

**Cyclooxygenase 2 Expression im Adenokarzinom des distalen Ösophagus
und seinen prämaligen Vorstufen
in Relation zu Proliferation und Apoptose**

Anne Catharina Spieß

Chirurgische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J.R.Siewert)

**Cyclooxygenase 2 Expression im Adenokarzinom des distalen Ösophagus
und seinen prämaligen Vorstufen
in Relation zu Proliferation und Apoptose**

Anne Catharina Spieß

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. apl.Prof. Dr. H. J. Stein
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 11.11.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005 angenommen.

Meinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

A	EINLEITUNG	3
1.	Adenokarzinom des distalen Ösophagus	4
1.1	Epidemiologie	4
1.2	Pathogenese	5
1.3	Klinisches Bild und Diagnostik	10
1.4	Metastasierung	10
1.5	Klassifikation	11
1.6	Therapie	12
1.7	Prognose	13
2.	Cyclooxygenase 2	
2.1	Die Prostaglandinbiosynthese	14
2.2	Biochemie der Cyclooxygenase	16
2.3	Physiologische Bedeutung der COX-2	17
2.4	Rolle in der Karzinogenese	18
3.	Apoptose	
3.1	Physiologische Bedeutung	20
3.2	Intrinsische Kaskade	21
3.3	Extrinsische Kaskade	22
4.	Proliferation	
4.1	Physiologische Bedeutung	23
4.2	Bedeutung von Ki-67	24
5.	Zielsetzung	25
B	MATERIAL UND METHODEN	
1.	Patientenkollektiv	26
2.	Allgemeiner Versuchsablauf	27
2.1	Probengewinnung und Herstellung der Präparate	27
2.2	Immunhistochemie	28
2.2.1	Allgemeines zur Methodik	28
2.2.2	Prinzip der Labeled (Strept-) Avidin-Biotin Methode (LAB/LSAB)	29
2.2.3	Durchführung der immunhistochemischen Färbung	30
3.	Auswertung	33
3.1	Semiquantitative Analyse der COX-2 Färbung	33
3.2	Quantitative Analyse der Doppelfärbung	35
4.	Statistik	36
C	ERGEBNISSE	
1.	Lokalisation der immunhistochemischen Färbung	37

2.	Expression von Cox-2, Ki-67 und Bcl-2 in der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz des Barrett-Karzinoms	
2.1	COX-2 in der Sequenz	39
2.2	Ki-67 in der Sequenz	40
2.3	Bcl-2 in der Sequenz	41
3.	Expression von Cox-2, Ki-67 und Bcl-2 im Barrett-Karzinom	
3.1	Korrelation von COX-2 Expression und Bcl-2	42
3.2	Korrelation von COX-2 Expression und Ki-67 (Proliferation)	43
3.3	Korrelation von COX-2 Expression und lokoregionärer Lymphknotenmetastasierung	44
4.	Überlebensanalysen	
4.1	COX-2 Überlebenskurven	45
4.2	Bcl-2 Überlebenskurven	46
4.3	Ki-67 Überlebenskurven	47
D	DISKUSSION	
1.	Methode	48
2.	Ergebnisse	50
E	ZUSAMMENFASSUNG	55
F	SUMMARY	57
G	LITERATURVERZEICHNIS	59
H	TABELLENVERZEICHNIS	68
I	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	69
J	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	70
	Danksagungen	71
	Lebenslauf	72

A EINLEITUNG

Epidemiologische Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass Adenokarzinome des distalen Ösophagus den höchsten Inzidenzanstieg aller malignen Tumore in der westlichen Welt haben (Blot et al. 1991, Altorki et al. 1997, Devesa et al. 1998). Unter dem chronisch schädigenden Einfluß von gastroösophagealem Reflux soll sich das Plattenepithel der Mukosa in eine intestinale Metaplasie umwandeln. Patienten mit einer Barrett Mukosa haben ein jährliches Risiko von 1% ein Adenokarzinom zu entwickeln (Tygat 1992). Die Karzinogenese ist mit verschiedenen molekulargenetische Veränderungen assoziiert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit variabler Intensität im Verlauf der Sequenz beschrieben werden.

Die Cyclooxygenase ist ein membrangebundenes Glycoprotein, das als Schlüsselenzym im Prostaglandinstoffwechsel fungiert. Es existieren zwei Isoformen des Proteins, Cyclooxygenase 1 und 2, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. COX-1 wird ubiquitär und kontinuierlich exprimiert, die COX-2 Expression hingegen ist weitgehend selektiven Zell- und Gewebearten vorbehalten. Sie kann aber als Antwort auf unterschiedliche Stimuli auch in anderen Geweben induziert werden. Neben einer inflammatorischen Komponente wird COX-2 in vitro Studien eine mutagene und karzinogene Wirkung zugeschrieben. Neue Studien haben COX-2 eine Bedeutung in kolorektaler, gastraler und ösophagealer Karzinogenese zugesprochen. So konnte auf Proteinebene eine COX-2 Überexpression im kolorektalen Adenom und Karzinom (Eberhart et al. 1994), im Magenkarzinom (Soydan et al. 1997) und im Adenokarzinom des distalen Ösophagus (Wilson et al. 1998) nachgewiesen werden.

Aus der selektiven Inhibition von COX-2 resultiert die Suppression neoplastischer Polypen in APC-Knockout-Mäusen als Model für familiäre Adenomatosis polyposis (Oshima et al. 1996). Untersuchungen an Kolonkarzinomen ergaben Hinweise auf eine mögliche Risikominimierung der Karzinomentstehung durch nichtsteroidale Antirheumatika.

1. Adenokarzinom des distalen Ösophagus

Bei 7% aller Malignome des Gastrointestinaltraktes handelt es sich um Ösophaguskarzinome (Hahn et al. 2000). Darunter fasst man das Adenokarzinom des distalen Ösophagus und das Plattenepithelkarzinom, sowie seltenere Entitäten zusammen. 1987 wurden die Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs (AEG) nach Siewert klassifiziert (Siewert et al. 1987). Diese AEG Klassifikation schließt jene Tumoren ein, die ihr Zentrum 5 cm proximal oder distal der anatomischen Kardia haben. Aus therapeutischer und prognostischer Sicht wurden drei verschiedenen Tumor-Entitäten unterschieden. Als AEG Typ I bezeichnet man das Adenokarzinom des distalen Ösophagus, beim Typ II handelt es sich um das Kardiakarzinom und der Typ III umfasst die subcardialen Karzinome (Stein et al. 2000). Gegenstand unserer Untersuchungen ist das Adenokarzinom des distalen Ösophagus, AEG Typ I nach Siewert.

1.1 Epidemiologie

In der westlichen Welt liegt die Inzidenz des Ösophaguskarzinoms in der männlichen Bevölkerung bei 2,5 - 5 pro 100.000 Einwohner. Bei Frauen beläuft sich die Zahl der Neuerkrankungen auf 1,5 - 2,5 pro 100.000 Einwohner (Hahn et al. 2000). In „high-volume“ Zentren machen derzeit die Adenokarzinome circa 50% der Ösophagustumoren aus. Sie haben den höchsten Inzidenzanstieg aller malignen Tumoren (Siewert et al. 2001).

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 60 Jahren, das Verhältnis Männer zu Frauen beträgt im Mittel 9 : 1.

Die Prävalenz des Adenokarzinoms beim Barrett-Ösophagus liegt in retrospektiven Untersuchungen im Mittel bei 14%, schwankt jedoch zwischen 4 und 46% (Stein et al. 1993). Prospektive Langzeituntersuchungen im Rahmen von Surveillance-Programmen zeigen eine Inzidenz von 1/152 bis 1/441 Patientenjahre, somit ein um den Faktor 30 - 125 erhöhtes

Risiko für die Entstehung eines Adenokarzinoms bei Patienten mit Endobrachyösophagus oder Barrett-Ösophagus. (Dent et al. 1991, Spechler et al. 1986, Tytgat et al. 1992).

1.2 Pathogenese

Bedingt durch gastroösophagealen Reflux kommt es im distalen Ösophagus zu einer Metaplasie des Plattenepithels, welche sich in intestinale Mukosa umwandelt. Es wird angenommen, dass die maligne Transformation schrittweise über verschiedene Stufen von der intestinalen Metaplasie über die intraepitheliale Neoplasie zum invasiven Karzinom verläuft (Werner et al. 1999, Spechler et al. 1996). Der Terminus High-grade-Dysplasie wurde in der Literatur durch den Begriff der intraepithelialen Neoplasie ersetzt (Hamilton et al. 2000). Neuere Studien zeigen, dass verschiedene genetische, chromosomale und zytologische Veränderungen in der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz einen entscheidenden Faktor in der Karzinomentstehung darstellen (Walch et al. 2000).

Barrett Mukosa

Bei der Zylinderepithelmetaplasie (esophageal columnar metaplasia, ECM) wird das physiologischen Plattenepithel der Speiseröhre durch Zylinderepithel ersetzt.

Für die Mehrzahl der Patienten stellt die ECM die erworbene Folge einer lang andauernden chronischen gastroösophagealen Refluxerkrankung dar (Monnier et al. 1987). ECM kann bei bis zu 10% aller Patienten mit Refluxösophagitis nachgewiesen werden (Phillips und Wong 1991).

Obwohl sich das Verständnis der ECM in den letzten Jahren sehr verbessert hat, ist der genaue pathophysiologische Mechanismus noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt Hinweise, dass größere Abschnitte von Plattenepithel, welche durch Reflux beschädigt wurden durch Zylinderepithel ersetzt werden (Spechler et al. 1996).

Endoskopisch imponiert die Zylinderepithelmetaplasie durch eine scharf begrenzte lachsfarbene Schleimhaut und eine deutliche Hyperämie (Sjogren et al. 1983).

Die Barrett-Schleimhaut definiert sich histologisch durch schleimproduzierende Becherzellen. Desweiteren zeigt sich ein „Mosaik“ aus Zellen, Drüsen und architektonischen Veränderungen, die ein unterschiedliches Ausmaß an Differenzierung bis hin zu einem intestinalen oder gastrischen Epithel aufweisen (Reid 1991). Neben den charakteristischen schleimproduzierenden Becherzellen, neuroendokrinen (enterochromaffinen) Zellen, Haupt- und Parietalzellen findet man auch resorbierende Zellen, die vergleichbar sind mit den Enterozyten des Dünndarms.

Auf zytologischer Ebene findet sich im metaplastischen Gewebe eine erhöhte Mitoserate, die eine genetische Instabilität begünstigen könnte. Polaritätsverlust der Zellen, die sich unter anderem durch Defekte der Proteine der rab- Familie erklären lassen und Allelverlust auf bestimmten Chromosomenarmen (LOH : loss of heterozygosity) sind in der Barrett-Schleimhaut ebenfalls häufig zu finden.

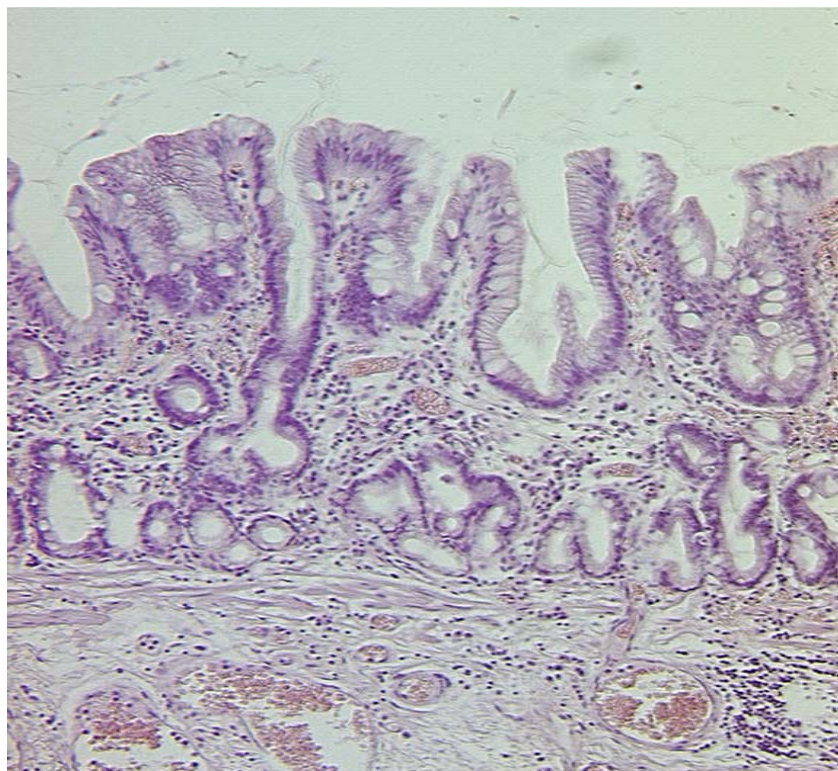


Abbildung 1: HE- Färbung Barrett-Metaplasie

Dysplasie / Intraepitheliale Neoplasie

Die karzinomatöse Entartung der Zylinderepithelmetaplasie ist vermutlich die Folge von verschiedenen genetischen Veränderungen. Bevor diese Veränderungen so weit fortschreiten, dass die tumorösen Zellen benachbarte Gewebe invadieren und proliferieren können, zeigen sich bereits morphologische Atypien, die histologisch als Dysplasie identifizierbar sind.

Die Dysplasie wird in neuer Nomenklatur als intraepitheliale Neoplasie bezeichnet (Hamilton et al. 2000). Sie umfaßt milde (Low-grade-Dysplasia : LGD) bis schwerwiegende Veränderungen (High-grade-Dysplasia: HGD) (Riddell 1985).

Bei der intraepithelialen Neoplasie handelt es sich um eine histopathologische Diagnose, die einer erheblichen Interobservervariabilität unterliegt. Aus diesem Grund wurde die „Wien Klassifikation“ etabliert, die durch exakte Definitionen zytologischer und architektonischer Merkmale, sowie des Invasionsstatus die Diagnosediskrepanz verschiedener Untersucher minimieren soll (Schlemper et al. 2000, Ormsby et al. 2002).

Morphologisch imponieren bei der Dysplasie architektonische Anomalien wie unregelmäßig geformte Drüsen mit dichter Zell-Lagerung sowie intraluminale papilläre Epithelproliferationen und villöse Formationen an der Oberfläche.

Zu den zytologischen Veränderungen zählen Kerngrößenschwankungen, Kerndeformierungen, eine erhöhte Kernplasmarelation, Hyperchromasien und vermehrt abnorme Mitosen (Reid et al. 1988).

Auf molekularer Ebene ist die Dysplasie vor allem durch Mutationen gekennzeichnet.

Betroffen ist hiervon beispielsweise das P53 Gen, welches zu genetischer Instabilität führt. Desweiteren finden sich in der Dysplasie auch Veränderungen im APC-Gen (Adenomatous polyposis gen) und im p16-Gen ebenfalls wichtige Tumor-Suppressor-Gene. Es resultiert Aneuploidie. Proteasen, Fas und Wachstumsfaktoren wie Cyclin D1 und E spielen in der Entwicklung zur Malignität ebenfalls eine entscheidende Rolle (Morales et al. 2002). Zudem konnte eine gesteigerte Angiogenese mit erhöhter VEGF-Produktion nachgewiesen werden (Möbius et al. 2003).

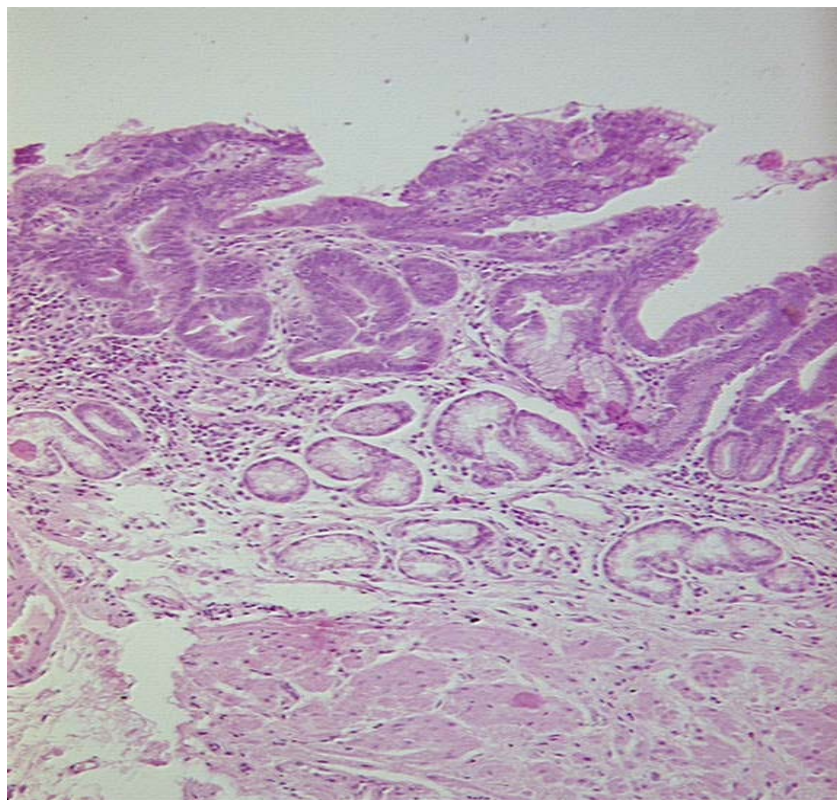


Abbildung 2: HE-Färbung Dysplasie

Adenokarzinom

Beim Adenokarzinom des Ösophagus unterscheidet man die Frühkarzinome und die lokal fortgeschrittenen Karzinome.

Das Frühkarzinom wird üblicherweise als Karzinom definiert, welches auf Mukosa und Submukosa beschränkt ist ohne Nachweis von Lymphknotenmetastasen.

Das fortgeschrittene Barrettkarzinom zeigt drei verschiedene Wachstums-Typen, wobei viele Kombinationen und Übergangsformen möglich sind. Diese Typen sind exophytisch-polypoid, ulzerös und diffus infiltrierend.

Das Adenokarzinom des Ösophagus hat die Tendenz, sich submukös auszubreiten und Satellitenläsionen in einiger Entfernung von der ursprünglichen Läsion zu setzen. Es kann multifokal auftreten und wird fast immer von dysplastischen Veränderungen umgeben (Streitz et al. 1991). Wegen des fehlenden Serosaüberzugs des Ösophagus kann das Karzinom sehr rasch benachbarte Strukturen infiltrieren.

Histologisch finden sich beim Barrettkarzinom neben dysplastischen Veränderungen strukturelle Deviationen der Drüsenarchitektur, Infiltration der Basalmembran, Auflösung des Zellverbandes und Invasion von Lymph- und Blutgefäßen (Geboes et al. 2000).

