

Die Expression von PAX9 im gesunden und
dysplastischen Epithel und in invasiven
Karzinomen des Ösophagus und der Cervix uteri –
eine immunhistochemische Studie

Marion Schöffel

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)

Die Expression von PAX9 im gesunden und dysplastischen Epithel und in invasiven Karzinomen des Ösophagus und der Cervix uteri – eine immunhistochemische Studie

Marion Schöffel

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. Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 23.01.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 22.07.2004 angenommen.

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	6
1. Einleitung und Zielsetzung	7
2. Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Gewebeproben	12
2.1.2 Charakterisierung des eingesetzten Antikörpers zur PAX9-Detektion	17
2.2 Die immunhistochemische Arbeitsmethode	18
2.2.1 Allgemeine Grundlagen der Immunhistochemie	18
2.2.2 Das Prinzip der Streptavidin-Biotin-Methode	19
2.2.3 Arbeitsprotokoll für PAX9-Färbungen	20
2.2.4 Verwendete Antikörper-Detektionssysteme	22
2.3 Vorgehensweise bei der Auswertung	22
3. Ergebnisse	23
3.1 Das Expressionsmuster von PAX9 im gesunden und dysplastischen Plattenepithel des Ösophagus und in invasiven Ösophaguskarzinomen	23
3.1.1 Die Expression von PAX9 im gesunden Plattenepithel	23
3.1.2 Die Expression von PAX9 bei benignen Läsionen des Ösophagusepithels am Beispiel der Basalzellhyperplasie	29
3.1.3 Die PAX9-Expression in präkanzerösen Läsionen des Ösophagus-Plattenepithels	31
3.1.4 Die Expression von PAX9 im invasiven Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	38
3.1.5 Die PAX9-Expression im Barrett-Ösophagus	47
3.1.6 Zusammenfassung: Die PAX9-Expression im gesunden und dysplastischen Ösophagusepithel und in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus	51
3.2 Das Expressionsmuster von PAX9 im gesunden und dysplastischen Plattenepithel der Cervix uteri und in invasiven Cervixkarzinomen	53
3.2.1 Das Expressionsmuster von PAX9 im normalen Plattenepithel der Cervix uteri	53
3.2.2 Das Expressionsmuster im dysplastischen Plattenepithel der Cervix uteri	58
3.2.3 Die Expression von PAX9 in Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri	62
3.2.4 Zusammenfassung: Die PAX9-Expression im gesunden und dysplastischen Epithel und in Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri	66
3.3 Vergleich der Expression von PAX9 im Ösophagus und in der Cervix uteri	68
4. Diskussion	69
4.1 Diskussion des Materials	69
4.2 Diskussion der Methodik	69
4.2.1 Das Spektrum der Untersuchungsmethoden zur Analyse genetischer Veränderungen und pathologischer Genexpression	70
4.2.2 Beispiele für den Einsatz der Immunhistochemie in Forschung und Routinediagnostik von Malignomen	70
4.2.3 Voraussetzungen für geeignete Antikörper	71
4.2.4 Problematik und Vorteile der Immunhistochemie	72
4.3 Diskussion der Ergebnisse	74
4.3.1 Die Expression von PAX9 im gesunden und dysplastischen Plattenepithel und in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und der Cervix uteri	74
4.3.2 PAX9 eignet sich nicht als plattenepithelialer Marker	76
4.4 Diskussion der Funktion von PAX9	77

5. Zusammenfassung	81
6. Literaturverzeichnis	83
7. Abbildungsverzeichnis	90
8. Tabellenverzeichnis	94
9. Anhang	95
9.1 Danksagung	95
9.2 Lebenslauf	95

Verwendete Abkürzungen:

cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary desoxyribonucleic acid)
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie (cervical intraepithelial neoplasia)
Cis	Carcinoma in situ der Cervix uteri
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
GSF	Gesellschaft für Strahlenforschung (München- Neuherberg)
IEN	intraepitheliale Neoplasie
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
UICC	Union International Contre le Cancer
WHO	World Health Organization

Grundsätzlich werden die international üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet.

