 und der Proliferationsmarker Ki-67 markiert. Die Auswertung der Serienpräparate zeigte eine starke direkte Korrelation der MMP-1-Expression mit proliferierenden Zellen (MMP-1/Ki-67: $r=0,943$ für BE (n=41), Abbildung 5a; $r=0,811$ für EAC (n=60), Abbildung 5b). In Abbildung 5c wird anhand eines mit IF einfach- und doppelmarkierten Serienschnittes ein repräsentatives Beispiel für die Ki-67- und MMP-1-Koexpression innerhalb eines BE gezeigt. Es zeigte sich, dass MMP-1 insbesondere im frühen Barrett (Nachweis von Becherzellen und zusätzliche Cdx-2-Markierung im Serienschnitt) zusammen mit Ki-67 in der gleichen Zelle koexprimiert wird. Die IF-Doppelfärbung bestätigt somit die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der IHC-gefärbten Serienschnitte. Es wurden sowohl im BE- als auch im EAC-Gewebe eine große Anzahl MMP-1 und Ki-67 koexprimierender Zellen gefunden.

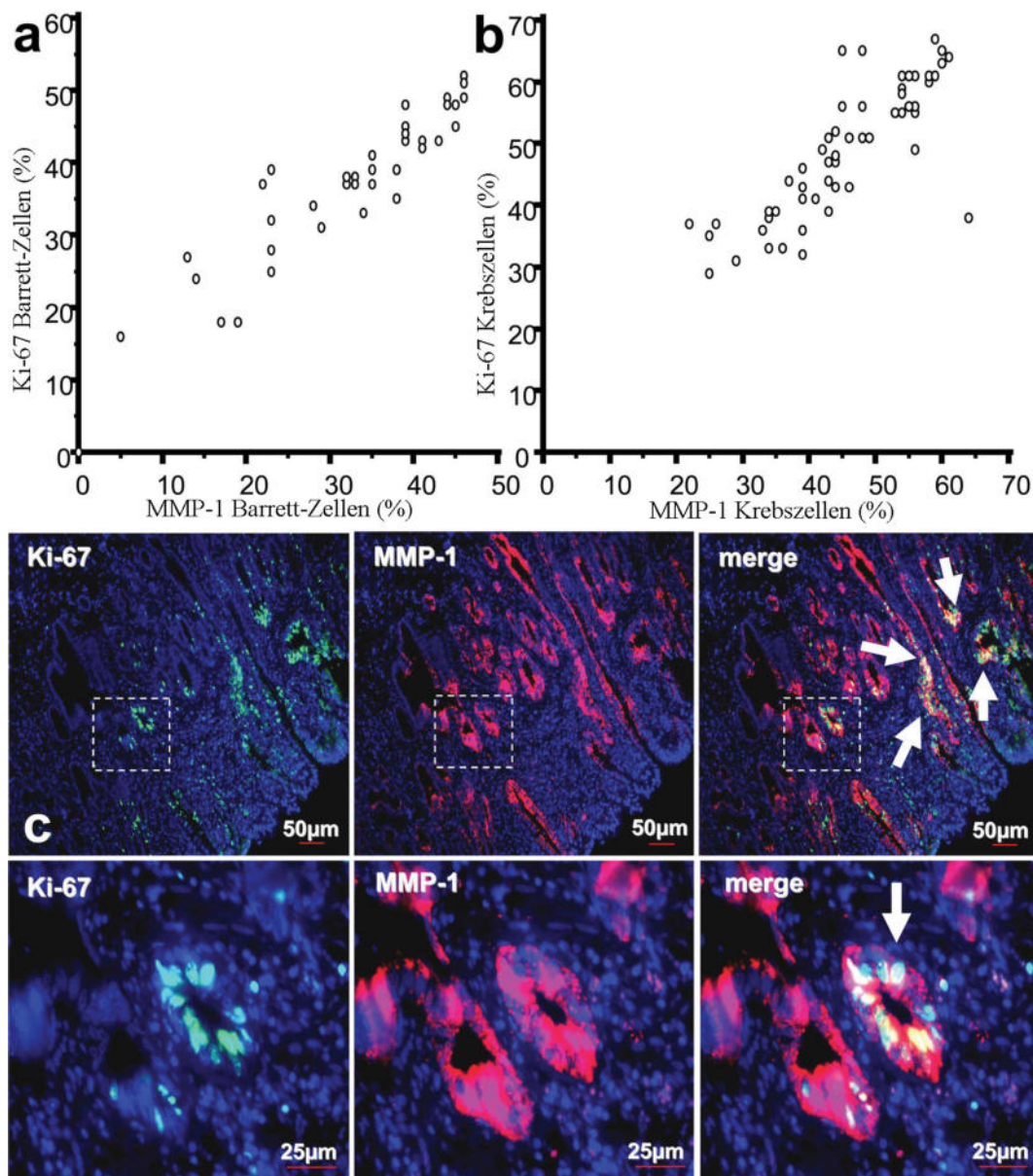


Abbildung 5: Korrelation und Koexpression von MMP-1 mit Ki-67. Es zeigt sich eine starke Korrelation der quantifizierten immunohistochemischen Färbungen mit MMP-1 und Ki-67 in **(a)** BE ($n=41$) ($r=0,943$) und in **(b)** EAC ($n=60$) ($r=0,811$). **(c)** Die Bilder zeigen ein repräsentatives Beispiel von Ki-67 und MMP-1 Koexpression in der Immunfluoreszenz Doppelfärbung (große Pfeile). FITC = grün (Ki-67), Cy3 = rot (MMP-1), DAPI = blau (Kernfärbung). Oben: Kalibrationsbalken repräsentiert 50 µm. Unten: Kalibrationsbalken repräsentiert 25 µm. Das Viereck in der oberen Bilderreihe zeigt den jeweils unten vergrößert dargestellten Bereich an.