Auf molekulargenetischer Ebene werden sechs essentielle Veränderungen beschrieben, die entscheidend zur Karzinogenese beitragen sollen: Bereitstellung von Wachstumsfaktoren (Cyclin D1 und E, TGF α), Umgehung wachstumshemmender Signale (LOH und Mutation von p53, p16 und APC), Apoptoseinhibition (Überexpression von COX-2, LOH von p53 und 13-S-HODE), ungehemmte Replikationsfähigkeit (Stabilisation der Telomerenlänge durch Telomerasen), gesteigerte Angiogenese (VEGF Überexpression), Invasions- und Proliferationsfähigkeit (Veränderung des Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin) (Morales et al. 2002). Es zeigte sich eine Assoziation klinisch pathologischer Daten mit der Angiogenese (Möbius et al. 2004).

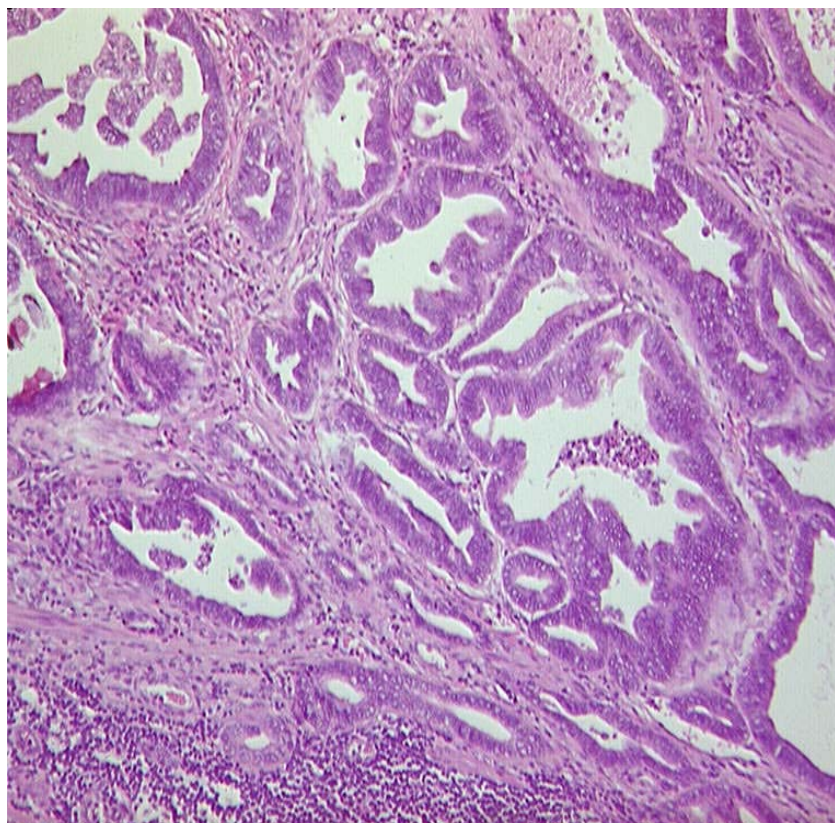


Abbildung 3: HE-Färbung Adenokarzinom

1.3 Klinisches Bild und Diagnostik

Klinisch manifestiert sich das Ösophaguskarzinom häufig durch Dysphagie (Prävalenz: 74%) und Gewichtsverlust (57,3%). Desweiteren treten Sodbrennen (20,5%), Odynophagie (16,6%) und Husten oder Heiserkeit (6 - 10%) auf (Daly et al. 2000).

Spezifische Frühsymptome des Adenokarzinoms des distalen Ösophagus existieren nicht. Die Dysphagie als häufigstes Symptom tritt meist erst auf, wenn der Tumor so weit fortgeschritten ist, dass er bereits zwei Drittel des Ösophaguslumens verlegt. Im klinischen Staging steht die Endoskopie mit Biopsie an erster Stelle. Sie dient nicht nur der histologischen Sicherung sondern auch der Klassifikation des Tumors. Als weitere diagnostische Maßnahmen kommen die Endosonographie und die Pharyngoösophagographie zum Einsatz (Siewert et al. 1997). Zum Ausschluß von Fernmetastasen werden Thoraxübersichtsaufnahme, Computertomographie und perkutane Sonographie verwendet. Auch die Positronenemissionstomographie erlangt derzeit in diesem Bereich eine immer größere Bedeutung.

Im Rahmen der endoskopischen Überwachung bei Patienten mit bekanntem Barrett-Ösophagus wird die intravitale Färbung zur Erkennung von makroskopisch nicht sichtbaren Frühkarzinomen durchgeführt (Stein et al. 1996).

1.4 Metastasierung

Die lymphogene Metastasierung des distalen Adenokarzinoms des Ösophagus betrifft entsprechend der embryologischen Herkunft bevorzugt die Lymphknoten im Bereich des Truncus coeliacus und des unteren hinteren Mediastinums. Weiterhin können paraösophageale und paracardiale Lymphknoten betroffen sein. Eine Tumorausbreitung ist nach oral oder aboral möglich. Hämatogene Fernmetastasen finden sich bei fortgeschrittenen Tumoren in der Lunge und in der Leber.

1.5 Klassifikation

Zur klinischen Klassifikation des Adenokarzinoms bezüglich der Wandinfiltration und der Lymphknotenbeteiligung wird das TNM-System der UICC nach der neuesten Fassung aus dem Jahr 2002 verwendet (Wittekind et al. 2002).

T - Primärtumor

- TX Primärtumor nicht beurteilbar
- T0 Kein Anhalt für Primärtumor
- Tis Carcinoma in Situ
- T1 Tumor infiltriert Lamina propria oder Submukosa
- T2 Tumor infiltriert Muskularis propria
- T3 Tumor infiltriert Adventitia
- T4 Tumor infiltriert benachbarte Strukturen

N - Regionäre Lymphknoten

- NX Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
- N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Regionäre Lymphknotenmetastasen

M - Fernmetastasen

- MX Fernmetastasen nicht beurteilbar
- M0 Keine Fernmetastasen
- M1a Fernmetastasen in zöliakalen Lymphknoten
- M1b Andere Fernmetastasen

Da die postoperativen Langzeitergebnisse davon beeinflusst werden, ob die Resektion zu einer vollständigen Tumorentfernung geführt hat, hat die UICC die sogenannte R-

Klassifikation etabliert. Diese komplettiert das postoperative Staging und stellt eine wesentliche Grundlage für weitere therapeutische Maßnahmen dar. Bei einer R_X-Resektion kann das Vorhandensein eines Residualtumors nicht beurteilt werden. R₀ besagt, dass kein Residualtumor belassen wurde. Bei einer R₁-Resektion besteht ein mikroskopischer Residualtumor. R₂ beinhaltet, dass bei der Resektion noch makroskopisch Tumorreste belassen wurden. Der R Status ist der wichtigste prognostische Faktor.

Desweiteren wird die Stadieneinteilung nach UICC/ AJCC herangezogen (Wittekind et al. 2002):

Stadium	Primärtumor	Regionäre Lymphknoten	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIa	T2/3	N0	M0
Ib	T1/2	N1	M0
III	T3/4	N1	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 1: UICC/ AJCC Stadieneinteilung des Adenokarzinoms des Ösophagus

1.6 Therapie

Beim diagnostisch gesicherten Adenokarzinom ist die primäre Resektion mit dem Ziel einer R₀-Situation die Therapie der Wahl, wenn das präoperative Staging den Tumor als kurativ resezierbar klassifiziert hat (T₁, T₂, vereinzelt auch T₃) und eine patientenspezifische Risikoabschätzung stattgefunden hat. Grundsätzlich wird zwischen der transmediastinalen Ösophagusresektion und der transthorakalen Ösophagusresektion unterschieden (Siewert 1996). Zum Ersatz der Speiseröhre wird überwiegend der an der A. gastroepiploica dextra gestielte Magen verwendet. Steht der Magen als Interponat nicht zur Verfügung, kann das Kolon zur Rekonstruktion der Speisepassage benutzt werden. Die perioperative Mortalität liegt in erfahrenen Zentren zwischen 2 und 7% (Siewert et al. 2001).

Zur Erhöhung der R0-Resektionsrate kommen bei lokal fortgeschrittenen Tumoren ohne Fernmetastasen oder Peritonealkarzinose multimodale Therapiekonzepte im Rahmen von Studien zum Tragen.

Als palliative Verfahren bei Tumoren mit ausgeprägter regionärer Metastasierung oder Fernmetastasen steht Bougieerungstherapie, Stenting, Gastrostomie oder Lasertherapie zur Behandlung der Dysphagie zur Verfügung. In Ausnahmefällen werden Bypass-Operationen angewendet.

1.7 Prognose

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des Barrettkarzinoms kann in 60-88% ein lokal fortgeschrittenes Tumorstadium nachgewiesen werden. Lymphknotenmetastasen zeigen sich in 54,5% der Fälle (Siewert et al. 2001, Monnier 1987, DeMeester 1990). Die 1-Jahres-Überlebensrate unbehandelter Patienten liegt zwischen 1,6 und 9,7% (Müller 1991). Nach Tumorresektion bei Patienten mit primärer Resektion, R0-Status und pN0-Kategorie beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 72,9% (Siewert et al. 2001).

Zu den unabhängigen Prognosefaktoren zählt der R-Status sowie das Tumorstadium im Sinne der TNM-Klassifikation. Weitere Prognosefaktoren beim Barrettkarzinom sind die Anzahl positiver Lymphknoten und die Lymphknotenratio (Siewert et al. 1997).

2. Cyclooxygenase-2

2.1 Die Prostaglandinbiosynthese

Prostaglandine sind chemische Abkömmlinge ungesättigter C₂₀-Carbonsäuren. Gemeinsames Merkmal ist das Grundgerüst mit 20 Kohlenstoff-Atomen, das auch als Prostansäure bezeichnet wird. Die Prostaglandine (PG) unterscheiden sich hauptsächlich durch verschiedenartige Substitution am C-9, C-11 und C-15 Atom und durch unterschiedliche Anordnung von Doppelbindungen.

Prostaglandine gehören zu den wichtigsten Entzündungs-Mediatoren im menschlichen Körper und haben immunmodulatorische Effekte. So hemmen sie beispielsweise die Th1-Zytokin-Produktion und die Proliferation von Lymphozyten. Sie sind an der vaskulären Homöostase beteiligt und haben neben vielen anderen Funktionen auch zytoprotektive Wirkung in der gastrointestinalen Mukosa.

PG werden nicht wie andere Mediatoren in der Zelle gespeichert, sondern bei Bedarf jeweils neu gebildet.

Die Prostaglandine entstehen aus membranbildenden Phospholipiden, die von Phospholipase A2 in Lysophosphatide und 2- bis 5-fach ungesättigte C20-Fettsäuren gespalten werden, z.B. Arachidonsäure. Die anschließende „Arachidonsäure-Kaskade“ beginnt mit der Cyclooxygenase, die die Säure unter Aufnahme von zwei Molekülen Sauerstoff zum Hydroperoxyepidioxid (PGG₂) umbaut. Die Peroxidase bildet daraus das Hydroxyepidioxid (PGH₂). PGG₂ und PGH₂ sind chemisch instabil, können aber auf enzymatischem Wege in verschiedene Produkte, wie zum Beispiel Prostacyclin (PGI) oder Thromboxan A₂ (TXA₂) umgewandelt werden (s. Abb. 4) .

Prostaglandine können in fast jedem Gewebe hergestellt werden, jedoch ist nicht jedes Gewebe in der Lage alle Prostaglandinarten zu synthetisieren. Lunge und Milz haben zum Beispiel die enzymatischen Vorraussetzungen, alle PG-Variationen zu bilden, während Thrombozyten vor allem die Thombosan-Synthase als vorherrschendes Enzym für den

Prostaglandin-Stoffwechsel bereitstellen. Endothelzellen enthalten wiederum hauptsächlich die Prostacyclin-Synthase (Bennett et al. 1976).

Die physiologische Regulation der Prostaglandinsynthese erfolgt hauptsächlich auf Ebene der hydrolytischen Spaltung der Arachidonsäure aus den Membran-Phospholipiden, da einige Substanzen die Aktivität der Phospholipase A₂ beeinflussen können. Pharmakologisch wird die Biosynthese der PG-Epidioxide durch Acetylsalicylsäure, Indomethacin und andere NSAR (nichtsteroidale Antirheumatika) gehemmt, während Cortison bereits die Freisetzung der Arachidonsäure verhindert (Hawkey et al. 1985).

Der Abbau der PG erfolgt zu 90-95% bei der ersten Passage durch die Lunge. Die durchschnittliche Halbwertszeit der Prostaglandine beläuft sich auf ca. 1 - 3 Minuten.

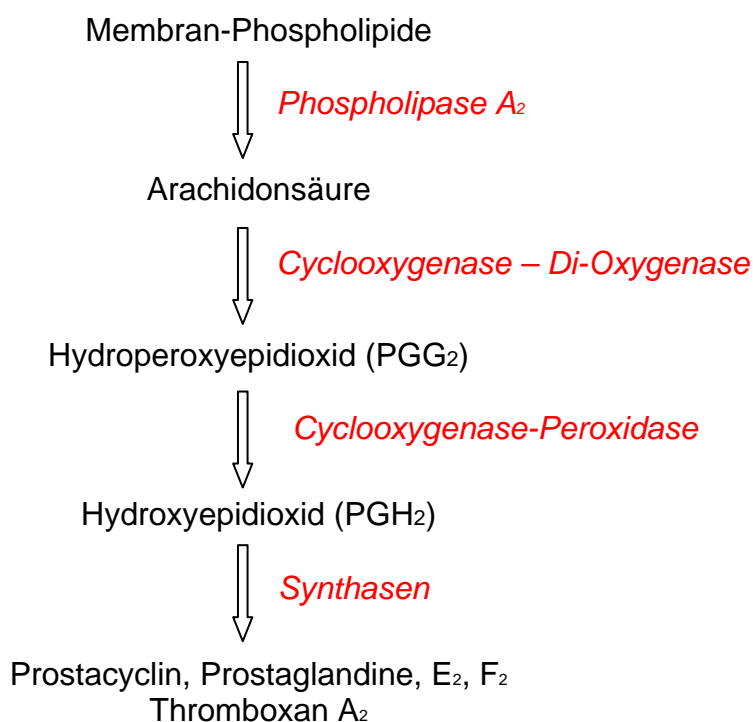


Abbildung 4: Prostaglandin-Biosynthese

2.2 Biochemie der Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase ist ein Schlüsselenzym im Prostaglandinstoffwechsel. Sie katalysiert die Bildung von Thromboxan, Prostacyclin und Prostaglandinen.

Dieser Prozess beinhaltet zwei Reaktionen: eine Di-oxygenase-Aktivität katalysiert den Schritt von der Arachidonsäure zu Prostaglandin G₂ (PGG₂) und eine Peroxidaseaktivität reduziert PGG₂ zu seinem 15-Hydroxy-Metaboliten Prostaglandin H₂ (PGH₂). Beide Isoenzyme lassen sich durch nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente (NSAIDs) hemmen.

Im menschlichen Körper sind zwei Isoenzyme vorhanden, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind: COX-1 erfüllt physiologische Funktionen und wird ubiquitär und kontinuierlich exprimiert. Das Enzym wurde zum ersten Mal 1976 von Miyamoto et al. beschrieben. Es besteht aus drei unabhängigen Untereinheiten: eine epidermale Wachstumsfaktor-Domäne, eine Membran-Bindungskomponente und eine enzymatische Domäne.

Die Aminosäuresequenz von COX-1 zwischen den Spezies ist sehr ähnlich (zu ca. 90% identisch). Die Gen-Sequenz von COX-1 beim Menschen beträgt circa 22 kb und enthält 11 Exons. Die zugehörige COX-1 mRNA ist 2,8 kb lang.

1991 wurden erstmals cDNAs von COX-2 isoliert und zunächst als ein Mitglied der early growth-response gene group identifiziert (Kujubu et al. 1991).

Die COX-2 mRNA ist auf Chromosom 1 lokalisiert und mit 4 kb etwas länger als die ihres Isoenzym. Obwohl die Exon-Intron-Organisation des humanen COX-2 Gens dem von COX-1 sehr ähnelt, beinhaltet das COX-2 Gen nur 10 Exons in 8 kb (Yokoyama et al. 1989, Kraemer et al. 1992).

COX-2 wird nur in Makrophagen, Fibroblasten und entzündlichem Gewebe exprimiert. Die Induktion erfolgt durch inflammatorische Botenstoffe wie Zytokine (Interleukin-1 β), Interferon-gamma, tumor necrosis factor (TNF- α) und Wachstumsfaktoren. Neuere Veröffentlichungen

haben gezeigt, dass auch Säure bzw. Gallensäure eine potente COX-2 Induktion fördern können (Shirvani et al. 2000).

Die Cyclooxygenase und damit auch die Prostaglandin Biosynthese lässt sich pharmakologisch durch NSAIDs hemmen. Das Salizylsäure-Derivat Aspirin inhibiert COX-1 und COX-2 irreversibel, indem es die Bindung von Arachidonsäure an das aktive Zentrum des Enzyms verhindert. Die Mehrheit der NSAIDs jedoch sind organische Säuren und fungieren als reversible kompetitive Inhibitoren der Cyclooxygenase. Durch die Unterscheidung der zwei Isoenzyme der Cyclooxygenase ergibt sich eine neue Einteilung der nicht-steroidalen Antiphlogistika. Die herkömmlichen Vertreter der NSAIDs hemmen beide COX-Isoenzyme, teilweise mit Präferenz für die COX-1, z.B. Indometacin und Piroxicam. Neuere Arzneistoffe wie Rofecoxib oder Celecoxib inhibieren die COX-2 spezifisch und sind nebenwirkungsärmer, da die auftretenden Nebenwirkungen überwiegend COX-1 vermittelt sind. Dazu gehören unter anderem gastrointestinale Komplikationen, Hemmung der Thrombozytenaggregation und Asthma bronchiale. Im wissenschaftlichen Bereich werden die COX-2-Inhibitoren bevorzugt eingesetzt, um bisher unklare Funktionen und Wirkungsweisen der Cyclooxygenase 2 genauer zu untersuchen.

2.3 Physiologische Bedeutung der COX-2

Die Cyclooxygenase 2 ist ein Membran-gebundenes Glycoprotein, das als geschwindigkeits-limitierendes Enzym in der Bildung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure fungiert. Die COX-2 Expression ist auf bestimmte Gewebe beschränkt, kann aber als Antwort auf verschiedene Stimuli wie zum Beispiel Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Onkogene induziert werden.

Durch die Cyclooxygenase-2 werden vor allem bei inflammatorischen Reaktionen vermehrt Prostaglandine bereit gestellt, die dann Schwellungen, Ödeme, Rötung etc. induzieren. Auch die Regulation des Blutdrucks und die Hämostase sind im vielseitigen Wirkspektrum

der Prostaglandine enthalten. Ausserdem wird COX-2 eine Rolle im reparativen Prozeß nach Schleimhautverletzung im Gastrointestinaltrakt zugeschrieben (Sakamoto 1998, Mitchell 1995).