3.4 Prognostischer Wert von MMP-1 in Adenokarzinomen

Um Unterschiede im Überleben von Patienten nach erfolgreicher kurativer (R0) Resektion von EAC mit und ohne angrenzenden BE zu analysieren, wurden die Patienten in zwei Subgruppen aufgeteilt (Dichotome Variablen). In der univariaten Analyse wurde gezeigt, dass Lymphknotenmetastasen, pT-Kategorie und Grading ungünstige Faktoren sind (Tabelle 6). Außerdem wurde bei EAC-Patienten eine starke Assoziation zwischen hoher MMP-1-Expression und positivem Lymphknotenstatus gefunden ($p=0,016136582$, Exakter Test nach Fisher, Tabelle 7).

Tabelle 6: Univariante Analyse prognostischer Faktoren der Patienten mit EAC (n=60)

Variable	ungünstiger Faktor	Hazard ratio (HR)	95% CI of HR	p-Wert
Lymphknotenmetastasierung	positiv	12,1940	5,9509-24,9867	<0,0001
Tiefeninvasion	pT3/4	3,8447	1,5309-9,6553	<0,0001
Grading	hoch (G3/G4)	4,0652	1,7123-9,6514	<0,0001
MMP-1-Expression	hoch (≥ 46)	1,4526	0,7101-2,9718	0,3070

Um das Tumor assoziierte Überleben aller EAC-Patienten (n=60) in Abhängigkeit von der MMP-1-Expression zu untersuchen, wurden die Patienten in zwei Subgruppen (hohe und niedrige MMP-1-Expression) aufgeteilt (dichotome Variablen). Das Überleben in der Subgruppe mit hoher MMP-1-Expression war nicht signifikant ($p=0,007$) schlechter als das Überleben der Patienten mit niedriger Expression (Abbildung 6, Tabelle 7 und 8).

Tabelle 7: Klinischpathologische Eigenschaften der EAC Studienpopulation (mit und ohne histologisch nachweisbaren BE)

Eigenschaften	Patienten (n = 60)	MMP-1 EAC		p-Wert
		gering (<46%)	hoch (≥46%)	
Alter (Jahre)				0,605
<66	30 (50%)	13 (43%)	17 (57%)	
≥66	30 (50%)	14 (47%)	16 (53%)	
Geschlecht				0,465
männlich	52 (87%)	24 (46%)	28 (54%)	
weiblich	8 (13%)	5 (63%)	3 (37%)	
Grading				0,032 [†]
G1	17 (28%)	11 (65%)	6 (35%)	
G2	22 (37%)	12 (55%)	10 (45%)	
G3/4	21 (33%)	6 (29%)	15 (71%)	
Tiefeninvasion				0,163 ^{††}
pT1	16 (27%)	9 (56%)	7 (44%)	
pT2	26 (43%)	14 (54%)	12 (46%)	
pT3	10 (17%)	3 (30%)	7 (70%)	
pT4	8 (13%)	3 (38%)	5 (62%)	
Lymphknotenmetastasierung				0,016
pN0	23 (38%)	16 (70%)	7 (30%)	
pN1-3	37 (62%)	13 (35%)	24 (65%)	
UICC Stadium				0,163 ^{†††}
UICC I	14 (23%)	8 (57%)	6 (43%)	
UICC II	28 (47%)	15 (54%)	13 (46%)	
UICC III	18 (30%)	6 (33%)	12 (67%)	
UICC IV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Medianes Gesamtüberleben (Monate)	43	47 (n=29)	38 (n=31)	

[†]G1/2 vs. GT3/4; ^{††}pT1/2 vs. pT3/4; ^{†††}UICC I/II vs. UICC III/IV

Tabelle 8: Eigenschaften der Studienpopulation in Abhängigkeit von der MMP-1-Expression durch BE und EAC

Eigenschaften	Patienten (n = 41)	MMP-1-Expression BE*		p-Wert	MMP-1-Expression EAC		p-Wert
		gering (<46%)	hoch (≥46%)		gering (<46%)	hoch (≥46%)	
Alter (Jahre)				1,000			0,757
<66	21 (51%)	10 (48%)	11 (52%)		4 (19%)	17 (81%)	
≥66	20 (49%)	10 (50%)	10 (50%)		10 (50%)	10 (50%)	
Geschlecht				0,696			0,218
männlich	34 (83%)	16 (47%)	18 (52%)		11 (32%)	23 (68%)	
weiblich	7 (17%)	4 (57%)	3 (43%)		3 (43%)	4 (57%)	
Grading				1,000 [†]			0,590 [†]
G1	11 (27%)	5 (45%)	6 (55%)		6 (55%)	5 (45%)	
G2	16 (39%)	8 (50%)	8 (50%)		8 (50%)	8 (50%)	
G3/4	14 (34%)	7 (50%)	7 (50%)		5 (36%)	9 (64%)	
Tiefeninvasion				0,744 ^{††}			0,524 ^{††}
pT1	10 (24%)	6 (60%)	4 (40%)		6 (60%)	4 (40%)	
pT2	18 (44%)	9 (50%)	9 (50%)		8 (44%)	10 (56%)	
pT3	6 (15%)	3 (50%)	3 (50%)		1 (17%)	5 (83%)	
pT4	7 (17%)	3 (43%)	4 (57%)		2 (29%)	5 (71%)	
Lymphknoten- metastasierung				0,340			0,211
pN0	15 (37%)	9 (60%)	6 (40%)		9 (60%)	6 (40%)	
pN1-3	26 (63%)	11 (42%)	15 (58%)		10 (38%)	16 (62%)	
UICC Stadium				0,744 ^{†††}			0,524 ^{†††}
UICC I	9 (22%)	5 (56%)	4 (44%)		5 (56%)	4 (44%)	
UICC II	19 (46%)	9 (47%)	10 (53%)		10 (53%)	9 (47%)	
UICC III	13 (31%)	6 (46%)	7 (54%)		5 (38%)	8 (62%)	
UICC IV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	0 (0%)	
Medianes Gesamtüberleben (Monate)	42	45 (n=20)	31 (n=21)		45 (n=19)	31 (n=22)	

*Die klinisch-pathologischen Eigenschaften beziehen sich auf den angrenzenden EAC.

[†]G1/2 vs. GT3/4; ^{††}pT1/2 vs. pT3/4; ^{†††}UICC I/II vs. UICC III/IV

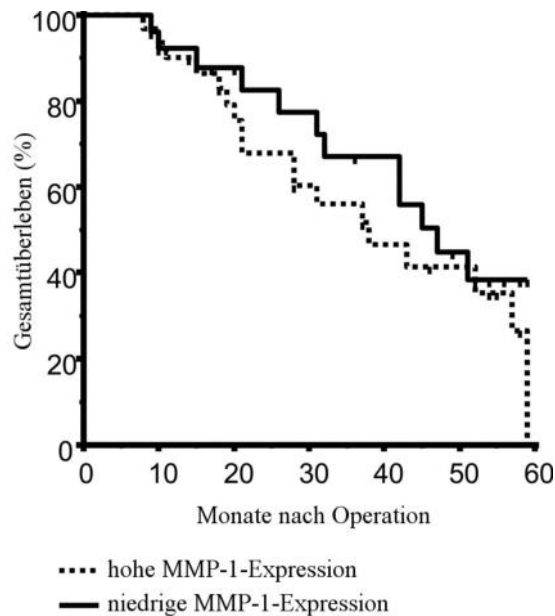


Abbildung 6: Kaplan-Meier Analyse. Eine starke Expression von MMP-1 im EAC (n=60) ist nicht mit einem schlechteren Überleben assoziiert ($p=0,307$). Vertikale Linien zeigen zensierte Fälle an.

Die univariate Analyse des Überlebens nach Kaplan Meier zeigt, dass die MMP-1-Expression im BE und im angrenzenden EAC mit klinischpathologischen Merkmalen assoziiert ist, welche ein schlechtes klinisches Überleben der Patienten mit angrenzendem EACs voraussagen könnte.

Die Multivariate Analyse nach dem Cox-Hazard-Modell zeigt die Lymphknotenmetastasen und Grading unabhängige prognostische Faktoren in allen EACs (n=60) sind (Tabelle 9). Die Expression von MMP-1 ist nicht signifikant und somit kein unabhängiger Prognosefaktor.

Tabelle 9: Multivariate Analyse prognostischer Faktoren der Patienten mit EAC (n=60)

Variable	ungünstiger Faktor	Hazard ratio (HR)	95% CI of HR	p-Wert
Lymphknotenmetastasierung	positiv	9,1861	2,0665-40,8346	0,003746
Tiefeninvasion	pT3/4	1,2336	0,2783-5,4683	0,7834
Grading	hoch (G3/G4)	2,2593	1,0171-5,0186	0,04643

4 Diskussion

In ihrer Übersichtsarbeit „Hallmarks of cancer“ [62] beschreiben Hanahan und Weinberg, dass die Tumorentstehung ein komplexer mehrstufiger Prozess ist. Bei dem Ösophaguskarziom steigt, wie bei vielen anderen Krebserkrankungen, die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit dem biologischen Alter an. Dies verdeutlicht, dass eine Reihe zufälliger Ereignisse notwendigerweise eintreten müssen damit es letztendlich zur Krebsentstehung kommt. Die sechs wichtigsten Charakteristika, welche Tumorzellen von Normalgewebe unterscheiden, sind nach Hanahan und Weinberg: Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber Tumorsuppressoren, Apoptoseresistenz, unbegrenztes Zellteilungspotential, Fähigkeit zur Angiogenese, sowie Invasion und Metastasenbildung [62]. Die Tumordinvasion und die Ausbreitung der Metastasen sind Hauptfaktoren, welche malignes Wachstum ermöglichen. Für die Fähigkeit zur Invasion und Metastasenbildung ist der Abbau von EZM und des die Tumorzellen umgebenden Bindegewebes notwendig [63]. Für die Invasions- und Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen spielen daher extrazelluläre Proteasen eine große Rolle. Diese matrixdegradierenden Proteasen sind mit der Zelloberfläche assoziiert und ermöglichen so zunächst den Durchbruch durch die Basalmembran und nachfolgend die Invasion in benachbarte Gewebestrukturen. Im Jahr 1980 zeigten Liotta et al. erstmalig, dass MMPs an diesem Prozess beteiligt sind, indem sie das Kollagen der Basalmembran abbauen. Sie konnten nachweisen, dass die Typ IV-Kollagenase, heute besser bekannt als MMP-2 und MMP-9, Typ IV-Kollagen abbaut [64]. Später wurde durch Manipulation der endogenen Inhibitoren der MMPs gezeigt, dass MMPs auch bei der Metastasenbildung eine wichtige Rolle spielen [65]. Die hier vorliegende Studie befasst sich mit der Expression von MMP-1 und MMP-13, da bisher keine Daten zur ihrer Funktion im BE und im EAC vorliegen. Die Resultate erhöhter MMP-1-Expression im EAC reihen sich gut in die Studienergebnisse von Untersuchungen zur MMP-1-Expression in anderen Tumorgeweben ein. So wurde bereits gezeigt, dass MMP-1 im kolorektalen Karzinom [45], Pankreaskarzinom [46], hepatozellulären

Karzinom [49], Magenkarzinom [50], Zervixkarzinom [47] sowie Brustkrebs [48] überexprimiert wird, aber jedoch keine Expression der Kollagenase-1 in normalem adulten menschlichem Gewebe stattfindet. In einigen dieser Studien zeigte sich in der univariaten und und teils auch in der multivariaten Analyse ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Expression und einem positivem Lymphknotenstatus bzw. dem Überleben. Dies unterstützt die Hypothese, dass das Protein MMP-1 bei dem Prozess der Invasion und Metastasierung eine wichtige Rolle spielen könnte. Durch ihre Fähigkeit zum Abbau von EZM wird den Tumorzellen der Einbruch in Gefäß- und Lymphsysteme ermöglicht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen ebenfalls diese These. Es wurde unter anderem gezeigt, dass alle untersuchten Gewebe mit invasivem Wachstum eine erhöhte Expression von MMP-1 vorweisen. Auch die präkanzeröse Läsion des nicht invasiv wachsenden BE zeigt eine erhöhte MMP-1-Expression. Diese ist jedoch signifikant geringer als die Expression im BE welcher in direkter Nachbarschaft zum invasiv wachsenden Adenokarzinom vorkommt und auch signifikant geringer als im Karzinom selbst. In der Kontrollgruppe, dem gesunden Plattenepithel, zeigt sich keine Expression von MMP-1.