2.4 Rolle in der Karzinogenese

Die Überexpression von Cyclooxygenase 2 in vitro zeigt verschiedene zelluläre Effekte, z.B. gesteigerte Proliferation, verminderte Apoptose (Tsujii et al. 1995), erhöhte Angiogenese (Jones et al. 1999), verminderte Expression von E-Cadherin (Jones et al. 1999) und ein gesteigertes invasives und Metastasen-förderndes Potential (Tsujii et al. 1997).

Zunächst wurde bei Untersuchungen am Kolonkarzinom eine hohe Konzentration an Prostaglandinen festgestellt (Bennett et al. 1975 und 1977). Anschließend konnte in retrospektiven epidemiologischen Studien herausgefunden werden, dass die Einnahme von NSAR die Inzidenz von Karzinomen verringert (Funkhouser et al. 1995, Taketo 1998, Farrow et al. 1998, Steinbach et al. 2000). Im weiteren Verlauf wurde versucht, die Bedeutung von COX-2 in kolorektaler Karzinogenese durch ein COX-2-Knock-out-Mausmodell und die Amplifikation eines spezifischen COX-2 Inhibitors genauer zu eruieren (Oshima et al. 1996): es konnte eine signifikante Verringerung der Adenom-Anzahl und der Adenom-Größe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

An diese Beobachtungen anknüpfend wurde die Cyclooxygenase 2 Expression auch in anderen Karzinom-Entitäten untersucht. COX-2 konnte im Magenkarzinom (Chen et al. 2001), im kolorektalen Karzinom (Eberhart et al. 1994, Sano et al. 1995), im Prostatakarzinom (Tanji et al. 2000) sowie im Bronchial- und Mammakarzinom (Soslow et al. 2000) nachgewiesen werden.

Es stand die Frage im Raum, über welche Mechanismen und Interaktionen COX-2 seinen Einfluß auf die Karzinogenese geltend macht.

Eine Hypothese für mögliche Wirkungsmechanismen von COX-2 assoziiert erhöhte Proteinexpression mit der Stimulation von zellulärer Proliferation und der Inhibition von Apoptose (Sheng et al. 1997, Sheng et al. 1998, Qiao et al. 1995). Im Rattenmodell von Tsujii et al. 1995 ging die Überexpression von COX-2 in intestinalen Zellen mit einem erhöhten Bcl-2 Level und einer Apoptose-Resistenz einher. Eine Studie mit Prostata-Karzinom-Zell-Linien zeigte nach Gabe von selektiven COX-2 Inhibitoren gesteigerte Apoptose und verminderte Bcl-2-Expression (Liu et al. 1998).

Einige Forschungsgruppen haben ausserdem einen deutlichen anti-angiogenetischen Effekt von COX-2-Inhibitoren bei gastrointestinalen Tumoren feststellen können (Sawaoka et al. 1999, Masferrer et al. 2000). Dies lässt vermuten, dass Cyclooxygenase 2 über Interaktion mit VEGF fördernd auf die Angiogenese wirken kann und durch diesen Mechanismus einen entscheidenden Beitrag zur Karzinogenese leistet (Masferrer et al. 2000).

Im Adenokarzinom des Ösophagus konnte ebenfalls eine Cyclooxygenase 2 Überexpression beobachtet werden (Zimmermann et al. 1999). Eine Studie von Buskens et al. zeigte darüberhinaus im Barrettkarzinom eine signifikante Korrelation von COX-2 Expression mit der Entwicklung von Fernmetastasen und lokoregionärem Rezidiv. Gesteigerte COX-2 Expression war mit signifikant schlechterem Überleben assoziiert und COX-2 konnte in der multivariaten Analyse als unabhängiger prognostischer Faktor beschrieben werden (Buskens et al. 2002).

Von besonderem Interesse ist die COX-2 Expression in der Sequenz von der Barrett-Metaplasie über die intraepitheliale Neoplasie bis hin zum Adenokarzinom. In diesem Zusammenhang konnten Morris et al. einen signifikanten Anstieg der COX-2 Expression in der Sequenz zwischen LGD und HGD feststellen. Untersucht wurden hierbei Biopsien von 56 Patienten (20 Metaplasien, 12 LGD, 12 HGD und 12 Adenokarzinome). Es konnte jedoch nicht die Veränderung der COX-2 Expression in der Karzinogenese des einzelnen Tumors eruiert werden (Morris et al. 2001).

3. Apoptose

3.1. Physiologische Bedeutung

1972 haben Kerr et al. in verschiedenen Gewebs- und Zell-Typen den morphologischen Vorgang des programmierten Zelltods erstmals beschrieben, der sich deutlich von dem pathologischen, nekrotischen Zelltod unterscheidet. Er ist gekennzeichnet durch folgende Merkmale: Zellschrumpfung, Protein- und Kern-Fragmentierung, Verlust der Zelladhäsion, und Kondensation des Chromatins, gefolgt von Phagozytose der gebildeten Apoptose Körperchen durch benachbarte Zellen. Kerr et al. postulierten, dass diese gemeinsamen morphologischen Veränderungen das Resultat eines endogenen Zelltod-Programms, der sogenannten Apoptose, sein könnten.

Heute, ca. 30 Jahre später weiß man, dass der programmierte Zelltod einer der wichtigsten Bestandteile ist, um die Homöostase in einem multizellulären Organismus aufrecht zu erhalten. Apoptose ist ein essentieller Mechanismus, um den Körper vor infizierten Zellen zu schützen und um aktivierte oder auto-aggressive Immunzellen zu beseitigen.

Apoptose wird als Antwort auf eine große Vielfalt von Stimuli induziert. Hierbei sind vor allem zwei entscheidende Induktionswege involviert. Der mitochondrienabhängige bzw. intrinsische Weg, der insbesondere durch die Bcl-2/ Bax Protein-Familie reguliert wird (Adams et al. 1998) und der extrinsische Weg, der durch extrazelluläre Liganden, die an entsprechende Membranrezeptoren binden, aktiviert wird (Thornburn 2003).

Beide Wege werden durch ein fein abgestimmtes Netzwerk von Aktivatoren und Inhibitoren gesteuert und münden schließlich in der Aktivierung der Kaspasen, einer Protease-Familie, die den Zelltod irreversibel induzieren.

Über 12 verschiedene Kaspasen konnten beim Menschen bisher identifiziert werden, zwei Drittel davon sollen bei der Apoptose beteiligt sein. Da die Kaspasen einen Großteil der sichtbaren Veränderungen im Rahmen des programmierten Zelltods herbeiführen, werden sie als „Vollstrecker“ („executioners“) bezeichnet.

Im Rahmen der Karzinogenese kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose. Auf dem Boden molekularer Veränderungen überwinden die karzinogenen Zellen den Mechanismus der Apoptose. Hierdurch kommt es zu einer infiltrativen Gewebsvermehrung.

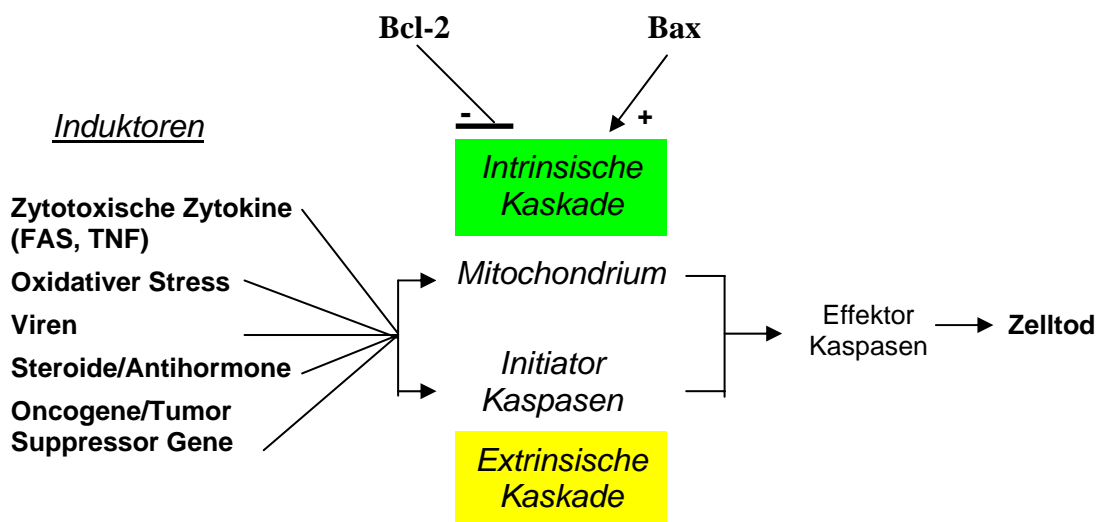


Abb 5: Schemazeichnung der Apoptose

3.2 Intrinsische Kaskade

Der mitochondriale Aktivierungsweg der Apoptose wird als intrinsische Kaskade bezeichnet, da er durch endogene Mediatoren initiiert wird (Green et al. 1998, Kroemer et al. 2000). Diese proapoptotischen Proteine werden aus den Mitochondrien ins Zytoplasma abgegeben, um dort die Proteasen der Caspase-Familie zu aktivieren.

Eine bedeutende Rolle in der intrinsischen Kaskade kommt der Familie der Bcl-2 Proteine zu (Adams et al. 1998). Hierzu zählen die beiden funktionell antagonistischen Protein-Subtypen Bcl-2 und Bax.

„B-Cell-Lymphoma 2“ (Bcl-2) ist ein Protein der inneren Mitochondrienmembran und wurde 1988 erstmals durch Ngan et al. in Lymphomzellen beschrieben. Es ist auf Chromosom 18

lokalisiert und hat ein Molekulargewicht von 25.000 (Hockenbery et al. 1990). Es wird angenommen, dass Bcl-2 durch Hemmung des Proteins Apaf-1 den Apoptose Mechanismus inhibiert. Apaf-1 initiiert die Aktivierung von Kaspase 9, die irreversibel den gerichteten Zelltod einleitet (Adams et al. 1998).

„Bcl-2-associated-X-Protein“ (Bax) ist ein proapoptotisches Protein, das eine strukturelle Homologie zu Bcl-2 aufweist, funktionell jedoch antagonistisch wirkt. Bax besitzt eine p53 Bindungsdomäne und soll direkt in die Signalwege von p53 involviert sein (Miyashita et al. 1995). Bcl-2 und Bax geben unter anderem pro- und antiapoptotische Signale durch Veränderung der Permeabilität der Mitochondrienmembran für Zytochrom C weiter (Shimizu et al. 1999).

Bei pathologischen Prozessen wie der Karzinogenese kann ein Ungleichgewicht der beiden Proteine zugunsten von Bcl-2 entstehen, woraus eine Resistenz gegenüber den physiologischen Apoptose-Signalen folgen kann. Ein prägnantes Beispiel hierfür findet sich beim B-Zell Lymphom. Durch die 14;18 Translokation in den Tumorzellen resultiert eine Überexpression von Bcl-2, was zur Folge hat, dass Zellen mit geschädigter DNA oder Abberationen des Zell Zyklus nicht mehr im Rahmen des gerichteten Zelltodes eliminiert werden, sondern zu einem neoplastischen Klon werden können (Vaux et al. 1988, McDonnell et al. 1989, Tsujimoto et al. 1985) .

3.3 Extrinsische Kaskade

Die Zellen des menschlichen Körpers exprimieren spezifische Rezeptoren auf ihrer Membranoberfläche, die durch eine Vielfalt von Liganden Apoptose aktivieren können. Hierbei unterscheidet man Rezeptoren, die direkt Caspasen stimulieren und Rezeptoren, die über zwischengeschaltete Signalmoleküle mit dem Caspase-System interagieren (Ashkenazi et al. 1998). Diese „Todes-Rezeptoren“ gehören der TNF - Familie an und wirken unabhängig von dem mitochondrialen Aktivierungs-Weg. Sie sind mit einer spezifischen

Domäne ausgestattet, die in das Zytoplasma der Zelle reicht und externe Apoptose Signale an intrazelluläre Mediatoren vermittelt.

Diese intrazellulären Adapter-Proteine wiederum aktivieren in bestimmten Konstellationen die Proteasen der Caspase Familie und führen damit zum Tod der Zelle.

Die TNF- Rezeptoren spielen eine fundamentale protektive Rolle im Immunsystem bei der Erkennung von Karzinomzellen durch zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen. Karzinomzellen können die Fähigkeit besitzen, durch Blockierung der Signaltransduktion dieser Rezeptoren, den Apoptose Mechanismus und damit die Immunabwehr zu umgehen.

4. Proliferation

4.1 Physiologische Bedeutung

In einem multizellulären Organismus muss im Sinne der Homöostase die Zellzahl durch Proliferation und Zelltod streng reguliert werden. Die Zellproliferation wird durch ein streng kontrolliertes Gleichgewicht von mitogenen und wachstumshemmenden Signalen gesteuert. Veränderungen dieses Gleichgewichts können unter anderem zur Gewebsentartung und damit zu Malignität führen.

Der Zell Zyklus wird durch ein komplexes Netzwerk an Mediatoren und Enzymen wie zum Beispiel Cycline und Cyclin abhängige Kinasen (Cyclin dependent kinases = Cdks) reguliert. Diese wiederum gehen zahlreiche Interaktionen ein, bei denen Aktivierung, Inhibition und Rückkopplungsmechanismen eine entscheidende Rolle spielen (Mohan 2004, Alberts et al. 1986).

4.2. Bedeutung von Ki-67

Bei Ki-67 handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen ein nukleäres Protein, das in proliferierenden Zellen vorkommt. Das Ki-67 Antigen wird im menschlichen Genom auf Chromosom 10 (Gen Lokus: 10q25-qter) durch 30.000 Basenpaare codiert und besteht aus 15 Exons (Duchrowet al.1996, Gerdeset al.1991). Das Ki-67 Antigen ist in das regulatorische Netzwerk, welches den Zellzyklus steuert, involviert. Die Expression dieses Proteins findet insbesondere während der späten G1, S, G2 und M Phase im Nucleolus der Zelle statt und kann in der G0 Phase nicht nachgewiesen werden (Endl et al. 2000).

Es ist in der koordinativen Organisation der strukturellen und funktionellen Veränderungen im Rahmen der Mitose beteiligt und wird neben p21, p27 und p53 in der ökologischen Diagnostik und Wissenschaft als Marker für die Zell Zyklus Regulation verwendet (Abdelsayed et al. 2000, Gerdes et al. 1984, Brown et al. 1990, Scholzen et al. 2000). Hierbei dient es im besonderen Maße Untersuchungen über die Tumorbilogie, Tumorprogression und der Korrelation mit dem Ansprechen von Karzinomen auf Strahlen- und Chemotherapie (Siemann 1998).

Bei Mib-1 handelt es sich um einen spezifischen Klon des Ki-67 Antikörpers, der am Insitut für Pathologie der Technischen Universität München in der Routinediagnostik und Verlaufskontrolle verwendet wird.

5. Zielsetzung

In unserer Arbeit haben wir zunächst die verschiedenen Stadien der Karzinogenese des Barrettkarzinoms auf eine mögliche Überexpression von Cyclooxygenase 2 mit Hilfe der Immunhistochemie untersucht. Anschließend wurde in diesem Gewebe unter Verwendung des Ki-67 Antikörpers eine Proliferationsmessung durchgeführt, um eine mögliche Korrelation von COX-2 Expression und Proliferation zu eruieren. Die histologischen Präparate haben wir zudem auf die quantitative Expression des Apoptoseinhibitors Bcl-2 immunhistochemisch untersucht, um die Ergebnisse mit der COX-2 Expression zu korrelieren und einen möglichen Zusammenhang zwischen COX-2 und Apoptose/Proliferation in der Sequenz des Barrettkarzinoms aufzuzeigen.

Die immunhistochemischen Ergebnisse des Karzinomgewebes wurden anschließend mit klinischen Parametern des Patientenguts korreliert, um mögliche Zusammenhänge von COX-2-, Bcl-2- und Ki-67- Expression mit dem Überleben und dem Lymphknotenstatus der Patienten zu verifizieren.

B MATERIAL UND METHODEN

1. Patientenkollektiv

Zwischen Juli 1982 und Dezember 2000 wurden in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München 1635 Patienten mit einem primären Ösophaguskarzinom behandelt. Dabei handelte es sich bei 539 von 1635 Fällen um ein Adenokarzinom des distalen Ösophagus und bei 1013 Fällen um ein Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Die restlichen malignen Tumoren waren undifferenzierte Karzinome, neuroendokrine Karzinome, Sarkome und andere seltene Entitäten.

Von den 1552 Patienten mit einem primären Ösophaguskarzinom wurden 1059 Patienten mit kurativer Zielsetzung reseziert (407 Patienten mit Adenokarzinom und 652 Patienten mit Plattenepithelkarzinom). Unsere Studie umfasst nur Patienten mit einem Adenokarzinom.

Nachdem der Tumor histologisch gesichert war, wurde bei allen Patienten unter Anwendung der Standard-Bildgebung eine Fernmetastasierung ausgeschlossen und die Resezierbarkeit des Primärtumors beurteilt. In der Initialphase wurden zum Staging Kontrast-Röntgenaufnahmen, CT von Hals, Brust und Abdomen und perkutaner Ultraschall durchgeführt. Seit 1987 wurde zur Verifizierung der T-Kategorie routinemäßig bei allen Patienten ein endoskopischer Ultraschall gemacht. In Abhängigkeit von den Tumorstadien wurden die Patienten neoadjuvant vorbehandelt oder primär reseziert.

Unser Patientenkollektiv schließt nur Patienten mit ein, bei denen eine R0-Resektion (gemäß der International Union against Cancer (UICC)/ American Joint Committee on Cancer (AJCC)) durchgeführt wurde und die keine neoadjuvante Behandlung erhalten haben. Die histologischen Präparate wurden gemäß internationalen Richtlinien von zwei unabhängigen Pathologen begutachtet. In diesem Resektionsgut (n=48) fanden sich 32 Barrett Metaplasien, 31 High-grade-Dysplasien, 26 Frühkarzinome und 22 fortgeschrittene Karzinome. Da nicht in allen Karzinompräparaten Metaplasie und Dysplasie vorhanden waren, findet sich in diesen Stadien eine Fallzahl unter 48. In der Mehrzahl der Gewebe

konnte im Randbereich des Karzinoms dysplastisches Gewebe und im Bereich der umliegenden Mukosa eine Barrett Metaplasie diagnostiziert werden.

Im Rahmen unserer Studie haben wir folgende histologische Kollektive gebildet:

Die Gruppe der Metaplasie, die Gruppe der intraepithelialen Neoplasie, die der Frühkarzinome (dieses umfasste das Tumorstadium T1N0) und das Kollektiv der lokal fortgeschrittenen Karzinome (dieses umfasste das Tumorstadium T2-3 Nx).

2. Allgemeiner Versuchsablauf

2.1 Probengewinnung und Herstellung der Präparate

Das Untersuchungsmaterial wurde dem Operationsresektat entnommen und anschließend folgenden Bearbeitungsschritten unterzogen. Schritt 1-3 erfolgte hierbei in der routinemäßigen Präparataufarbeitung des Instituts für Pathologie am Klinikums rechts der Isar.

1. **Zuschnitt** des Resektats mit entsprechender Markierung mit Tusche und Buonin'scher Lösung. Einlegen in Einbettkapseln.
2. Über Nacht **Fixation** und **Vorparaffinierung** (2 Std. Formalin, ca. 5,5 Std. aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol, 2 Std. Xylol, 2 Std. Paraffinbad) im Fixierungsapparat („Pathcentre“ Fa.: SHANDON).
3. **Einbetten der Präparate** in flüssiges Paraffin (ca. 60°C), Abkühlen der Paraffinblöcke („TBS 88 Paraffin Embedding System“ Fa.: MEDITE Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland).
4. **Anfertigung der Gewebsschnitte** (4 µm) am Rotationsmikrotom („Mikrom HM 335 E“ Fa.: MIKROM GmbH, Walldorf, Deutschland) und Streckung der Schnitte im Wasserbad („Paraffin Streckbad, TFB 35“, Fa.: MEDITE Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland).
5. **Aufziehen der Schnitte** auf Sialin-beschichtete, mit PRITT®-Kleber Mischung (1 Teil PRITT®-Bastel-Kleber, Fa.: HENKEL, Düsseldorf, Deutschland und 2 Teile Poly-L-

Lysine-Lösung, Fa.: SIGMA DIAGNOSTICS INC., St. Louis) bestrichene Objektträger („SuperFrost“ PLUS, Fa.: MENZEL-GLÄSER, Deutschland).

6. **Inkubation** im Brutschrank über Nacht bei ca. 60°C und anschließende **Entparaffinierung** der Schnitte ausgehend vom Xylol in der absteigenden Alkoholreihe.

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Allgemeines zur Methodik

Bei den indirekten Nachweisverfahren in der Immunhistochemie werden die Schnitte zunächst mit einem spezifischen, unkonjugierten Primärantikörper gegen das spezifische Antigen benetzt. Es entsteht eine feste Antigen-Antikörper Bindung. Nach Abspülen der Schnitte wird eine zweite Lösung aufgetragen, die den markierten Sekundärantikörper enthält. Dieser ist spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet und mit einem Detektionsenzym konjugiert. Anschließend wird ein Substrat zugeführt, um das Antigen zu lokalisieren (Bourne 1983; siehe Abbildung 6).

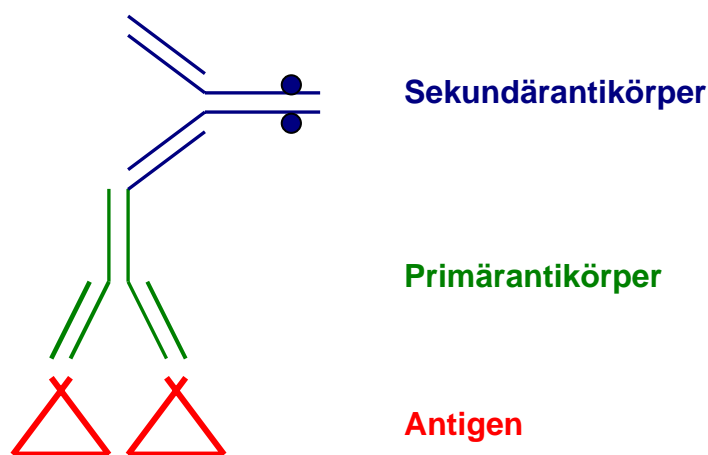


Abbildung 6: Schema der indirekten immunhistochemischen Methode mit Darstellung des Primär- und Sekundärantikörpers (modifiziert nach NOLL und SCHAUB-KUHNNEN, 2000)

2.2.2 Prinzip der Labeled (Strept-) Avidin-Biotin Methode (LAB/LSAB)

Das Prinzip der Labeled (Strept-) Avidin- Biotin Methode basiert auf der Affinität von Avidin zu Biotin. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin. Um unspezifische Reaktionen bei der Verwendung von Avidin zu verringern, wird es heute auf gentechnischem Weg hergestellt. Dieses „Streptavidin“ wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert.

Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin H, welches sich gut an den Sekundärantikörper (= biotinylierter Brückenantikörper) koppeln läßt und somit die Verbindung zum Antikörper-Antigen-Komplex herstellt (siehe Abbildung 7).

Im dritten Schritt wird nun das mit einem Enzym (alkalische Phosphatase (AP) oder Peroxidase (HRP)) gebundenen Avidin aufgetragen, dessen vier Bindungsstellen für das am Sekundärantikörper vorhandene Biotin frei sind. Anschließend reagiert das Enzym bei Zugabe eines Substrats und es entsteht ein farbiges Endprodukt.

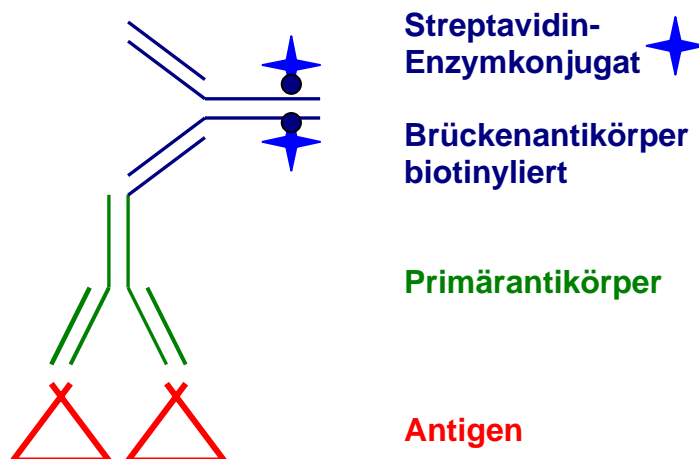


Abbildung 7: Schema der LSAB- Methode mit Darstellung von Primärantikörper, biotinyliertem Sekundärantikörper und Streptavidin-Enzym-Komplex (modifiziert nach NOLL und SCHAUB-KUHNEN, 2000)

2.2.3 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Zunächst werden die ausgewählten Antikörper an einem speziellen Gewebe etabliert, das heißt zuerst wird die vom Hersteller im Datenblatt empfohlene Konzentration (Verdünnung) des Antikörpers mit allen zur Verfügung stehenden Demaskierungsmethoden (z.B. ohne Demaskierung, enzymatisch, Mikrowelle, usw.) und Detektionssystemen (z.B. AP, DAB, verschiedene Substrate, usw.) getestet. Das Ergebnis wird mikroskopisch ausgewertet und das beste Ergebnis wählt man als Grundlage für weitere Testfärbungen aus. Die richtige Verdünnung des Primärantikörpers ist erreicht, wenn der Antikörper die spezifische Markierung ohne Hintergrundfärbung zeigt.

Zur Etablierung des Antikörper gegen COX-2 werden Schnitte von einer Colitis ulcerosa verwendet, da dieses inflammatorische Gewebe in hohem Maße Cyclooxygenase 2 exprimiert (Singer et al. 1998). Für den Bcl-2 Antikörper wurde Lymphknotengewebe zur Austestung gewählt. Der MIB-1 Antikörper zur Proliferations-Markierung wurde an Plazentagewebe etabliert.

Kontrollen

Zur Gewährleistung der Qualitätskontrolle haben wir bei jedem Antigennachweis für jede Farbe-Serie sowohl eine Positivkontrolle als auch eine Negativkontrolle verwendet.

Als Kontrollgewebe kommt bei der COX-2 Färbung ein Colitis-ulcerosa-Präparat als Positivkontrolle zum Einsatz. Als Negativkontrolle eignete sich physiologische Magen-Mukosa, da sie keine COX-2 Aktivität zeigt, und somit das entsprechende Antigen nicht nachweisbar ist.

Als MIB-1 Kontrollgewebe hat sich Placentagewebe in der Immunhistochemischen Routine bewährt, da es sich hierbei um ein hochproliferatives Gewebe handelt. Bei der Bcl-2 Färbung haben wir Lymphknotengewebe als Positivkontrolle zur Qualitätssicherung gewählt.

Arbeitsprotokoll der LAB/LSAB Methode

Im Anschluß an die Etablierung des Antikörpers wurde folgendes Arbeitsprotokoll verwendet:

1. Hitzeinduzierte Antigendemaskierung: die Schnitte werden in Citratpuffer (10 mmol, pH 6,0) im handelsüblichen Dampfdruckkochtopf 4 min. gekocht
2. Blockierung der endogenen Peroxidase mit 1,5% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) für 15 min., um unspezifische Hintergrundreaktionen zu reduzieren.
3. Einlegen der Objektträger in eine feuchte Kammer
4. Herstellung der empirisch getesteten Primärantikörperverdünnung (AK in AK-Verdünnungslösung, Fa.: *DAKO ChemMate™*, Dänemark) und Auftragen der Lösung auf Objektträger.

Inkubationszeit bei geschlossener Kammer und Raumtemperatur: 60 min.

5. 3 x Spülen mit TRIS-Puffer
6. Auftragen des Sekundär-Antikörpers („*DAKO-LSAB-KITT*“, Fa.: *DAKO*, Dänemark)
Inkubationszeit: 25 min.
7. 3 x Spülen mit TRIS-Puffer
8. Auftragen des Streptavidin - Enzymkonjugates (entweder DAB oder AP), („*DAKO-LSAB-KITT*, Fa.: *DAKO*, Dänemark). Inkubationszeit 25 min.
9. 3 x Spülen mit TRIS-Puffer
10. Auftragen des Enzym-Substrat-/ Chromogengemisches (*DAKO-LSAB-KITT*, Fa.: *DAKO*, Dänemark). Inkubationszeit: 5 min.
11. 3 x Spülen mit TRIS-Puffer
12. Färben mit Hämalan zur Kerngegenfärbung, ca. 3 sec.; anschließend unter warmem Leitungswasser 20 sec. spülen
13. Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe bis zum Xylol
14. Eindecken der Präparate im Eindeckautomaten („*Promounter®*“ RCM 2000 Coverslipping machine, Fa.: *MEDITE*, 31303 Burgdorf, Deutschland)
15. Trocknen der Schnitte im Brutschrank für ca. 15 min.

LSAB-Doppelmarkierung

Unter Doppelmarkierung versteht man die Darstellung zwei verschiedener Antigene auf demselben Schnittpräparat. Um die beiden Antigene differenzieren zu können, haben wir zwei Farben mit einem deutlichen Farbkontrast, rot und braun, gewählt. Die Doppelmarkierung von MIB-1 und Bcl-2 ist möglich und sinnvoll, da die beiden Antigene eine unterschiedliche Lokalisation in der Zelle haben und somit keine Vereinigung der Farben entsteht. Ki-67 ist nukleär und Bcl-2 zytoplasmatisch lokalisiert. Um die beiden Antikörper zu differenzieren, wählt man Detektionssysteme mit zwei unterschiedlichen Enzymen (Peroxidase und Alkalische Phosphatase), welche nicht miteinander kreuzreagieren.

Wir haben die Primärantikörper getrennt voneinander am ausgewählten Schnittpräparat getestet, um ein optimales Färbeergebnis zu erhalten.

Das Arbeitsprotokoll entspricht zunächst dem der Einfachmarkierung. Nach der hitzeinduzierten Antigendemaskierung wird die endogene Peroxidase mit H_2O_2 geblockt und anschließend die Inkubation mit dem Primärantikörper entsprechend des o.g. Protokolls durchgeführt.

Zu beachten ist, dass wir bei unseren Untersuchungen die beiden Primärantikörper nicht simultan, sondern nacheinander in zwei verschiedenen Arbeitsgängen inkubiert haben. Hierbei wird das Protokoll zunächst vor der Gegenfärbung mit Hämalaun (Schritt 12) abgebrochen und die Färbung mit der Auftragung des zweiten Primärantikörpers fortgesetzt.

Die nachfolgende Tabelle verschafft einen Überblick über die verwendeten Primärantikörper, die Verdünnung und das Detektionssystem.

Primärantikörper	Firma	Verdünnung	Detektionssystem
COX-2 Human Monoclonal	IBL Japan	1:200	LSAB-DAB
Ki-67 (MIB-1-clone) Mouse, anti-human Monoclonal	DAKO, Dänemark	1:200	LSAB-AP Als Doppelfärbung
Bcl-2 Mouse, anti-human Monoclonal	DAKO, Dänemark	1:100	LSAB-DAB Als Doppelfärbung

Tabelle 2 : Liste der verwendeten Primärantikörper

3. Auswertung

3.1 semiquantitative Analyse der COX-2 Färbung

Die Auswertung der immunhistochemischen COX-2 Färbereaktion erfolgte semiquantitativ bei 400-facher Vergrößerung durch PD Dr. med I. Becker und Dr. med. C. Möbius. Die gefärbten Tumorpräparate wurden unter dem Lichtmikroskop (Leitz Orthoplasn, Leican, Bensheim, Deutschland) begutachtet und pro Präparat bzw. Gewebetypus wurden vier repräsentative Blickfelder ausgewählt.

In unseren Untersuchungen im Karzinom waren die Farbtintensität und der Anteil angefärbter Zellen an der Gesamtumorzellzahl Beurteilungskriterien für die Korrelation der COX-2 Expression mit Ki-67, Bcl 2 und den klinischen Daten.

Die Intensität der Färbung wurde mit 0, 1 (+), 2 (++) oder 3 (+++) bewertet und der prozentuale Anteil der angefärbten Zellen mit 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (51-75%) oder 4 (>75%) beurteilt (Morris et al. 2001). Wir haben die beiden Werte anschließend miteinander multipliziert, um einen semiquantitativen Score (min. 0 / max. 12) für das jeweilige Gewebe zu erhalten. Wies ein Gewebe eine heterogene Färbeintensität auf, so war der vorherrschende Intensitätsgrad für die Bewertung maßgebend.

Anschließend haben wir für die statistische Analyse die COX-2 Score-Ergebnisse 0 bis 6 in die Kategorie „geringe COX-2 Expression“ eingestuft und die Score-Werte 7 bis 12 zur Gruppe der „hohen COX-2 Expression“ zusammengefasst.

Für die Auswertung der Korrelation von COX-2 und lokoregionärer Lymphknotenmetastasierung wurden die Karzinompatienten aufgrund ihres Lymphknotenstatus in zwei Kollektive eingeteilt. Die Gruppe mit positiver Lymphknotenbeteiligung umfaßt alle Patienten, die in der TNM Klassifikation mit pN = 1 gemäß der UICC-Klassifikation eingestuft wurden. Das Kollektiv mit negativer Lymphknotenbeteiligung umfaßt die Stagingkategorie pN0.

Beurteilungskriterium für die Auswertung der Immunhistochemischen COX-2 Färbung in der Sequenz war ausschließlich die Intensität der Färbung, da zur Beurteilung der Fläche weder in der Metaplasie noch in der Dysplasie hinreichend Gewebe vorhanden war. Dabei wurde der folgende Score verwendet: 0 (keine Färbung), 1+ (schwache zytoplasmatische Färbung), 2+ (moderate Färbung) und 3+ (starke Färbung) (Buskens et al. 2002).

3.2 Quantitative Analyse der Doppelfärbung

Das mit Ki-67- und Bcl-2- Antikörpern immunohistochemisch gefärbte Schnittpräparat wurde unter dem Mikroskop (Leitz Orthoplan, Firma Leica, Bensheim, Deutschland) begutachtet. Die Auswertung erfolgte unter dem 25x Objektiv mit numerischer Apertur 0.55 und mit dem daran angeschlossenen digitalen Bildanalysestystem SAMBA (Systeme d'Analyses Microscopiques a Balayage Automatique, Fa. UNILOG, Meylan, France).

Dabei wurde das Programm XTCOUNT (Gais/GSF) benützt, das eine interaktive Auswertung der histochemisch angefärbten Tumorbereiche bezüglich der Anzahl der Normal- und Tumorzellen ermöglichte. Die Messfelder wurden dabei über das Mikroskop auf eine 3-Chip CCD Farbkamera (KY-F30, Fa. JVC Tokyo, Japan) abgebildet und in das Bildanalysestystem übernommen (Wied et al. 1994).

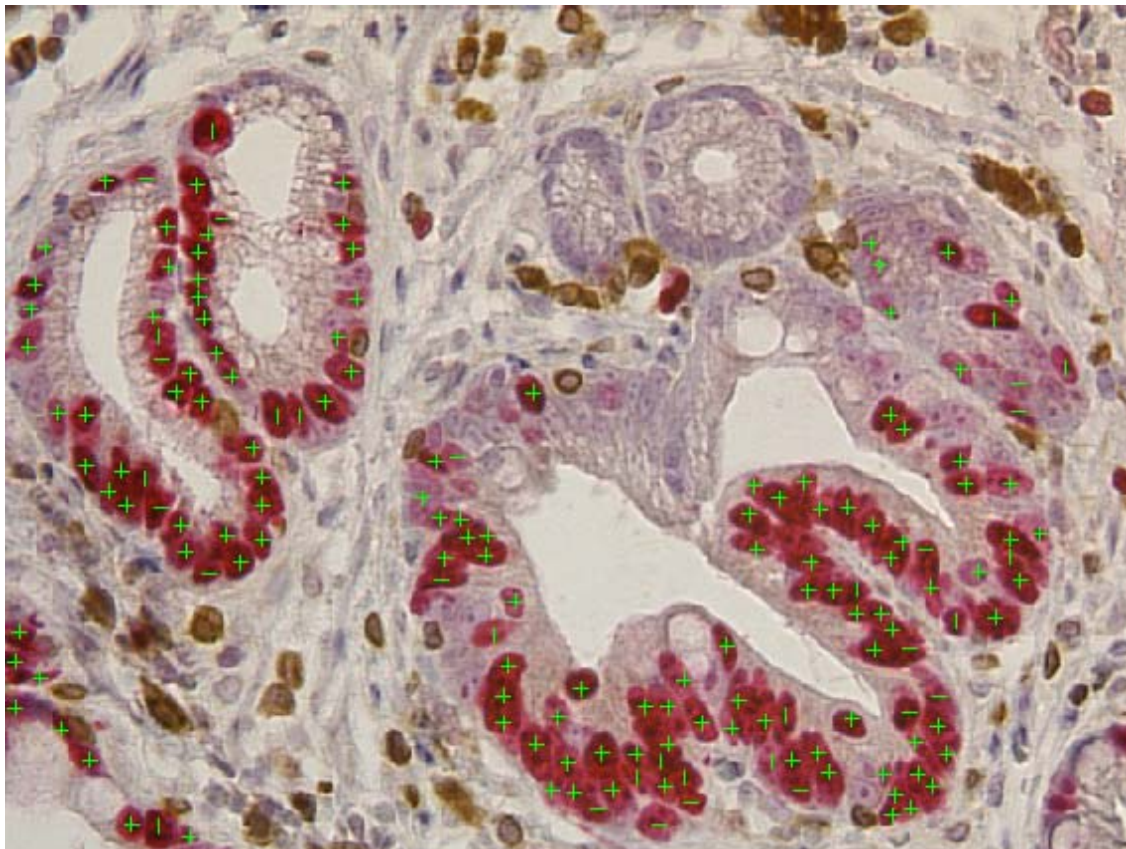


Abb.: Auswertung eines Schnittpräparats mit dem Analysesystem SAMBA/ XTCOUNT

4. Statistik

Die statistische Auswertung und Analyse der gewonnenen Daten sowie die Boxplot Grafiken wurden mit dem Softwareprogramm SPSS (Version 11.5.1 2002, SPSS Inc., Chicago, USA) umgesetzt. Die Korrelation zwischen den molekularbiologischen Markern und den klinischen Daten wurde mit Hilfe des t-Tests ausgewertet. Da es sich um nicht normalverteilte Werte handelt, haben wir bei der Analyse der COX-2, Bcl-2 und Ki-67 Expression der Median mit seiner entsprechenden range verwendet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt.