Andere Studien zeigten darüber hinaus auch die Expression von MMP-13 im hepatozellulären Karzinom [49] sowie in gastrointestinalen Tumoren wie dem kolorektalen Karzinom [51]. Diese Studien zeigten, dass MMP-13 in diesen Fällen eine wichtige Funktion für die Tumorprogression hat. Die Ergebnisse unserer Untersuchung zeigten hingegen keine Expression von MMP-13 im BE oder EAC. Hier sind ggf. weitere Untersuchungen notwendig um sicher zu zeigen, dass MMP-13 nicht exprimiert wird und somit für die Progression des Barrett assoziierten Adenokarzinoms keine Rolle spielt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich neben der möglichen Rolle von MMP-1 und MMP-13 bei der Gewebeinvasion, auch mit dem Zusammenhang zwischen Proteinexpression und positivem Lymphknotenstatus. Das Adenokarzinom des distalen Ösophagus ist eine schnell fortschreitende Erkrankung mit früher lymphatischer und hämatogener Disseminierung, bei welcher eine kurative

Behandlung noch immer auf frühe, durch operative Behandlung vollständig resektable Tumorstadien beschränkt ist. Solange der Tumor auf die Mukosa begrenzt ist, bestehen gute Heilungschancen, da zu diesem Zeitpunkt nur selten Lymphknotenmetastasen vorliegen. Mit zunehmender Invasionsstiefe des Tumors erhöht sich das Risiko einer lymphogenen Metastasierung. Der Lymphknotenbefall ist eine der entscheidenden Prognosefaktoren [69]. Der Metastasierungsprozess besteht aus Angiogenese, Loslösung von Tumorzellen aus dem Primärtumor, lokaler Invasion, Intravasation, Adhäsion an Endothelzellen, Extravasation und Wachstum mit Bildung von Mikrometastasen [63]. Für jeden dieser Schritte sind bereits Moleküle (Adhäsionsmoleküle, verschiedene Wachstumsfaktoren, Motilitätsfaktoren und matrixdegenerierende Enzyme, wie MMP-1) identifiziert worden, die an dieser Entwicklung beteiligt sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Korrelation von hoher MMP-1 Expression mit Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit EAC. Diese Ergebnisse stützen die Theorie, dass die Expression von MMP-1 zur Krebsprogression beiträgt. In Diskrepanz dazu steht, dass anhand der vorliegenden Studiendaten kein Zusammenhang zwischen erhöhter MMP-1-Expression und einer schlechteren Prognose hergestellt werden konnte, obwohl in der univariaten Analyse gezeigt wurde, dass ein positiver Lymphknotenstatus als ungünstiger Faktor gilt.

Bisher ist die genaue Entstehung des BE auf molekularer Ebene nicht vollständig verstanden. Dem seit langem bestehenden Krebsmodell zufolge, bekannt als das Modell der klonalen Evolution von Tumorzellen, entstehen Tumore aus einer einzigen Vorläuferzelle. Durch äußere Einflüsse, wie zum Beispiel Kanzerogene, entstehen genetisch veränderte Zellen. Fast alle diese Zellen sterben ab, da sie durch die immunologische Abwehr zerstört werden oder ihre veränderten Stoffwechsellleistungen keine Überlebenschancen bieten. Nur vereinzelt entsteht per Zufall eine Zelle, welche einen selektiven Vorteil gegenüber den normalen gesunden Zellen hat. Voraussetzung dafür, dass sich aus dieser Zelle nun eine ganze Tumorphilipulation entwickelt ist, dass diese Zelle proliferiert und so genetisch identische Nachkommen produzieren kann,

welche dann ebenfalls einen Überlebensvorteil haben. So bildet sich eine mutierte Subpopulation, bei der alle Zellen von einer einzigen gemeinsamen Vorläuferzelle abstammen. Durch genetische Instabilität werden immer wieder genetisch veränderte Nachkommen generiert. Nur die Zellen mit einem Selektionsvorteil gegenüber den normalen Zellen haben die Möglichkeit zu überleben und zu proliferieren und abnormale Nachkommen zu produzieren. So wird eine Vielzahl an genetisch variablen Krebszellen produziert. Durch diesen Prozess entwickelt sich durch eine Abfolge von Mutationen eine Tumorstammlinie, welche durch stufenweise genetische Veränderungen Tumorzellpopulationen mit Wachstumsvorteilen, wie zum Beispiel dem Entgehen normaler Wachstumskontrolle durch Hormone oder intrazelluläre Mediatoren, entstehen lässt. Anstatt in eine terminale Differenzierung überzugehen, geht der Mitosezyklus weiter. Durch den Verlust der Differenzierung verschwinden die für das Gewebe typischen Funktionen. Die Tumorentwicklung ähnelt dieser Theorie nach der genetischen Evolution und wird daher auch als das klonale Evolutionsmodell der Krebsentwicklung bezeichnet [36]. Die Ergebnisse unserer Untersuchung zeigen, dass im BE und im EAC jeweils dominante Populationen mit proliferierenden, Ki-67-positiven Zellen, vorhanden sind. Diese Zellen könnten, im Sinne der oben beschriebenen mehrstufigen Karzinogenese, das Tumorstadium vorantreiben. Das humane Protein Ki-67 ist in allen aktiven Phasen des Zellzyklus nachweisbar. Es wird in der G₁-Phase, S-Phase, G₂-Phase und während der Mitose exprimiert, jedoch nicht in ruhenden Zellen (G₀-Phase). Somit ist es ein geeigneter Marker um die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation zu bestimmen [57]. Unsere Untersuchungsergebnisse decken sich mit denen anderen Untersuchungen in denen bereits eine Überexpression von Ki-67 im BE und EAC gezeigt wurde [70, 71]. In der hier vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal die gemeinsame Expression von MMP-1 und Ki-67 im BE und EAC nachgewiesen. Diese gemeinsame Expression könnte ein Hinweis darauf sein, dass MMP-1 die Progression von BE zu EAC im Sinne des mehrstufigen Karzinogenesemodells vorantreibt. Nur die Fraktion der proliferierenden Zellen ist am Tumorstadium beteiligt und eine hohe

Expression von Ki-67 zeigt somit die potentielle Aggressivität eines Tumors an. Nach dem Konzept der klonalen Evolution ist die Möglichkeit zur Proliferation eine herausragende Eigenschaft der Tumorentwicklung. Hier konnte nun erstmals gezeigt werden, dass diese Eigenschaft in den Tumorzellen zusammen mit der Expression von MMP-1 vorliegt.

Im Sinne des klonalen Evolutionsmodells der Tumorentwicklung müssen Tumorzellen einen Selektionsvorteil gegenüber normalen gesunden Zellen haben [36]. Eines der primären Ereignisse in der klonalen Tumorexpansion ist die Möglichkeit der Zelle zu einer ungehemmten Proliferation bzw. die Unabhängigkeit gegenüber der normalen Wachstumskontrolle. Dies ermöglicht eine klonale Expansion und es erlaubt der Tumorzelle somit eine dominierende Subpopulation bilden zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde die Koexpression des Proliferationsmarkers Ki-67 und der Kollagenase MMP-1 untersucht. Ki-67 wird nur von Zellen exprimiert, welche sich außerhalb der Ruhephase (G_0 -Phase) des Zellzyklus befinden. Die Analyse der Koexpression zeigte, dass MMP-1 hauptsächlich von Zellen des BE und des EAC gebildet wird, welche sich in der aktiven Proliferation befinden. MMP-1 wird also von den Zellen exprimiert, welche nach dem Modell der klonalen Tumorentwicklung eine wichtige Rolle in der Tumorexpansion spielen. MMP-1 wird schon im frühen Barrett in den Zellen exprimiert, welche sich in der Proliferationsphase befinden. Diese Tatsache könnte zeigen, dass MMP-1 schon in der Frühphase der Tumorentstehung mitwirkt. Das die Expression von MMP-1 im BE insgesamt geringer ist als im späteren Karzinom könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Expression von MMP-1 im Sinne der klonalen Tumorentwicklung ein Selektionsvorteil bedeutet.

Murray et al. untersuchten bereits 1998 die Expression von MMP-1, MMP-2 und MMP-9 im ESCC und EAC [42]. Im Gegensatz zur hier vorliegenden Studie wurde jedoch die Entwicklungsstufe des BEs unberücksichtigt gelassen. In beiden Studien zeigte sich eine erhöhte MMP-1-Expression im ESCC und EAC. In der hier vorliegenden Studie gab es jedoch, im Gegensatz zur damaligen

Studie, einen signifikanten Unterschied in der Höhe der Expression von MMP-1 im EAC und im ESCC. Insgesamt wurden damals nur 46 Proben untersucht. Wir haben die Expression an insgesamt 88 Proben (inklusive BE) untersucht. Es wurde beschrieben, dass eine erhöhte Expression von MMP-1 im ESCC und im EAC mit einer schlechten Prognose assoziiert ist und die Expression von MMP-1 wurde als einen unabhängigen Prognosefaktor beschrieben. Auch unsere Studie zeigt, dass eine erhöhte MMP-1-Expression mit einer Tumorprogression des EAC einhergeht. Im Gegensatz zu Murray lag jedoch der oben genannte prognostische Effekt nicht vor.

In der vorliegenden Studie wurde außerdem die Expression von MMP-1 im EAC im Zusammenhang mit BE analysiert. Die Expression von MMP-1 im EAC ohne assoziiertes BE war vergleichbar mit der MMP-1-Expression im EAC mit BE. EAC kommt nur in seltenen Fällen unabhängig von histologisch nachweisbarem BE vor. Für diese Fälle wird angenommen, dass auch hier ursprünglich eine Barrett-Metaplasie vorhanden war, welche jedoch dann von dem EAC „überwuchert“ wurde und so die ehemals metaplastische Schleimhaut aus diesem Grund nicht mehr nachweisbar ist [72]. Demnach würde auch auf das EAC ohne BE das pathogenetische Modell zutreffen, wonach sich das EAC auf dem Boden eines BE entwickelt. Die vergleichbar hohe Expression von MMP-1 im EAC mit und ohne BE könnte ein Hinweis darauf sein.

Die Rolle von MMPs bei der Tumorprogression und Metastasenbildung lässt vermuten, dass der Einsatz von MMP-Inhibitoren eine Erfolg versprechende Therapieoption sein könnte. Die Vorstellung ist, dass synthetische Metalloproteinase-Inhibitoren (MPI) das Voranschreiten des Tumorwachstums und den Metastasierungsprozess hemmen oder zumindest verlangsamen könnten. Diese Theorie wurde zunächst durch zahlreiche Studien gestützt, welche zeigen, dass eine Überexpression von TIMPs das Metastasenwachstum reduzieren konnte. Die daraufhin entwickelten Breitspektrum-MMPs erwiesen sich jedoch nur bei sehr frühen Tumorstadien als wirksam und in klinischen Studien zeigten sich starke, dosislimitierende Nebenwirkungen wie muskuloskeletale Schmerzen und Entzündungsreaktionen [73]. Um eine

wirkungsvolle und nebenwirkungsarme Therapie durchführen zu können wäre es notwendig MMPs selektiv zu hemmen. Dazu wird der Nachweis benötigt, in welchen Tumoren und in welchen Tumorstadien welches MMP exprimiert wird. Die vorliegende Studie zeigt, dass MMP-1 ausschließlich von Tumor- und Barrettzellen produziert wird und nicht von gesundem Gewebe. Es konnte in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, dass die Expression in proliferierenden Zellen, welche eine große Bedeutung bei der Tumorexpansion haben, besonders hoch ist. Diese Tatsache macht das Protein zu einem interessanten Ansatzpunkt für die Therapie, da durch seine Hemmung selektiv nur BE und EAC-Zellen Angriffspunkt der Therapie wären.

Nach der Krebsstammzelltheorie sind Tumore hierarchisch organisiert, das bedeutet, dass Zellen eines Tumors unterschiedliche Eigenschaften haben. So haben nur die Stammzellen das Potential zur ungehemmten Zellteilung. Für die Tumorprogression sind die proliferierenden Zellen von großer Bedeutung [37]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MMP-1 in den proliferierenden Zellen exprimiert wird, jene Zellen welche der Stammzelltheorie nach Angriffspunkte der Therapie sein müssten. Ein Therapieansatz mit MMP-1-Inhibitoren würde demnach genau diese proliferierenden Zellen angreifen.