Die univariaten Analysen für die Gesamtüberlebenszeit haben wir nach der Kaplan Meier Methode durchgeführt (Kaplan et al. 1958). Das Signifikanzniveau im Vergleich der beiden Kollektive wurde mittels des log rank Tests ermittelt.

C ERGEBNISSE

1. Lokalisation der immunhistochemischen Färbung

Cyclooxygenase 2 zeigte in allen Geweben eine zytoplasmatische Anfärbung. In der Barrett Metaplasie imponierte COX-2 überwiegend im Bereich der basalen Zellschichten der Krypten, die superfizialen Epithelzellen zeigten eine schwache Färbung. In der Dysplasie war COX-2 in den basalen Drüsenzellen und in den dysplastischen Epithelien lokalisiert (s. Abbildung 8). Im Tumorgewebe fand sich eine ausgeprägte COX-2 Expression in den Karzinomzellen. Zusätzlich konnten wir in allen Geweben eine schwache Anfärbung von Stromazellen beobachten.

Die Ki-67 Expression war nukleär lokalisiert. Sie zeigte sich in der Barrett Mukosa im unteren Zellkompartiment der Krypten. In dysplastischem Gewebe konnten wir zudem eine Anfärbung der oberflächlichen Epithelzellen erkennen. Im Karzinomgewebe färbten sich die proliferative Fraktion der Tumorzellen an, die in dem Randbereich des Karzinoms angesiedelt waren (s. Abbildungen 9 und 10).

Bcl-2 bot eine moderate Farbreaktion in Karzinomzellen, die teilweise in lokalisierten Aggregaten organisiert waren. In der Barrett Metaplasie und Dysplasie zeigte sich eine schwache Anfärbung der basalen Epithelzellen. In allen Geweben imponierte eine deutliche Bcl-2 Färbung der Lymphozyten in der Lamina propria und der Mantelzone der Lymphfollikel.

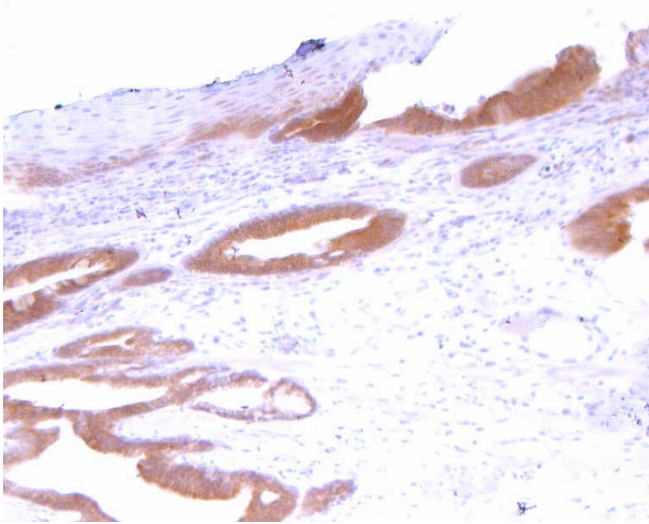


Abb. 9: COX-2 Expression in der Dysplasie

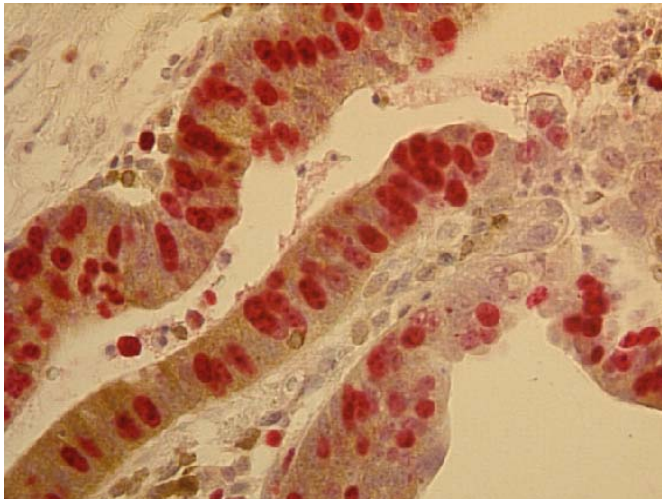


Abb. 10: Ki-67 und Bcl-2 Expression in der Dysplasie

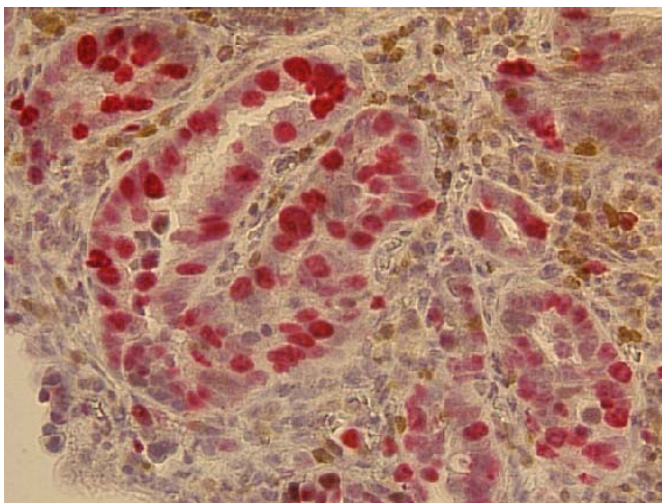


Abb. 11: Ki-67 und Bcl-2 Expression im Frühkarzinom

2. Expression von COX-2, Ki-67 und Bcl-2 in der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom Sequenz des Barrett-Karzinoms

2.1 COX-2 Ergebnisse

In der Barrett Metaplasie (n=32) fand sich eine mediane COX-2 Expression von 1 (range 1-3). Im Vergleich hierzu zeigte sich in der Dysplasie (HGD, n=31) eine mediane Expression von 2 (range 1-3), die sich signifikant von der Expression in der Barrett Mukosa unterschied ($p < 0,001$). Zwischen Dysplasie und Early Cancer (ECA, n=26) fand sich keine signifikante Expressionssteigerung ($p=0,617$), erst das fortgeschrittene Karzinom (n=22) zeigte wieder einen signifikanten Unterschied in der Cyclooxygenase 2 Expression bei einem Median von 3 (range 2-4; $p < 0,001$).

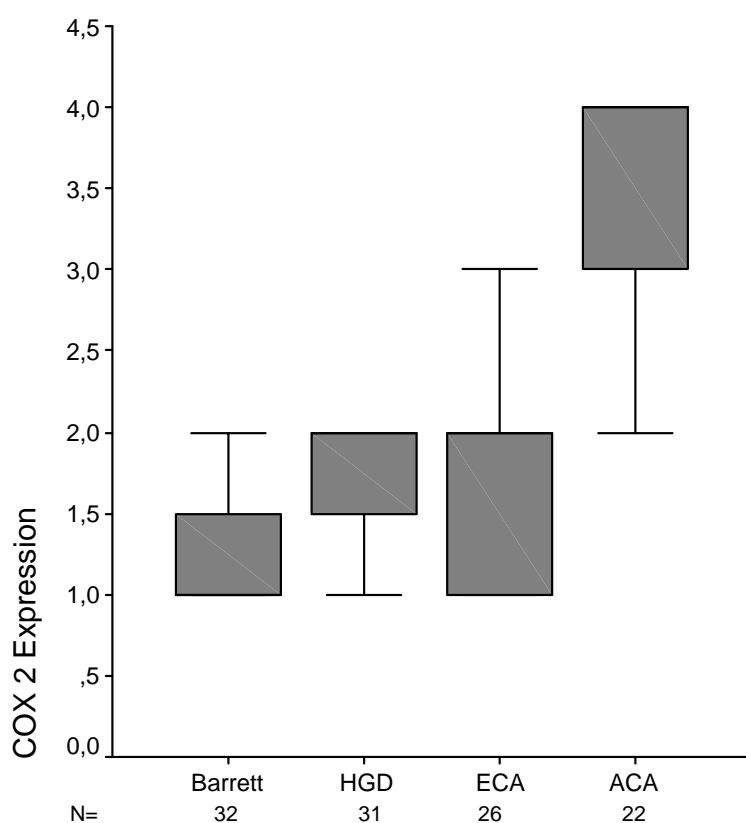


Abb. 12: COX-2 Expression in der Sequenz

2.2 Ki-67 Ergebnisse

Unsere Untersuchungen zeigten eine mediane Ki-67 Expression von 18,9% in der Barrett-Metaplasie (n=32) mit einer range von 0,3 - 31,3%. In der Dysplasie (n=30) fand sich eine mediane Expression von 43,3% (range 8,8 – 65,9%), die sich signifikant von der Expression in der Barrett Mukosa unterschied ($p < 0,001$). Das Frühkarzinom (n=26) zeigte einen Median von 43,7% (range 15,3 – 67,5%). Es ergab sich kein signifikanter Expressionsunterschied im Vergleich zur Dysplasie ($p = 0,530$). Beim fortgeschrittenen Adenokarzinom (n=22) fand sich eine mediane Ki-67 Expression von 61,2% (range 11,9 – 84,6%), die sich signifikant von der Expression im Frühkarzinom unterschied ($p = 0,011$).

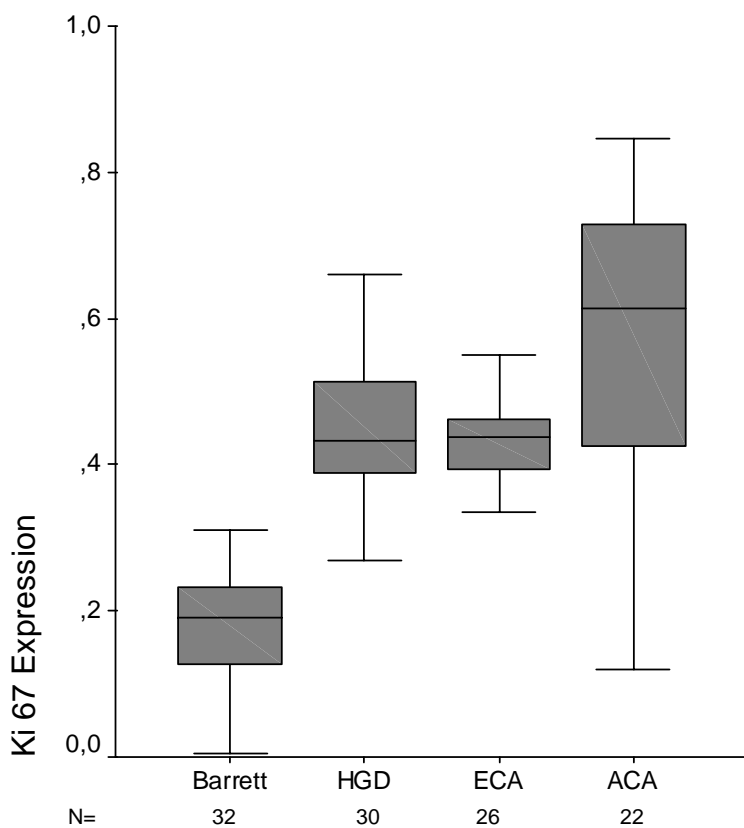


Abb. 13: Ki-67 Expression in der Sequenz

2.3 Bcl-2 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Auswertung der Bcl-2 Expression variierten zwischen 0,1 und 54,4%. In der Barrett Metaplasie (n=32) zeigte sich ein Median von 3,2% bei einer range von 0,1 – 13,6%. Die Expressionswerte von Bcl-2 in der Dysplasie (n=30) verteilten sich um einen Median von 6,3% (range 0,8 – 32,8%) und unterschieden sich somit signifikant von der Expression der Barrett Metaplasie (p=0,041). Die Expression im Frühkarzinom (n=26) betrug 10,7% (range 2,4 – 54,4%) und zeigte einen signifikanten Expressionsunterschied (p=0,014). Im fortgeschrittenen Adenokarzinom (n=16) zeigte sich ein Rückgang des Medians auf 3,3% (range 0,9 – 12,4%), aber kein signifikanter Expressionsunterschied im Vergleich zum Frühkarzinom (p=0,061).

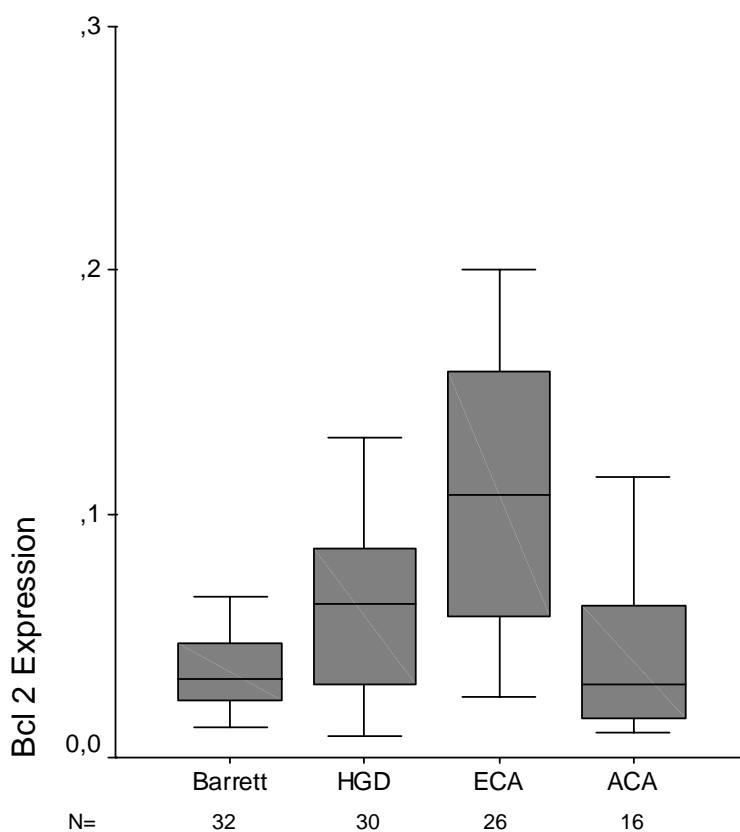


Abb. 14: Boxplot 3: Bcl-2 Expression in der Sequenz

3. Expression von COX-2, Ki-67 und Bcl-2 im Barrett-Karzinom

3.1 Korrelation von COX-2 Expression und Bcl-2

Die COX-2 Expression der Karzinome ergibt sich aus dem Produkt für die Fläche (0-4) und aus dem Wert für die Intensität (1-4). Es fand sich eine mediane COX-2 Expression von 6. So ergaben sich ein Kollektiv mit einer COX-2 Expression kleiner/gleich des Medians (n=24) und ein Kollektiv mit einer COX-2 Expression oberhalb des Medians (n=21).

In der Gruppe mit geringer Cox-2 Expression zeigte sich eine BCL-2-Expression von 10,8% (range 2,5 – 54,4%), in der Gruppe der hohen COX-2 Expression betrug die mediane BCL-2 Expression 2,7% (range 1,0 – 20,0%). Das Ergebnis unterschied sich nicht signifikant ($p=0,078$).

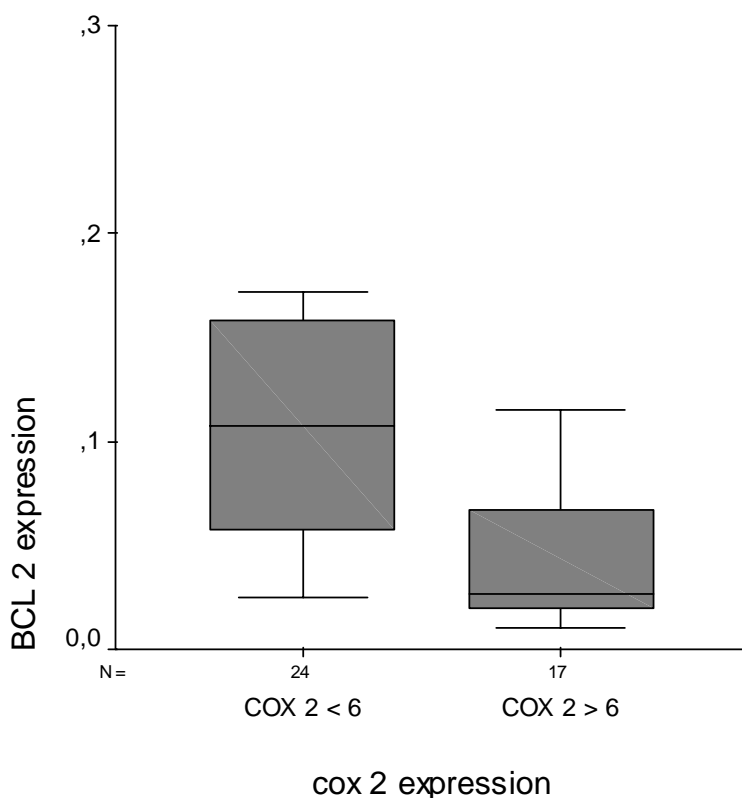


Abb. 15: Boxplot 4: Korrelation von COX-2 und Bcl-2 Expression im Barrett Karzinom

3.2 Korrelation von COX-2 Expression und Ki-67

Bei dieser Auswertung haben wir analog zu 3.1 ein Kollektiv mit COX-2 Expression unterhalb des Medians (n=24) und ein Kollektiv mit Expression größer des Medians (n=21) gebildet. Die Ki-67 Expression lag bei den Karzinomen mit geringer COX-2 Expression bei 43,8% (range 15,4 – 67,5%) und in der Gruppe der Karzinome mit hoher COX-2 Expression bei 57,83% (range 12,0 – 84,6%). Die Korrelation zwischen der COX-2 Expression und der Ki-67 Expression (Proliferation) war statistisch signifikant ($p=0,046$).