Ein Nachteil der MMP-Inhibitoren wäre, dass sie nur zytostatisch wirken können und nicht zytotoxisch. Das bedeutet, ein Tumorwachstum könnte potentiell nur verhindert, der schon vorhandene Tumor jedoch nicht verkleinert werden. Gleichwohl könnte der Einsatz von MMP-1-Inhibitoren eine vielversprechende Therapieoption darstellen.

5 Zusammenfassung

Das Adenokarzinom des Ösophagus gewinnt aufgrund eines ungeklärten Inzidenzanstiegs in den letzten Jahrzehnten in den westlichen Industrienationen sowie seiner schlechten Prognose zunehmend an klinischer Bedeutung. Es wird vermutet, dass das Adenokarzinom durch gastroösophagealen Reflux auf dem Boden der präkanzerösen Läsion des Barrett-Ösophagus entsteht. Die Karziogenese wird als mehrstufiger Prozess, bestehend aus Initiation, Promotion und Progression, verstanden. Matrix-Metalloproteasen befinden sich in der Extrazellulären Matrix und können diese abbauen. Aufgrund dessen könnten sie eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression spielen. MMP-1 und MMP-13 sind tumorassoziierte Kollagenasen die bereits in anderen Karzinomen, unter anderem in Tumoren des Gastrointestinaltraktes und des hepatozellulären Karzinoms, nachgewiesen wurden. Bisher gibt es jedoch keine Untersuchungen zur Expression von MMP-1 und MMP-13 im EAC bzw. BE. Ziel der Arbeit war es die Expression von MMP-1 und MMP-13 im EAC (mit und ohne assoziierten BE) sowie im nicht-dysplastischen BE (ohne Evidenz einer IN) und im ESCC zu untersuchen. Dazu wurden Resektionspräparate von insgesamt 70 Patienten mit Ösophaguskarzinom (n=41 EAC mit BE, n=19 EAC ohne BE, n=10 ESCC) sowie Biopsien von 18 Patienten mit nicht-dysplastischem Barrett-Ösophagus untersucht. Als Methoden wurden immunhistochemische Färbungen zur Markierung der Proteine MMP-1 und MMP-13 durchgeführt. Mittels immunhistochemischer Doppelfärbung wurde die Expression von MMP-1 und Cdx-2, als Marker für intestinale Metaplasie, untersucht. Die Immunfluoreszenzdoppelfärbung wurde zur Analyse der Koexpression von MMP-1 und dem Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung wurden mithilfe einer RT-PCR auf mRNA-Ebene bestätigt.

Im gesunden Plattenepithel wurde weder MMP-1 noch MMP-13 exprimiert. In allen Präparaten, in denen EAC ohne Barrett assoziiert vorkam, wurde eine Expression von MMP-1 gezeigt (100%). In den Präparaten in denen EAC in

direkter Nachbarschaft zum Barrett vorkam, war in 95% der Fälle MMP-1 im Karzinom nachweisbar. Die Expression von MMP-1 im Barrett ohne IN lag bei 56%. Das ESCC exprimierte in 6 von 10 Fällen MMP-1. Bei der quantitativen Analyse zeigten sich 48% MMP-1 positive Zellen im EAC mit BE und 35% positive Zellen im angrenzendem BE ($p < 0,05$). Mit 44% MMP-1 positiver Zellen im EAC ohne BE lag die Expression signifikant über der im BE mit angrenzendem EAC ($p < 0,05$). Im ESCC lag mit 32% MMP-1 positiver Zellen eine im Vergleich zu allen EACs signifikant geringere Expression vor. Im BE ohne IN wurde in 4% der Zellen MMP-1 exprimiert. Die RT-PCR bestätigte die Ergebnisse der Immunhistochemie auf mRNA-Ebene. Es zeigte sich eine im Vergleich zum BE signifikant höhere Expression von MMP-1 im EAC. Eine MMP-13-Expression war in keinem der Gewebe nachweisbar. Die Untersuchung der Koexpression von MMP-1 in proliferierenden Ki-67 positiven Zellen zeigte eine starke direkte Korrelation ($r = 0,943$ für BE und $r = 0,811$ für EAC). Bei der Untersuchung des prognostischen Wertes der MMP-1-Expression konnte ein starker Zusammenhang zwischen Höhe der Expression von MMP-1 und einem positiven Lymphknotenstatus festgestellt werden. Das Tumor assoziierte Überleben bei Patienten mit hoher MMP-1-Expression war jedoch nicht signifikant geringer als das bei Patienten mit niedriger Expression ($p = 0,307$).

Die Ergebnisse zeigen, dass das Protein MMP-1 eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung des Barrett assoziierten Adenokarzinoms spielen könnte. Die Assoziation eines positiven Lymphknotenstatus mit hoher MMP-1-Expression spricht dafür, dass das Protein MMP-1 ein wichtiger Faktor bei der malignen Progression sein könnte. Das Modell der klonalen Evolution von Tumorzellen konnte durch die Ergebnisse der Arbeit, welche eine starke Expression von MMP-1 in proliferierenden Zellen zeigte, unterstützt werden. Die Hemmung der Proteinwirkung durch einen synthetischen Metalloproteinasen-Inhibitor könnte zukünftig einen Therapieansatzpunkt darstellen.

6 Abkürzungen

- AEG = Adenocarcinoma of the oesophagogastric junction
Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs
- BE = Barrett's esophagus
Barrett Ösophagus
- CI = confidence interval
Konfidenzintervall
- Cdx-2 = caudal type homeobox transcription factor 2
- BSA = bovine serum albumine
Rinderserumalbumin
- DAPI = 4',6-Diamindino-2-Phenylindoldihydrochlorid
- EAC = Esophageal adenocarcinoma
ösophageales Adenokarzinom
- EZM = Extrazellulärmatrix
- ESCC = Esophageal squamous cell carcinoma
ösophageales Plattenepithelkarzinom
- FITC = Fluoresceinisothiocyanat
- GERD = Gastroesophageal Reflux Disease
gastroösophageale Refluxkrankheit
- IF = Immunfluoreszenz
- IHC = Immunhistochemie
- IN = Intraepitheliale Neoplasie
- IQR = inter quartil range
- MMP = Matrix-Metalloproteinasen
- n = Anzahl
- NCI = National Cancer Institute
- PCR = polymerase-chain-reaction
Polymerase-Kettenreaktion
- RT = Raumtemperatur
- SEER = Surveillance, Epidemiology and End Result Programm des National
Cancer Institute

TIMP = Tissue inhibitor of metalloproteinases
Gewebespezifischer Inhibitor der MMPs

UICC = International Union against Cancer

7 Literaturverzeichnis

1. 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.
2. Lagergren, J., et al., *Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma*. N Engl J Med, 1999. **340**(11): p. 825-31.
3. Becker, N. and J. Wahrendorf, *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland*. 1981-1990, Berlin Heidelberg New York: Springer.
4. *Krebs in Deutschland 2009/2010*. Vol. 9. 2013, Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
5. Howlader N, N.A., Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/, based on November 2011 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2012.
6. Devesa, S.S., W.J. Blot, and J.F. Fraumeni, Jr., *Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States*. Cancer, 1998. **83**(10): p. 2049-53.
7. Pohl, H. and H.G. Welch, *The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(2): p. 142-6.
8. Bollschweiler, E. and A.H. Holscher, [*Carcinoma of the esophagus--actual epidemiology in Germany*]. Onkologie, 2001. **24**(2): p. 180-4.
9. Chow, W.H., et al., *Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(2): p. 150-5.

10. Kubo, A. and D.A. Corley, *Body mass index and adenocarcinomas of the esophagus or gastric cardia: a systematic review and meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(5): p. 872-8.
11. Lagergren, J., R. Bergstrom, and O. Nyren, *Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia*. Ann Intern Med, 1999. **130**(11): p. 883-90.
12. Vaughan, T.L., et al., *Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995. **4**(2): p. 85-92.
13. Hampel, H., N.S. Abraham, and H.B. El-Serag, *Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications*. Ann Intern Med, 2005. **143**(3): p. 199-211.
14. Corley, D.A., A. Kubo, and W. Zhao, *Abdominal obesity and the risk of esophageal and gastric cardia carcinomas*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(2): p. 352-8.
15. Lagergren, J., et al., *The role of tobacco, snuff and alcohol use in the aetiology of cancer of the oesophagus and gastric cardia*. Int J Cancer, 2000. **85**(3): p. 340-6.
16. Sobin, L. and C. Wittekind, *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7 ed, ed. UICC. 2009.
17. Shaheen, N. and D.F. Ransohoff, *Gastroesophageal reflux, Barrett esophagus, and esophageal cancer: clinical applications*. JAMA, 2002. **287**(15): p. 1982-6.
18. Sundelof, M., et al., *Improved survival in both histologic types of oesophageal cancer in Sweden*. Int J Cancer, 2002. **99**(5): p. 751-4.
19. Lagergren, J. and F. Mattson, *Diverging trends in recent population-based survival rates in oesophageal and gastric cancer*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41352.
20. Spechler, S.J., *Clinical practice. Barrett's Esophagus*. N Engl J Med, 2002. **346**(11): p. 836-42.

21. Sjoquist, K.M., et al., *Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis*. *Lancet Oncol*, 2011. **12**(7): p. 681-92.
22. Siewert, J.R. and H.J. Stein, *Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction*. *Br J Surg*, 1998. **85**(11): p. 1457-9.
23. Stein, H.J. and J.R. Siewert, *Karzinom des ösophagogastralen Übergangs und Barrett-Ösophagus*. *Chirurg*, 2003. **74**: p. 703-8.
24. de Jonge, P.J. and F. Hvid-Jensen, *Barrett's oesophagus: size does matter*. *Gut*, 2015.
25. Stein, H.J., M. Feith, and H. Feussner, *The relationship between gastroesophageal reflux, intestinal metaplasia and adenocarcinoma of the esophagus*. *Langenbecks Arch Surg*, 2000. **385**(5): p. 309-16.
26. 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.
27. Hvid-Jensen, F., et al., *Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(15): p. 1375-83.
28. Souza, R.F., K. Krishnan, and S.J. Spechler, *Acid, bile, and CDX: the ABCs of making Barrett's metaplasia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **295**(2): p. G211-8.
29. Slack, J.M. and D. Tosh, *Transdifferentiation and metaplasia--switching cell types*. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. **11**(5): p. 581-6.
30. Ladewig, J., P. Koch, and O. Brustle, *Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(4): p. 225-36.
31. Zhang, H.Y., S.J. Spechler, and R.F. Souza, *Esophageal adenocarcinoma arising in Barrett esophagus*. *Cancer Lett*, 2009. **275**(2): p. 170-7.
32. Sarosi, G., et al., *Bone marrow progenitor cells contribute to esophageal regeneration and metaplasia in a rat model of Barrett's esophagus*. *Dis Esophagus*, 2008. **21**(1): p. 43-50.
33. Seery, J.P., *Stem cells of the oesophageal epithelium*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 9): p. 1783-9.

34. Vincent, T.L. and R.A. Gatenby, *An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis*. Int J Oncol, 2008. **32**(4): p. 729-37.
35. Hennings, H., et al., *Critical aspects of initiation, promotion, and progression in multistage epidermal carcinogenesis*. Proc Soc Exp Biol Med, 1993. **202**(1): p. 1-8.
36. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
37. Shackleton, M., et al., *Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution*. Cell, 2009. **138**(5): p. 822-9.
38. Jeon, J., E.G. Luebeck, and S.H. Moolgavkar, *Age effects and temporal trends in adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia (United States)*. Cancer Causes Control, 2006. **17**(7): p. 971-81.
39. Verma, R.P. and C. Hansch, *Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs*. Bioorg Med Chem, 2007. **15**(6): p. 2223-68.
40. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21491-4.
41. Kahari, V.M. and U. Saarialho-Kere, *Matrix metalloproteinases in skin*. Exp Dermatol, 1997. **6**(5): p. 199-213.
42. Murray, G.I., et al., *Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer*. J Pathol, 1998. **185**(3): p. 256-61.
43. Tanioka, Y., et al., *Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 are associated with unfavourable prognosis in superficial oesophageal cancer*. Br J Cancer, 2003. **89**(11): p. 2116-21.
44. Salmela, M.T., et al., *Upregulation and differential expression of matrilysin (MMP-7) and metalloelastase (MMP-12) and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-3 in Barrett's oesophageal adenocarcinoma*. Br J Cancer, 2001. **85**(3): p. 383-92.
45. Bendardaf, R., et al., *MMP-1 (collagenase-1) expression in primary colorectal cancer and its metastases*. Scand J Gastroenterol, 2007. **42**(12): p. 1473-8.