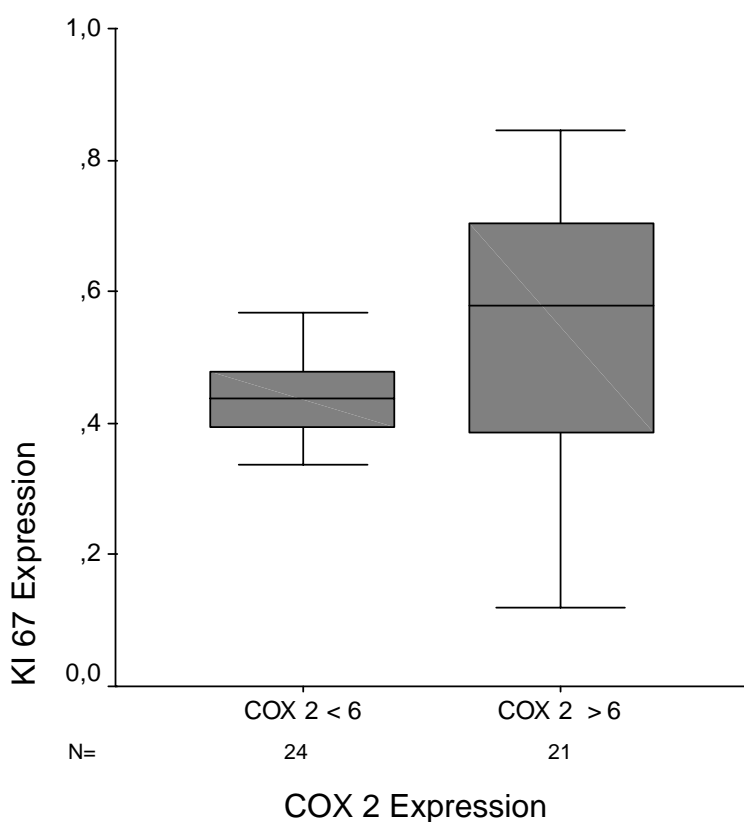


Abb. 16: Boxplot 5: Korrelation von COX-2 und Ki-67 Expression im Barrett Karzinom

3.3 Korrelation COX-2 Expression und lokoregionärer Lymphknotenmetastasierung

Bei der Patientengruppe ohne Lymphknotenbefall (N0: n=30) zeigte sich eine mediane COX-2 Expression von 4 mit einem range von 1-12. Im Kollektiv mit lokoregionärer Lymphknotenmetastasierung (n=15) konnten wir eine signifikant höhere COX-2 Expression beobachten ($p=0,008$). Der Median betrug 12 mit einer range von 4-12.

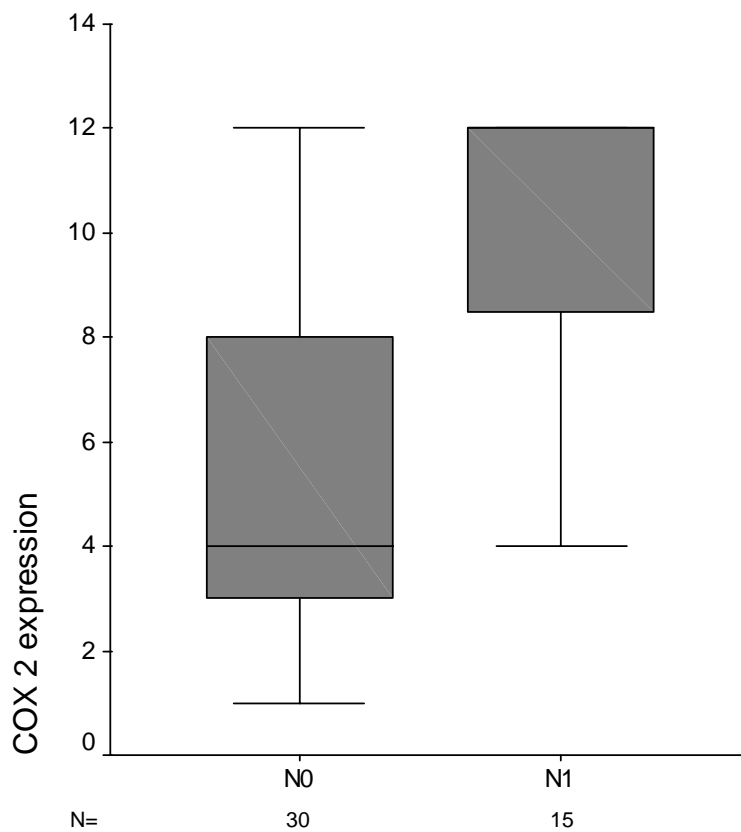


Abb. 17: Boxplot 6: Korrelation von COX-2 und Lymphknotenmetastasierung

4. Überlebensanalyse der Patienten mit Barrett Karzinom

4.1 COX-2 Expression

Für die Überlebensanalyse wurden die Karzinompatienten ebenfalls in zwei Kollektive eingeteilt, eines mit geringer COX-2 Expression (≤ 6 ; $n=24$) und eines mit hoher COX-2 Expression (>6 ; $n=21$). In der Gruppe mit hoher COX-2 Expression verstarb ein Patient intraoperativ. Im Kollektiv der Patienten mit geringer COX-2 Expression lebten nach 48 Monaten noch 80%. Im Kollektiv der hohen COX-2 Expression betrug das kumulative Überleben nach 48 Monaten 35%. Die Gruppe der geringeren COX-2 Expression hat ein signifikant besseres Überleben als die Gruppe der hohen COX-2 Expression (log rank $p=0,0137$). Die COX-2 Expression hat somit einen signifikanten Einfluß auf das Überleben der Karzinompatienten.

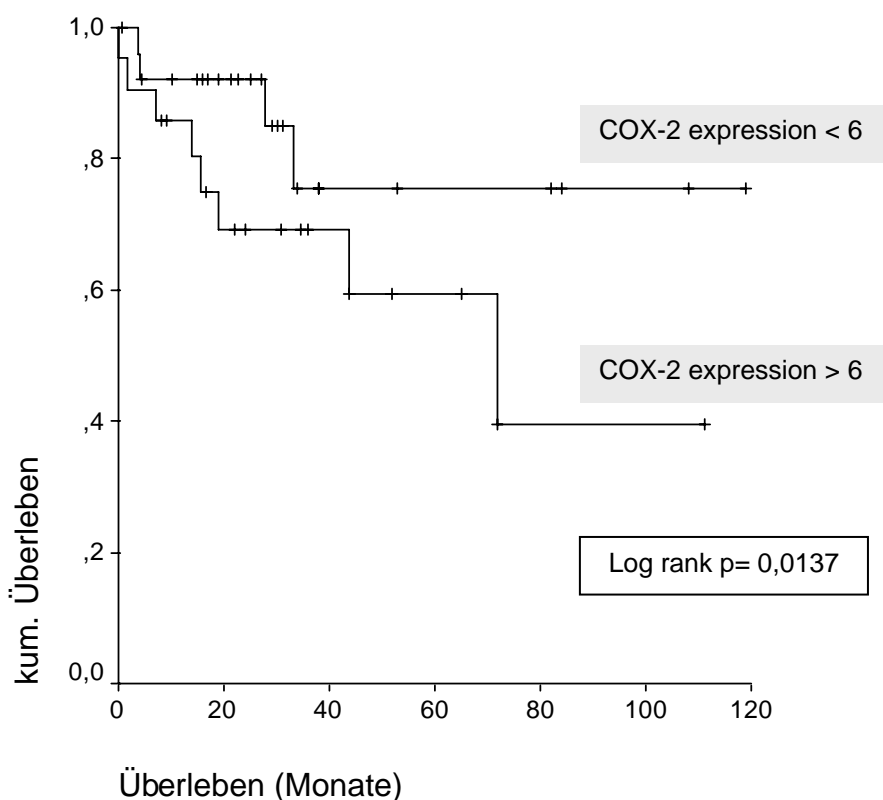


Abb. 18: Überlebenskurven COX-2

4.2 Bcl-2 Expression

Beim Gesamtkollektiv beträgt die mediane Bcl-2 Expression 5%. Demnach haben wir das Kollektiv wieder in zwei Subgruppen unterteilt: in eine mit geringer Bcl-2 Expression ($\leq 5\%$; $n=21$) und eine mit hoher Bcl-2 Expression ($>5\%$; $n=27$). Es resultierten die beiden unten dargestellten Überlebenskurven. Das Kollektiv der geringen Bcl-2 Expression zeigte eine Tendenz zum geringeren Überleben, die Korrelation beider Überlebenskurven ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied (log rank $p=0,1409$).

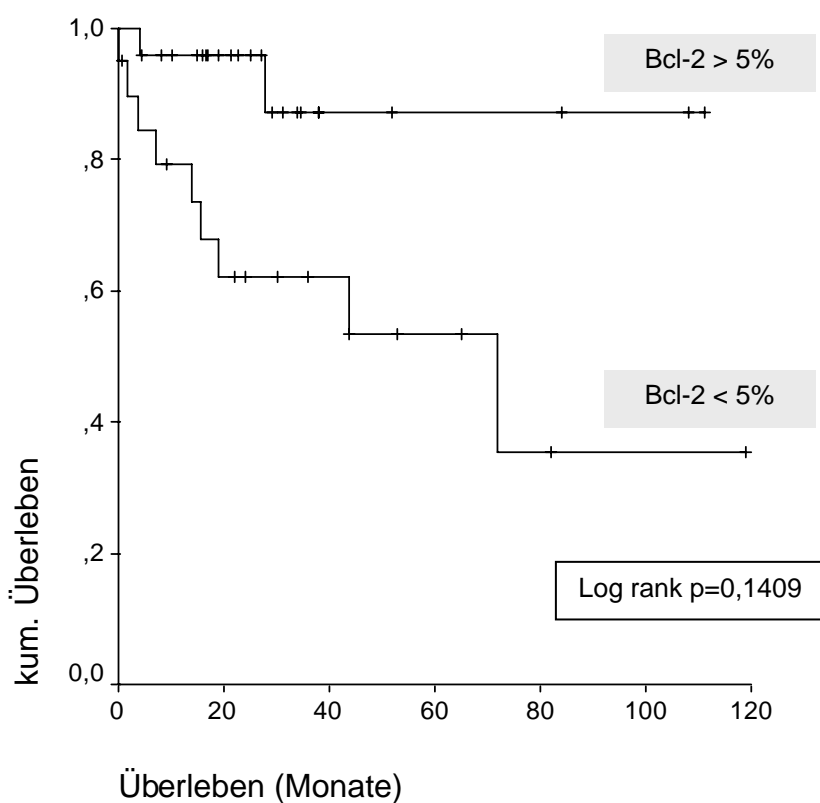


Abb. 19: Überlebenskurven Bcl-2

4.3 Ki-67 Expression

Für die Ki-67 Überlebensanalyse wurde das Patientengut in zwei Kollektive eingeteilt. Der Median (45%) der Ki-67 Expression teilte das Patientengut in ein Kollektiv mit geringer Ki-67 Expression ($\leq 45\%$, $n=22$) und in ein Kollektiv mit hoher Ki-67 Expression ($>45\%$, $n=26$). Das Signifikanzniveau der beiden Kurven war $p=0,5357$. Es zeigte sich zwar die Tendenz, dass hohe Ki-67 Expression mit geringerem kumulativen Überleben einhergeht, der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

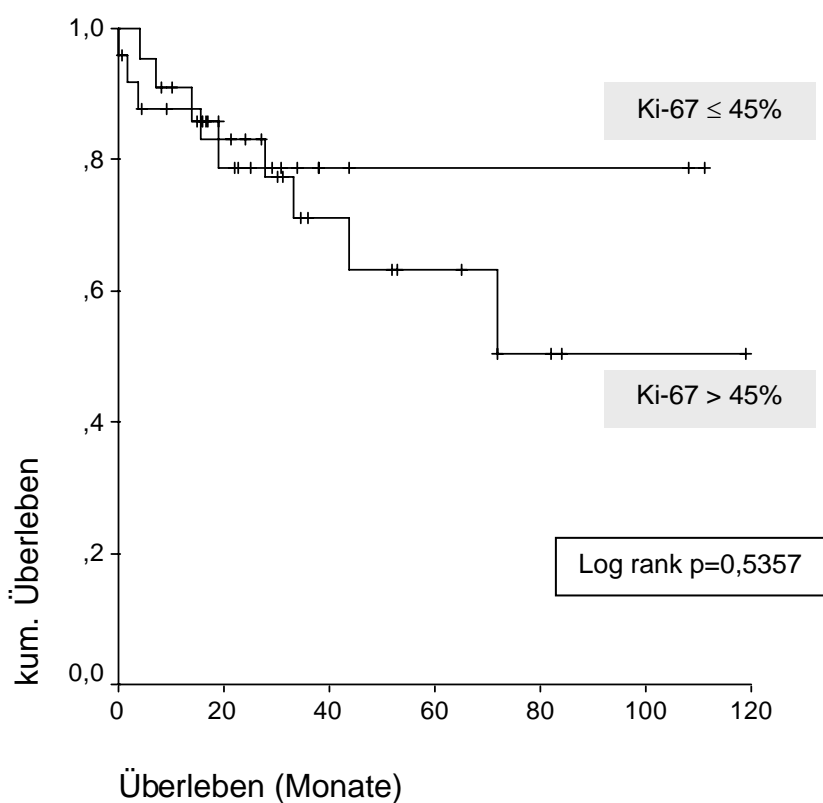


Abb. 20: Überlebenskurven Ki-67

D DISKUSSION

1. Methode

Patientengut

Vom Gesamtkollektiv der Patienten mit Ösophaguskarzinom (n=1635) haben wir ausschließlich Patienten mit einem Adenokarzinom des distalen Ösophagus (AEG Typ I) für unsere Untersuchungen ausgewählt. Weitere Kriterien waren, dass keine neoadjuvante Behandlung vorausgegangen war, der Tumor R0 reseziert wurde und sich ein repräsentatives Kollektiv von Tumorstadien ergab. Ausgeschlossen vom Kollektiv wurden zudem Patienten mit mangelhaftem Gewebematerial.

Immunhistochemie

Die immunhistochemische Detektion von Proteinen wie COX-2, Bcl-2 und Ki-67 ist ein häufig angewandtes Verfahren, um die Expression zu quantifizieren. Es stellt die einzige Methode dar, um Proteinexpression in Formalin und Paraffin fixiertem archiviertem Gewebe nachzuweisen. Die immunhistochemische Färbung kann präzise auf zellulärer Ebene lokalisiert und ausgewertet werden. Zudem bietet sie die Möglichkeit, größere Kollektive effektiv zu analysieren und ist reproduzierbar.

Sensitivität der Färbemethode

Die Sensitivität der immunhistochemischen Färbung kann mit Hilfe von Demaskierungsmethoden (z.B. enzymatisch oder Mikrowelle) optimiert werden. Durch die Fixierung der Präparate mit Formalin entstehen Aldehydvernetzungen und dreidimensionale Strukturveränderungen im Bereich des Antigens, die eine Bindung des Antikörpers verhindern können (Antigenmaskierung). Aus diesem Grund kommen enzymatische oder hitzeinduzierte Demaskierungsmethoden als Vorbehandlung der Gewebsschnitte zum Einsatz. Bei Verwendung der Mikrowelle zeigte sich in unseren Testreihen eine unspezifische Hintergrundfärbung im Bereich der glatten Muskulatur und eine unspezifische Anfärbung von Makrophagen. Auch die Inkubation der Gewebsschnitte mit Protease

imponierte durch eine unspezifische Anfärbung von Drüsengewebe. Unter Verwendung des Dampfdruckkochtopfs konnten wir die Sensitivität unserer Methodik verbessern.

Spezifität der Färbemethode

Die Beschaffenheit und Verdünnung des Primärantikörpers sind wesentliche Parameter, um die Spezifität der immunhistochemischen Färbung zu beeinflussen. Für unsere Untersuchungen haben wir monoklonale Antikörper verwendet, die im Vergleich zu polyclonalen Antikörpergemischen nur gegen eine spezifische Determinante des Antigens gerichtet sind. Um Hintergrundfärbungen zu unterdrücken, haben wir die höchste Antikörperverdünnung gewählt, die dennoch zu einer optimalen Antigenfärbung führte. Herrscht ein Überangebot von Antikörpern, so binden sie unspezifisch an Komplement oder elektrostatisch geladene Gewebekomponenten (Grube 1980). Diese elektrostatisch geladenen Proteine werden trotz Fixierung und Paraffinierung des Untersuchungsmaterials, ebenso wie endogene Enzymaktivitäten, nicht völlig supprimiert. Daher sind für immunhistochemische Nachweise Blockierungen dieser Enzyme und Ladungen notwendig, um deren Mitreaktion und damit falsch positive Ergebnisse möglichst gering zu halten. Zur Erhöhung der Spezifität haben wir zunächst Magermilchpulver und Ziegen Serum getestet. Hierbei kam es aber vor allem im Bereich der Submukosa zu einer Akkumulation von unspezifischen Immunkomplexen. Eine optimale Antigenmarkierung erhielten wir unter Verwendung von 1,5 prozentigem Wasserstoffperoxid.

Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung bleibt trotz verbesserter Sensitivität und Spezifität eine Herausforderung.

Zur Quantifizierung der COX-2 Färbung haben wir ein semiquantitatives Scoring-System gewählt, das zu einer hohen Ergebnis-Konkordanz der 2 Untersucher führte. Zudem bestand die Möglichkeit einer Reevaluation divergenter Ergebnisse.

Für die Auswertung der Ki-67 / Bcl-2 Doppelfärbung haben wir das Bildanalyse System SAMBA gewählt. Diese quantitative Analyse bietet eine effiziente und reproduzierbare Methode, die Auswertung der Doppelfärbung durchzuführen.

2. Ergebnisse

Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz

Unsere Untersuchungen haben deutlich gezeigt, dass Cyclooxygenase 2 im Verlauf der Karzinogenese des Barrettkarzinoms in einem frühen Stadium überexprimiert wird. Wir konnten hierbei eine Expressionssteigerung des Proteins zwischen Barrett Metaplasie, HGD und invasivem Karzinom beobachten. Die Expression im Frühkarzinom stieg im Vergleich zum fortgeschrittenen Karzinom nicht signifikant. Auch Ki-67 ließ in unserer Studie eine Signifikanz der Expressionssteigerung im Verlauf der Sequenz erkennen. Bcl-2 zeigte einen signifikanten Anstieg der Expression bis zum Frühkarzinom und eine geringere Expression im fortgeschrittenen Tumor.

Die Expressionssteigerung der Cyclooxygenase 2 in der Sequenz konnte in der Literatur von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden. Morris et al. haben in ihrer Studie festgestellt, dass 75% der Patienten mit einer Barrett Metaplasie COX-2 exprimieren und ein signifikanter Anstieg der Expression zur HGD/ Adenokarzinom beobachtet wurde (Morris et al. 2001). Hierbei fand sich ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen LGD und HGD, wobei in dieser Studie ausschließlich bioptisches Gewebematerial verwendet wurde. So ist es möglich, dass bei Patienten mit bioptisch gesicherter LGD an anderer Stelle bereits HGD vorhanden war.