46. Yamamoto, H., et al., *Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression.* J Clin Oncol, 2001. **19**(4): p. 1118-27.
47. Moser, P.L., et al., *Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMP) 1 and 2, and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP 2) in stage IB cervical cancer.* Anticancer Res, 1999. **19**(5C): p. 4391-3.
48. Vizoso, F.J., et al., *Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer.* Br J Cancer, 2007. **96**(6): p. 903-11.
49. Altadill, A., et al., *Liver expression of matrix metalloproteases and their inhibitors in hepatocellular carcinoma.* Dig Liver Dis, 2009. **41**(10): p. 740-8.
50. Inoue, T., et al., *Matrix metalloproteinase-1 expression is a prognostic factor for patients with advanced gastric cancer.* Int J Mol Med, 1999. **4**(1): p. 73-7.
51. Leeman, M.F., J.A. McKay, and G.I. Murray, *Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer.* J Clin Pathol, 2002. **55**(10): p. 758-62.
52. Phillips, R.W., H.F. Frierson, Jr., and C.A. Moskaluk, *Cdx2 as a marker of epithelial intestinal differentiation in the esophagus.* Am J Surg Pathol, 2003. **27**(11): p. 1442-7.
53. Bai, Y.Q., et al., *Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach.* Cancer Lett, 2002. **176**(1): p. 47-55.
54. Eda, A., et al., *Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa.* J Gastroenterol, 2003. **38**(1): p. 14-22.
55. Kazumori, H., et al., *Bile acids directly augment caudal related homeobox gene Cdx2 expression in oesophageal keratinocytes in Barrett's epithelium.* Gut, 2006. **55**(1): p. 16-25.

56. Liu, T., et al., *Regulation of Cdx2 expression by promoter methylation, and effects of Cdx2 transfection on morphology and gene expression of human esophageal epithelial cells*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(2): p. 488-96.
57. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
58. Hamilton, S.R. and L.A. Aaltonen, *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*. 3 ed. 2000: IARC Press. 314.
59. Werner, M., et al., *Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry*. *Am J Surg Pathol*, 2000. **24**(7): p. 1016-9.
60. Kaplan, E.L. and P. Meier, *Nonparametric-Estimation from Incomplete Observations*. *Journal of the American Statistical Association*, 1958. **53**(282): p. 457-481.
61. Cox, D.R., *Regression Models and Life-Tables*. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology*, 1972. **34**(2): p. 187-&.
62. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
63. Hart, I.R. and A. Saini, *Biology of tumour metastasis*. *Lancet*, 1992. **339**(8807): p. 1453-7.
64. Liotta, L.A., et al., *Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen*. *Nature*, 1980. **284**(5751): p. 67-8.
65. Schultz, R.M., et al., *Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells*. *Cancer Res*, 1988. **48**(19): p. 5539-45.
66. Chambers, A.F. and L.M. Matrisian, *Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis*. *J Natl Cancer Inst*, 1997. **89**(17): p. 1260-70.
67. Li, Y., et al., *Overexpression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma*. *Dis Esophagus*, 2009. **22**(8): p. 664-7.

68. Li, Y., et al., *Association of functional polymorphisms in MMPs genes with gastric cardia adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma in high incidence region of North China*. *Mol Biol Rep*, 2010. **37**(1): p. 197-205.
69. Demeester, S.R., *Epidemiology and biology of esophageal cancer*. *Gastrointest Cancer Res*, 2009. **3**(2 Suppl): p. S2-5.
70. Kerkhof, M., et al., *Aneuploidy and high expression of p53 and Ki67 is associated with neoplastic progression in Barrett esophagus*. *Cancer Biomark*, 2008. **4**(1): p. 1-10.
71. Heeren, P.A., et al., *Predictive effect of p53 and p21 alteration on chemotherapy response and survival in locally advanced adenocarcinoma of the esophagus*. *Anticancer Res*, 2004. **24**(4): p. 2579-83.
72. Cameron, A.J., et al., *Adenocarcinoma of the esophagogastric junction and Barrett's esophagus*. *Gastroenterology*, 1995. **109**(5): p. 1541-6.
73. Coussens, L.M., B. Fingleton, and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations*. *Science*, 2002. **295**(5564): p. 2387-92.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Burkhard von Rahden für die Überlassung des Themas und für die hilfreichen Korrekturvorschläge beim Erstellen der Arbeit. Ein weiterer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. dent. Martin Grimm für die sehr gute Betreuung und Unterstützung der Laborarbeit. Herzlichen Dank auch an Christoph Reiber für die immer gute und aufheiternde Zusammenarbeit.

Eigene Veröffentlichungen

1. von Rahden BH, Kircher S, Lazariotou M, Reiber C, **Stuermer L**, Otto C, Germer CT, Grimm M. 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 Feb 23;30:23.
2. Grimm M, Lazariotou M, Kircher S, **Stuermer L**, Reiber C, Höfelmayr A, Gattenlöhner S, Otto C, Germer CT, von Rahden BH. MMP-1 is a (pre-)invasive factor in Barrett-associated esophageal adenocarcinomas and is associated with positive lymph node status. J Transl Med. 2010 Oct 14;8:99.
3. von Rahden BH, Kircher S, Kafka M, **Stuermer L**, Reiber C, Gattenlöhner S, Germer CT, Grimm M. Glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor (GITR)-expression in tumor infiltrating leucocytes (TILs) is associated with the pathogenesis of esophageal adenocarcinomas with and without Barrett's mucosa. Cancer Biomark. 2010;7(6):285-94.