Der frühe Anstieg der COX-2 Expression in der Sequenz des Barrettkarzinoms geht mit Untersuchungen im Kolon Karzinom konform. Eberhart et al. haben in der kolorektalen Adenom-Karzinom Sequenz eine deutliche COX-2 Überexpression feststellen können (Eberhart et al. 1995), was darauf hin deutet, dass gesteigerte COX-2 Expression in der Karzinogenese von Bedeutung zu sein scheint.

Keine Bestätigung finden unsere Ergebnisse in den Untersuchungen von Lagorce et al., die in ihrer Studie keinen Anstieg der COX-2 Expression in der Sequenz beobachten konnten (Lagorce et al. 2002). Diese Ergebnisdivergenz mit unseren Untersuchungen könnte zum einen durch die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers zustande kommen, der eine

geringere Spezifität aufweist und somit zu abweichenden Färbeergebnissen führen könnte. Zum anderen geht aus der Arbeit nicht eindeutig hervor, wie das Kollektiv zusammengesetzt wurde. Die Autoren beschreiben, dass im umliegenden Gewebe aller Adenokarzinome Barrett Mukosa präsent war, jedoch finden sich in den 66 untersuchten Adenokarzinomen nur 32 Barrett Metaplasien. Diese enthalten laut Aussage der Autoren in 32 Fällen keine Dysplasie und in 17 Fällen dysplastisches Gewebe, was unserer Ansicht nach zu divergenten Zahlen führen könnte. Weiterhin ist aus den Daten nicht eindeutig ersichtlich, ob die Sequenzanalysen innerhalb eines Gewebeblocks vorgenommen wurden oder die einzelnen Sequenzstadien aus unterschiedlichen Patienten rekrutiert wurden.

Die frühe Überexpression von COX-2 in der Sequenz impliziert, dass zelluläre Veränderungen bereits vor Entstehung eines malignen Phänotyps auftreten, eventuell sogar zu seiner Entstehung beitragen. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang der Einfluß von COX-2 auf Apoptose und Proliferation. Die Rolle von Bcl-2 und damit der intrinsischen Aktivierungskaskade der Apoptose wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Katarda et al. haben in ihrer Studie beispielsweise zeigen können, dass Bcl-2 als Apoptoseinhibitor schon in frühen Stadien der Sequenz überexprimiert wird und somit durch Hemmung der Apoptose die Karzinogenese begünstigen könnte (Katarda et al. 1997). Die Untersuchungen von Goldblum und Rice hingegen konnten keine Expressionssteigerung von Bcl-2 in der Sequenz des Barrettkarzinoms beobachten. Diese Ergebnisse könnten darauf hin deuten, dass der mitochondriale Aktivierungsweg der Apoptose eine untergeordnete Rolle in der Karzinogenese der Barrettkarzinoms spielt. Möglicherweise könnte die extrinsische Kaskade in diesem Prozeß stärker involviert sein.

Ki-67 wird in allen Phasen des Zell-Zyklus außer der G0-Phase exprimiert und hat sich als Proliferationsmarker etabliert (Hong et al. 1995, Gerdes et al. 1984). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fand sich in der Literatur einheitlich ein Expressionsanstieg von Ki-67 in der Sequenz des Barrettkarzinoms (Halm et al. 2000, Honget al. 1995, Polkowski et al. 1995). Going und Mitarbeiter haben in ihren Untersuchungen nicht nur einen Anstieg der Ki-67 Expression in der Barrett Mukosa/LGD/HGD feststellen können, sondern auch eine

abnorme Lokalisation der Expression. So befindet sich in der Barrett Mukosa die Proliferationszone in der basalen Epithelschicht und streut mit zunehmendem Entartungsgrad diffus in die oberflächlicheren Schichten (Going et al. 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch inadäquate Proliferation zu einer Störung der hoch organisierten Struktur des Epithels kommen kann, was möglicherweise entscheidend zur Karzinogenese beiträgt.

Adenokarzinom des distalen Ösophagus

In unseren Untersuchungen beim Barrettkarzinom war hohe COX-2 Expression mit einer signifikant höheren Ki-67 Expression assoziiert, zeigte jedoch keine signifikante Korrelation mit der Bcl-2 Expression. Karzinome mit lokoregionärer Lymphknotenmetastasierung waren mit einer signifikant höheren COX-2 Expression assoziiert.

Hohe COX-2 Expression ging mit geringerem Überleben in unserer Studie einher und zeigte hierbei einen signifikanten Einfluß auf das Überleben der Patienten. Die Bcl-2- und Ki-67 Expression im Barrettkarzinom beeinflusste das Überleben nicht signifikant.

In vitro Studien haben gezeigt, dass Überexpression von COX-2 eine Reihe zellulärer Effekte auslöst wie gesteigerte Proliferation, verminderte Apoptose, verminderte E-Cadherin Expression (Tsuji et al. 1995), verstärkte Angiogenese (Jones et al. 1999) und ein erhöhtes invasives/metastatisches Potential (Tsuji et al. 1997). Tsujii und Mitarbeiter haben über Transfektion mittels eines Vektors die COX-2 Expression in Intestinalzellen von Ratten gesteigert. Dies führte zu phänotypischen Veränderungen der Epithelzellen im Sinne von verstärkter Adhäsion an extrazelluläre Matrix und Inhibition der Apoptose. Durch Zugabe eines selektiven COX-2 Inhibitors (Sulindac) waren diese Veränderungen reversibel (Tsuji et al. 1995). Sheng et al. konnten in Karzinomzellen des Kolons durch Zugabe von PGE₂ Apoptose hemmen und gesteigerte Bcl-2 Expression induzieren (Sheng et al. 1998). Die divergenten Ergebnisse unserer Studie könnten sich dadurch erklären lassen, dass COX-2 seine Wirkung auf den programmierten Zelltod im Barrettkarzinom über einen alternativen Aktivierungsweg (extrinsische Kaskade) steuert und die Bcl-2 Familie hierbei eine

untergeordnete Rolle spielt. Für diese These sprechen die Untersuchungen von Halm und Mitarbeitern, die in 8/9 untersuchten Barrett-Adenokarzinomen eine verminderte Apoptoserate feststellen konnten, die mit Mutationen des P53 Gens assoziiert war (Halm et al. 2000).

In der Literatur wird einheitlich eine gesteigerte Ki-67 Expression sowohl im Barrettkarzinom als auch in anderen Tumorentitäten beschrieben (Fujii et al. 2003, Halm et al. 2000, Dowsett et al. 1999, Yonemura et al. 1990). In unserer Studie konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass im Barrettkarzinom hohe COX-2 Expression mit gesteigerter Ki-67 Expression einher geht. Cyclooxygenase 2 könnte möglicherweise einen direkten Einfluß auf die Proliferation in Tumorzellen haben. Der genaue Mechanismus und die dabei involvierten Signalwege sind noch nicht eindeutig geklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Unterstützt werden unsere Ergebnisse durch Studien, in denen selektive COX-2 Inhibitoren in COX-2 exprimierenden Ösophaguskarzinom-Zelllinien eine signifikante Verringerung des Zellwachstums bewirken konnten (Souza et al. 2000, Zimmermann et al. 1999).

Im Magenkarzinom konnte analog zu unseren Ergebnissen gezeigt werden, dass die Intensität der COX 2 Expression mit dem metastatischem Befall von Lymphknoten korreliert (Uefuji et al. 2000).

Buskens et al. konnten in ihren Untersuchungen beim Barrettkarzinom eine signifikante Korrelation der COX-2 Expression mit der Entwicklung von Fernmetastasen und lokoregionärem Rezidiv feststellen (Buskens et al. 2002). Darüberhinaus zeigte die Studie ein Tendenz zur positiven Assoziation mit lokoregionären Lymphknotenmetastasen, die jedoch nicht signifikant war ($p=0,09$). Eine mögliche Ursache dieser Ergebnisdivergenz könnte das unterschiedliche Patientenkollektiv sein. Die Studie von Buskens et al. schließt neben den Patienten mit AEG Typ I auch Patienten mit AEG Typ II in ihr Kollektiv ein. Die beiden Karzinomentitäten unterscheiden sich in der Lokalisation der lokoregionären Lymphknotenmetastasierung. (AEG Typ II metastasiert auf lymphogenem Wege hauptsächlich in die paraaortalen Lymphknoten, zum Truncus coeliacus und zum Milzhilus.

AEG Typ I hingegen metastasiert nach oral und aboral, bevorzugt somit die mediastinalen, paraösophagealen und zöliakalen Lymphknoten) (Mueller et al. 2000).

Sowohl die Ergebnisse der Studie von Buskens et al. als auch unsere Untersuchungen könnten auf ein mögliches metastasenförderndes Potential der Cyclooxygenase 2 hindeuten. In Untersuchungen am Magenkarzinom konnten Chen et al. zeigen, dass die COX-2 Expression einen signifikanten Einfluß auf das Überleben der Patienten hat (Chen et al. 2001). Hierbei war in der univariaten Analyse die Prognose der Patienten mit COX-2 positivem Karzinom signifikant schlechter als die Prognose der Patienten mit COX-2 negativem Tumor, aber es handelte sich nicht um einen unabhängigen prognostischen Faktor. Buskens et al. hingegen konnten COX-2 im Adenokarzinom des Ösophagus nicht nur einen signifikanten Einfluß auf das Überleben der Patienten nachweisen, COX-2 stellte zudem einen unabhängigen prognostischen Faktor für das Überleben der Patienten dar (Buskens et al. 2002). Sowohl die eben zitierten als auch unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass Cyclooxygenase 2 möglicherweise eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese und in der Malignität des Barrettkarzinoms spielt.

Die Ki-67- und Bcl-2 Expression zeigte in unserer Studie keinen Einfluß auf das Überleben der Patienten. Sowohl bei Proliferation als auch bei Apoptose handelt es sich um überaus komplexe Vorgänge, bei denen eine Vielzahl von Mediatoren und Signalwegen involviert sind, so dass eine Beeinflussung des Überlebens von Patienten durch einen einzelnen Faktor nicht anzunehmen ist.

E ZUSAMMENFASSUNG

Das Adenokarzinom des distalen Ösophagus zeigte in den letzten Jahren den höchsten Inzidenzanstieg aller malignen Tumoren in der westlichen Welt. Die Ursachen hierfür sind noch weitgehend unklar. In verschiedenen gastrointestinalen Tumoren, einschließlich des Barrettkarzinoms konnte eine Steigerung der Cyclooxygenase-2 Expression nachgewiesen werden. Verschiedene Studien zeigen, dass COX-2 eine bedeutende Rolle im Rahmen der gastrointestinalen Karzinogenese spielt. Bis heute sind die genauen Wirkmechanismen von COX-2 ungeklärt, es wird in diesem Zusammenhang ein Einfluß auf Apoptose, Proliferation und Angiogenese diskutiert.

In unserer Studie haben wir die COX-2 Expression in den verschiedenen Stadien der Barrett-Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz untersucht, sowie den Proliferationsmarker Ki-67 und das Apoptose-hemmende Protein Bcl-2 in diesen Geweben analysiert. Anschließend wurden die Ergebnisse mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert.

Wir haben in Paraffin eingebettetes Gewebe von 48 Adenokarzinomen und ihren Vorstufen untersucht, das durch Ösophagektomie den Patienten entnommen wurde. Dieses Gewebe haben wir immunhistochemisch mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen COX-2, Ki-67 und Bcl-2 markiert und im Anschluß die Färbeintensität und -fläche der Schnitte bewertet.

Es zeigte sich eine signifikante Expressionssteigerung von COX-2, Ki-67 und Bcl-2 in der Barrett-Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz. In Tumoren mit hoher COX-2 Expression fand sich eine signifikant höhere Ki-67 Expression ($p=0,046$) aber wir konnten keine signifikante Korrelation von COX-2 und Bcl-2 Expression feststellen. Adenokarzinome mit lokoregionärer Lymphknotenmetastasierung zeigten eine deutlich höhere COX-2 Expression als metastasenfremde Tumoren ($p=0,008$). Eine hohe COX-2 Expression im Karzinom ging in unseren Untersuchungen mit einem deutlich geringeren Überleben der Patienten einher (log rank $p=0,0137$), eine hohe Bcl-2 oder Ki-67 Expression beeinflusste das Überleben der Patienten nicht signifikant.

Unsere Ergebnisse bestätigen, dass Cyclooxygenase 2 in einem frühen Stadium der Karzinogenese des Barrettkarzinoms überexprimiert wird und einen signifikanten Einfluß auf das Überleben der Patienten hat. Seinen Einfluß auf die Karzinogenese könnte COX-2 über eine gesteigerte Proliferation umsetzen und auch ein metastasenförderndes Potential könnte im Wirkspektrum der COX-2 enthalten sein. Der intrinsische Aktivierungsweg der Apoptose scheint nicht unmittelbar bei den Interaktionsmechanismen der COX-2 beteiligt zu sein. Unsere Ergebnisse implizieren die Initiation klinischer Studien, um die Wirkung von selektiven COX-2 Inhibitoren als neue adjuvante Chemotherapie zur Behandlung von Adenokarzinomen, die auf der Basis einer Barrett Metaplasie entstehen, zu untersuchen.

F SUMMARY/ ABSTRACT

The incidence of Barrett's esophageal adenocarcinoma is increasing more rapidly than any other malignancy in industrialized countries. The reason still remains unclear. Elevated cyclooxygenase 2 expression appears to play an important role in gastrointestinal carcinogenesis, including adenocarcinomas of the esophagus. Until now the exact mechanism and way of interaction of COX-2 are unexplored and in this context COX-2 might be involved in apoptosis, proliferation and angiogenesis.

In our study we investigated the COX-2 expression in the metaplasia-dysplasia-carcinoma-sequence and the adenocarcinoma of the esophagus, as well as the proliferation marker Ki-67 and the apoptosis inhibiting protein Bcl-2 in these specimen. Furthermore we examined its potential correlation to clinicopathological parameters.

Sequence- and tumor sections from 48 patients undergoing intentionally curative surgery for an adenocarcinoma arising from Barrett's esophagus were immunohistochemical stained using monoclonal anti-human COX-2, Ki-67 and Bcl-2 antibodies. The specimens were scored based on the intensity and extend of immunopositivity.

COX-2-, Ki-67- and Bcl-2 immunoreactivity was significantly increased in the metaplasia-dysplasia-carcinoma-sequence of Barrett's adenocarcinoma. Tumors with high expression of COX-2 showed a significantly higher Ki-67 expression ($p=0,046$), but no correlation with Bcl-2 immunoreactivity. Adenocarcinomas with local lymphatic metastases had a significantly higher COX-2 expression than tumors without lymph node infiltration ($p=0,008$).

Patients with high COX-2 immunoreactivity were recognized to have reduced survival (log rank $p=0,0137$), whereas Bcl-2 and Ki-67 expression showed no significant influence on patients survival.

Our data points out that Cyclooxygenase 2 expression is progressively increased during carcinogenesis of Barrett's adenocarcinoma and has a significant impact on survival of patients. COX-2 could provide its influence on carcinogenesis by increasing proliferation of

malignant cells, but it does not seem to directly involve the intrinsic pathway of apoptosis.

COX-2 appears to include an increase of metastatic potential within its interactions.

These findings support the effort to initiate clinical studies to investigate the effect of COX-2 inhibitors as a novel (adjuvant) chemotherapeutic modality for the treatment of adenocarcinoma arising from Barrett's esophagus.

G LITERATURVERZEICHNIS

Abdelsayed RA, Guijarro-Rojas M, Ibrahim NA, Sanguenza OP
Immunohistochemical evaluation of basal cell carcinoma and trichepithelioma using Bcl-2, Ki-67, PCNA and p53
J Cutan Pathol 2000; 27: 169

Adams J, Cory S
The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival
Science 1998; 281: 1322-1326

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M
Molekularbiologie der Zelle
VHC Verlag 1986; 680-691

Altorki NK, Oliveria S, Schrumpp DS,
Epidemiology and molecular biology of Barrett's adenocarcinoma
Semin Surg Oncol 1997; 13: 270-280

Ashkenazi A, Dixit V
Death-Receptors: Signaling and modulation
Science 1998; 281: 1305-1308

Bennett A, DeTacca M
Proceedings: Prostaglandins in human colonic carcinoma
Gut 1975; 16: 409

Bennett A
Prostaglandins and the alimentary tract. In: Karim SMM, ed. Prostaglandins: Physiological, pharmacological and pathological aspects.
Baltimore, MD: University Park, 1976: 247-276

Bennett A, Tacca MD, Stamford IF, Zebro T
Prostaglandins from tumours of human large bowel
Br J Cancer 1977; 35: 881-884

Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF Jr.
Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia
JAMA 1991; 265: 1287-1289

Bourne JA
Handbuch der Immunperoxydase-Färbemethoden
DAKO Corporation 1983; 7-13

Brown DC, Gatter KC
Monoclonal Antibody Ki-67: It's use in histopathology
Histopathology 1990; 17: 489-503

Buskens CJ, VanRees BP, Sivula A, Reitsma JB, Haglund C, Bosma PJ, Offerhaus GJ, VanLangenschot JJB, Ristimäki A
Prognostic Significance of elevated COX-2 Expression in Patients with Adenocarcinoma of the Esophagus
Gastroenterology 2002; 122: 1800-1807

-
- Chen CN, Sung CT, Lin MT, Lee PH, Chng KJ
Clinicopathologic association of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 expression in gastric adenocarcinoma
Ann Surg 2001; 233: 183-188
- Daly JM, Fry WA, Little AG, Winchester DP, McKee RF, Stewart AK, Fremgen AM
Esophageal cancer: results of an American College of Surgeons Patient Care Evaluation Study
J Am Coll Surg. 2000; 190: 562-72
- DeMeester TR, Attwood SE, Smyrk TC, Therkildsen DH, Hinder RA
Surgical therapy in Barrett's esophagus.
Ann Surg. 1990; 212: 528-40
- Dent J, Bremner CG, Collen MJ, Haggitt RC, Spechler SJ
Barrett's oesophagus
J Gastroenterol Hepatol 1991; 6: 1-22
- Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr.
Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States
Cancer 1998; 83: 2049-53
- Dowsett M, Archer C, Assersohn L, Gregory RK, Ellis PA, Salter J, Chang J, Mainwaring P, Boeddinghaus I, Johnston SR, Powles TJ, Smith IE
Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer
Endocr Relat Cancer 1999; 6: 25-28
- Duchrow M, Schlueter C, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J
Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67
Cell Prolif 1996; 29: 1-12
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika a, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN
Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas
Gastroenterology 1994; 107: 1183-1188
- Endl E, Gerdes J
The Ki-67 Protein: Fascinating Forms and an unknown function
Cell Res 2000; 257: 231-237
- Farrow DC, Vaughan TL, Hansten PD
Use of aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1998; 7: 97-102
- Fujii T, Nakagawa S, Hanzawa M, Sueyoshi S, Fujita H, Shirouzu K, Yamana H
Immunohistochemical study of cell cycle-related factors, oncogene expression, and cell proliferation in adenocarcinoma developed in Barrett's esophagus
Onc Reports 2003; 10: 427-431
- Funkhouser EM, Sharp GB
Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma.
Cancer 1995; 76: 1116-1119

-
- Geboes K, VanEyken P
The diagnosis of dysplasia and malignancy in Barrett's oesophagus
Histopathology 2000; 37: 99-107
- Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD
Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67
Am J Pathol. 1991; 138: 867-873
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H
Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen, defined by the molecular antibody Ki-67
J Immunol 1984; 133: 1710-1715
- Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hylind LM, Calano P, Booker SV, Robinson CR, Offerhaus GJ
Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis
New Engl J Med 1993; 328: 1313-1316
- Going JJ, Keith WN, Neilson L, Stoeber K, Szuart RC, Williams GH
Aberrant expression of minichromosome maintenance proteins 2 and 5, and Ki-67 in dysplastic squamous oesophageal epithelium and Barrett's mucosa
Cancer 2002; 50: 373-377
- Goldblum JR, Rice TW
Bcl-2 protein expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-carcinoma-sequence
Mod Pathol 1995; 8: 866-869
- Green DR, Reed JC
Mitochondria and Apoptosis
Science 1998; 281: 1309-1312
- Grube D
Immunoreactivities of gastrin (G-) cells: nonspecific binding of immunoglobulins to G-cells by ionic interactions
Histochemistry 1980; 66: 149-67
- Hahn E, Reimann J
Klinische Gastroenterologie in 2 Bänden
Thieme Verlag 3. Aufl. 2000; 597-598
- Halm U, Tannapfel A, Breitung B, Breidert M, Wittekind CW, Mössner J
Apoptosis and cell proliferation in the metaplasia-dysplasia-carcinoma-sequence of Barrett's esophagus
Hepato-Gastroenterology 2000; 47: 962-966
- Hamilton SR, Aaltonen LA
World Health Organization Classification of Tumours
Pathology and Genetics of the Digestive System
Lyon: IARC Press 2000
- Hawkey CJ, Rampton DS
Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, diseases or treatment?
Gastroenterology 1985; 89: 1162-1188

-
- Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ
Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death
Nature 1990; 348: 334-336
- Hong MK, Laskin WB, Herman BE, Johnston MH, Vargo JJ, Steinberg SM, Allegra CJ, Johnston PG
Expansion of the Ki-67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus
Cancer 1995; 75: 423-429
- Jones MK, Wang H, Peskar BM
Inhibition of angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing
Nat Med 1999; 5: 1418-1423
- Kaplan EL, Meier P
Non-parametric estimation from incomplete observations
J Am Statist Assoc 1958; 53: 457-481
- Katada N, Hinder RA, Smyrk TC, Hirabayashi N, Perdakis G, Lund RJ, Woodward T, Klingler PJ
Apoptosis is inhibited early in the dysplasia-carcinoma-sequence of Barrett's esophagus.
Arch Surg 1997; 132: 728-733
- Kraemer SA, Meade EA, DeWitt DL
Prostaglandin peroxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5' flanking regulatory sequences.
Arch Biochem Biophys 1992; 293: 391-400
- Kroemer G, Reed JC
Mitochondrial control of cell death
Nat Med 2000; 6: 513-519
- Kujubu DA, Flecher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR
TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells encodes a novel prostaglandin synthase/ cyclooxygenase homologue
J Biol Chem 1991; 166: 12866-12872
- Lagorce C, Paraf F, Vidaud D, Couvelard A, Wendum D, Martin A, Fléjou JF
Cyclooxygenase 2 is expressed frequently and early in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma
Histopathology 2003; 42: 457-465
- Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC
NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells.
Cancer Res. 1998; 58: 4245-9
- Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore JR, Seibert K
Antiangiogenic and Antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors
Cancer Res 2000; 60: 1306-1311

McDonnell TJ, Deane N, Platt FMI
Bcl-2 Immunglobulin transgenic mice demonstrate extended B-cell survival and follicular lymphoproliferation
Cell 1989; 57: 79-88

Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ
Cyclooxygenase-2: regulation and relevance to inflammation
Biochem Pharmacol 1995; 50: 1535-1542

Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O
Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes
J Biol Chem. 1976; 251: 2629-36

Miyashita T, Reed JC
Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene
Cell 1995; 80: 293-299

Möbius C, Stein HJ, Becker I, Feith M, Theisen J, Gais P, Jütting U, Siewert JR
The 'angiogenic switch' in the progression from Barrett's metaplasia to esophageal adenocarcinoma
ESJO 2003; 890-894

Möbius C, Stein HJ, Becker I, Feith M, Theisen J, Gais P, Jütting U, Siewert JR
Angiogenesis in Barrett's cancer
World Journal of Surgery 2004; in press

Mohan C
Cell Cycle: a brief overview
Merck Research Catalogue 2004

Morales CP, Souza RF, Spechler SJ
Hallmarks of cancer progression in Barrett's esophagus
Lancet 2002; 360: 1587-1589

Monnier P, Fontollet C, Savery M, Ollyo JB
Barrett's oesophagus or columnar epithelium of the lower oesophagus.
Baillieres Clin Gastroenterol 1987; 1: 769-89

Morris CD, Armstrong GR, Bigley G, Green H, Attwood SEA
Cyclooxygenase 2 Expression in the Barrett's Metaplasia-Dysplasia-Adenocarcinoma-Sequence
Am J Gastroenterology 2001; 96: 990-996

Mueller JD, Stein HJ, Oyang T, Natsugoe S, Feith M, Werner M, Siewert JR
Frequency and clinical impact of lymph node micrometastasis and tumor cell microinvolvement in patients with adenocarcinoma of the esophagogastric junction
Cancer 2000; 89: 1874-82

Muller JM, Erasmi H, Zieren U, Pichlmaier H
Palliative surgical treatment of cancer of the esophagus]
Med Klin (Munich) 1991; 86: 24-31

-
- Ngan BY, Chen-Lewy Z, Weiss LM, Warnke RA, Cleary ML
Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the BCL-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation
N Engl J Med 1988; 318: 1638-1644
- Noll S, Schaub Kuehnen S
Praxis der Immunhistochemie
Urban und Fischer Verlag, 1. Aufl. 2000
- Ormsby AH, Petras RE, Henricks WH, Rice TW, Rybicki LA, Richter JE, Goldblum JR
Observer variation in the diagnosis of superficial oesophageal adenocarcinoma
Gut 2002; 51: 671-676
- Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM
Suppression of intestinal polyposis in APC delta 716 knockout mice by inhibition of COX-2
Cell 1996; 87: 803-809
- Phillips RW, Wong RK
Barrett's esophagus. Natural history, incidence, etiology, and complications.
Gastroenterol Clin North Am 1991; 20: 791-816
- Polkowski W, VanLanschoot JJB, Ten Kate FJW, Baak JPA, Tytgat GNJ, Obertop H, Voorn WJ, Offerhaus GJA
The value of p53 and Li-67 as markers for tumor progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma-sequence
Surg Oncol 1995; 4: 163-171
- Qiao L, Kozoni V, Tsioulialis GJ, Koutsos MI, Hanif R, Shiff SJ, Rigas B
Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes in vivo
Biochim Biophys Acta 1995; 1258: 215-223
- Reid BJ
Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma.
Gastroenterol Clin North Am. 1991; 20: 817-34
- Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE
Observer variation in in the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus
Hum Pathol 1988; 19: 166-178
- Riddell RH
Dysplasia and cancer in inflammatory bowel diseases
Br J Surg 1985; 72: 83
- Sakamoto C
Roles of COX-1 and COX-2 in gastrointestinal pathophysiology
J Gastroenterol 1998; 33: 618-624
- Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T
Expression of Cyclooxygenase -1 and -2 in human colorectal cancer
Cancer Res 1995; 55: 3785-3789

Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Sasaki Y, Kawano S, Hori M.
Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo.
Lab Invest 1999; 79: 1469-1477

Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, Dixon MF,
Fenoglio-Preiser CM, Fléjou JF, Geboes K, Hattori T, Hirota T, Itabashi M, Iwafuchi M,
Iwashita A, Kim IY, Kirchner T, Klimpfing M, Koike M, Lauwers GY, Lewin KJ, Oberhuber
G, Offner F, Price AB, Rubio CA, Shimizu M, Shimoda T, Sipponen P, Solcia E, Stolte M,
Watanabe H, Yamabe H
The Vienna Classification of gastrointestinal epithelial neoplasia
Gut 2000; 47: 251-255

Scholzen T, Gerdes J
The Ki-67 protein: from the known and the unknown
J Cell Physiol. 2000; 182: 311-322

Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN
Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase 2
J Clin Invest 1997; 99: 2254-2259

Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN
Modulation of Apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer
cells
Cancer Res 1998; 58: 362-366

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y
Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial
channel VDAC
Nature 1999; 399: 483-487

Shirvani V, Ouatu-lascar R, Kaur B
Cyclooxygenase 2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma: ex vivo induction
by bile salts and acid exposure.
Gastroenterology 2000; 118: 487-496

Siemann DW
The tumor microenvironment: a double-edged sword
Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998; 42: 697

Siewert JR, Hölscher AH, Becker K, Gössner W
Kardiakarzinom: Versuch einer therapeutisch relevanten Klassifikation
Chirurg 1987; 58: 25-34

Siewert JR, Stein HJ
Carcinoma of the Cardia: Carcinoma of the gastroesophageal junction – classification,
pathology and extent of resection
Diseases of the Esophagus 1996; 173-182

Siewert JR, Stein HJ, Feith M, Bruecher BLDM, Bartels H, Fink U
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
Annals of Surgery 2001; 234: 360-369

-
- Siewert JR, Stein HJ, Sandler A
Chirurgische Relevanz präoperativer Diagnostik bei Tumoren des Gastrointestinaltrakts –
Entscheidungswege beim Ösophagus-, Magen-, Colon- und Rektumkarzinom
Der Chirurg 1997; 68: 317-324
- Singer II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF
Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease
Gastroent 1998; 115: 297-306
- Sjogren RW, Johnson LF
Barrett's esophagus: a review.
Am J Med 1983; 74: 313-321
- Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT
COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors.
Cancer. 2000; 89: 2637-45
- Souza RF, Shewmake K, Beer DG, Cryer B, Spechler SJ
Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human
esophageal adenocarcinoma cells
Cancer Res 2000; 60: 5767-5772
- Soydan AS, Gaffen JD, Weech PK, Tremblay NM, Kargman WS, O'Neill G, Bennett A,
Tavares IA
Cytosolic Phospholipase A2, cyclooxygenase and arachidonate in human stomach tumors
Eur J Cancer 1997; 33: 1508-1512
- Spechler SJ, Goyal RK
Barrett's oesophagus
N Engl J Med 1986; 315: 362-71
- Spechler SJ, Goyal RK
The columnar-lined esophagus, intestinal metaplasia and Norman Barrett
Gastroenterology 1996; 110: 614-621
- Stein HJ and Panel of Experts
Esophageal cancer: screening and surveillance. Results of a consensus conference.
Dis Esoph 1996; 9: 3
- Stein HJ, Siewert JR
Barrett's esophagus: pathogenesis, epidemiology, functional abnormalities, malignant
degeneration and surgical management
Dysphagia 1993; 8 : 276-288
- Stein HJ, Feith M, Siewert JR
Cancer of the esophagogastric junction
Surg Onc 2000; 9: 35-41
- Steinbach G, Lynch PM, Phillips RKS, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N,
Saunders B, Shen Y, Fujimura T, So LK, Levin B
The effect of Celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis
N Engl J Med 2000; 342: 1946-1951
- Streitz JM Jr, Ellis FH Jr, Gibb SP, Balogh K, Watkins E Jr.
Adenocarcinoma in Barrett's esophagus. A clinicopathologic study of 65 cases.
Ann Surg. 1991; 213: 122-5

Taketo MM

Review: Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Tumorigenesis (Part II)
J Nat Canc I 1998; 21: 1609-1620

Tanji N, Kikugawa T, Yokoyama M

Immunohistochemical study of cyclooxygenases in prostatic adenocarcinoma; Relationship to apoptosis and bcl-2 protein expression
Anticancer Res 2000; 20: 2313-2320

Thornburn A

Death receptor-induced cell killing
Cell Sig 2003; 16: 139-144

Tsujii M, DuBois RN

Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2
Cell 1995; 83: 493-501

Tsujii M, Kawano S, DuBois RN

Cyclooxygenase 2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential.
Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 3336-3340

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E

Involvement of the Bcl-2 gene in human follicular lymphoma
Science 1985; 228: 1440-1443

Tygat GN, Hameeteman W

The neoplastic potential of columnar-lined (Barrett's) esophagus.
World J Surg 1992; 16: 308-12

Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H

Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer
Clin Cancer Res 2000; 6: 135-138

Vaux DL, Cory S, Adams JM

Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells
Nature 1988; 335: 440-442

Walch AK, Zitzelsberger HF, Bruch J, Keller G, Angermeier D, Aubele MM, Mueller J, Stein HJ, Braselmann H, Siewert JR, Höfler H, Werner M

Chromosomal imbalances in Barrett's adenocarcinoma and the metaplasie-dysplasie-carcinoma Sequence
Am J of Pathol 2000; 156: 555-565

Werner M, Mueller J, Walch A, Hofler H

The molecular pathology of Barrett's esophagus.
Histol Histopathol. 1999; 14: 553-9

Wied GL, Bartels PH, Rosenthal DL, Schenck U

Compendium on the Computerized Cytology and Histology Laboratory, Tutorials of Cytology: SAMBA: The cell image analyser for pathologists
International Academy of Cytology, Chicago, USA, 1994; 368-375

Wilson KT, Fu S, Ramanujam K, Meltzer SJ
Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's
esophagus and associated adenocarcinomas
Cancer Res 1998; 58: 2929-2934

Wittekind C, Sobin LH
UICC - TNM Klassifikation maligner Tumoren
Springer Verlag Berlin, 6. Auflage 2002

Yokoyama C, Tanabe T
Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary
structure of the enzyme.
Biochem Biophys Res Commun 1989; 165: 888-894

Yonemura Y, Ooyama S, Sugiyama K
Growth fraction in gastric carcinomas determined with with monoklonal antibody Ki-67
Cancer 1990; 65: 1130-4

Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA
Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma.
Cancer Res 1999; 59: 198-204

H TABELLENVERZEICHNIS

<u>Tabelle 1:</u> UICC/AJCC Stadieneinteilung des Adenokarzinoms des Ösophagus	12
<u>Tabelle 2:</u> Liste der verwendeten Primärantikörper	33

I ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: HE-Färbung Barrett-Metaplasie	6
Abbildung 2: HE-Färbung Dysplasie	8
Abbildung 3: HE-Färbung Adenokarzinom	9
Abbildung 4: Die Prostaglandin Biosynthese	15
Abbildung 5: Schemazeichnung der Apoptose	21
Abbildung 6: Schema der indirekten immunhistochemischen Methode mit Darstellung des Primär- und Sekundärantikörpers (nach Noll und Schaub-Kuhnen, 2000)	28
Abbildung 7: Schema der LSAB- Methode mit Darstellung von Primärantikörper, biotinyliertem Sekundärantikörper und Streptavidin-Enzymkomplex (nach Noll und Schaub-Kuhnen, 2000)	29
Abbildung 8: Auswertung eines Schnittpräparates mit dem Analysesystem SAMBA/ XTCOUNT	35
Abbildung 9: COX-2 Expression in der Dysplasie	38
Abbildung 10: Ki-67 und Bcl-2 Expression in der Dysplasie	38
Abbildung 11: Ki-67 und Bcl-2 Expression im Frühkarzinom	38
Abbildung 12: COX-2 Expression in der Sequenz	39
Abbildung 13: Ki-67 Expression in der Sequenz	40
Abbildung 14: Bcl 2 Expression in der Sequenz	41
Abbildung 15: Korrelation von COX 2 und Bcl 2 Expression im Barrettkarzinom	42
Abbildung 16: Korrelation von COX 2 und Ki-67 Expression im Barrettkarzinom	43
Abbildung 17: Korrelation von COX 2 und Lymphknotenmetastasierung	44
Abbildung 18: Überlebenskurven COX 2	45
Abbildung 19: Überlebenskurven Bcl 2	46
Abbildung 20: Überlebenskurven Ki-67	47

J ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACA	Advanced carcinoma
AEG	Adenocarcinoma of the Esophagogastric junction
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatous polyposis gen
Bcl-2	B-cell-leukemia/lymphoma protein 2
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre DNA
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
ECA	Early carcinoma
ECM	Esophageal columnar metaplasia
EGF	Wachstumsfaktor
Fa.	Firma
FAP	Familiäre adenomatöse Polypose
FGF	Fibrocyte Growth Factor
G1-Phase	Stadium der Interphase
G2-Phase	Stadium der Interphase
H.E.-Färbg.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGD	High grade dysplasia
kB	Kilobase
LGD	Low grade dysplasia
LOH	Loss of Heterozygosity (Verlust der Heterozygotie)
LSAB	Labeled (Strept-) Avidin-Biotin
Mib-1	Klon des Ki-67 Antikörpers
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
Nr.	Nummer
NSAID	Non steroidal anti inflammatory drugs
PG	Prostaglandine
sec.	Sekunde
S-Phase	Synthese-Phase
Std.	Stunde
TNF	Tumor necrosis factor
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WHO	World Health Organisation

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. J.R. Siewert und Herrn Prof. Dr. med. H.J. Stein danke ich für die Übernahme der Arbeit und deren Einreichung an der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. C. Möbius für die interessante Themenstellung, die ausgezeichnete Betreuung und die sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes. Ohne seine großartige Unterstützung und Motivation wäre die Durchführung dieser Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. med. H. Höfler möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München danken.

Für die kompetente wissenschaftliche Betreuung und intensive fachliche Unterstützung bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. med. I. Becker.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. med. M. Sarbia für die Hilfestellung bei der Auswahl des Bildmaterials.

Ich bedanke mich bei Herrn P. Gais (GSF) und Frau U. Jütting (GSF) für die Einarbeitung und die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ganz herzlich danken möchte ich Frau R. Hegenloh und Frau Dr. F. Wegener für die ausgesprochen präzise Einarbeitung und die praktischen Hilfestellungen.

Ein riesen Dankeschön geht an meine Familie und meine Freunde, die mit viel Verständnis, Geduld und mentaler Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben.

LEBENS LAUF

Name: Anne Catharina Spieß

Geburtsdatum: 17. Oktober 1978

Geburtsort: Bad Oeynhausen

Eltern: Hans Heinrich Spieß

Regine Spieß

Schulbildung: 1984 - 1988 Grundschule Domschule, Minden

1988 - 1997 Ratsgymnasium Minden

1994 Mentone Girls College, Melbourne, Australien

1997 Abitur am Ratsgymnasium Minden

Studium: 1997 - 2000 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke
Universität Magdeburg

2001 - 2004 Studium der Humanmedizin an der Technischen
Universität München

2003 – 2004 Praktisches Jahr

- Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts
der Isar, München

- Tulane University, New Orleans, U.S.A.

- Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums
rechts der Isar, München

Approbation: erteilt am 09. November 2004