1. Einleitung und Zielsetzung

Die bisher neun Mitglieder umfassende Familie der *Pax*-Gene ist Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte. Die Bezeichnung „*Pax*-Gene“ leitet sich von der sog. „paired box“ ab; hierbei handelt es sich um die Nukleotidsequenz einer hochkonservierten DNA-Bindungsdomäne (der sog. paired domain), die das gemeinsame Kennzeichen dieser Genfamilie darstellt (Treisman, 1991). Die *Pax*-Genprodukte fungieren als Transkriptionsfaktoren (Stapleton, 1993).

Neben der paired domain enthalten einige der *Pax*-Proteine zusätzlich spezifische Domänen, die als Oktapeptid und als Homeodomäne bezeichnet werden (Walther, 1991). Die *Pax*-Gene und ihre Genprodukte lassen sich somit in vier Gruppen einteilen (siehe Abb.1.1).

Pax1 und *Pax9* gehören der ersten Gruppe an, sie besitzen eine paired domain und die Oktapeptid-Sequenz (Strachan, 1994).

Die Mitglieder der jeweiligen Gruppen zeigen eine größtenteils identische Sequenz der paired box und ein ähnliches Expressionsmuster während der Embryogenese (Dahl, 1997).

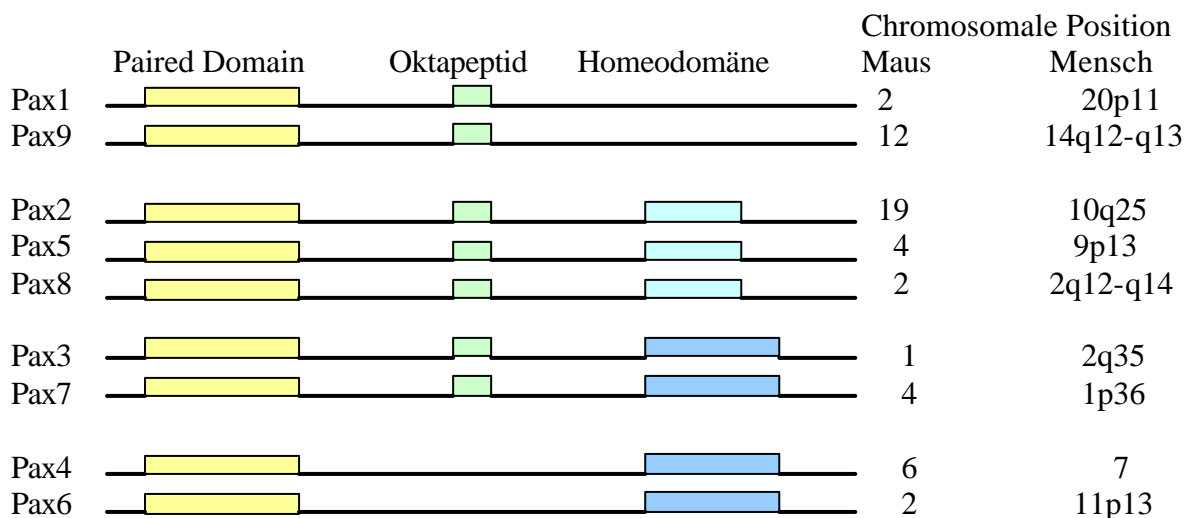


Abb. 1.1: Einteilung der PAX-Gene (nach Strachan, 1994)

Die vier Gruppen stammen von vier Vorläufergenen ab, die zunächst bei *Drosophila* charakterisiert wurden (Walther, 1991) und eine Untergruppe einer großen Klasse von Entwicklungskontrollgenen darstellen, den sog. *Hox*-Genen (Duboule, 1994).

Sowohl die paired domain als auch die Homeodomäne der *Pax*-Gene sind in der Lage, an zu transkribierende DNA-Abschnitte zu binden. Die Homeodomäne fungiert hierbei aber nicht unabhängig von der paired domain, sie kann erst an die DNA binden, wenn die paired domain

den Kontakt zum DNA-Phosphat-Gerüst hergestellt hat. Die Aufgabe der Homeodomäne könnte vielmehr in der Regulation der Ziel-Gen-Erkennung bestehen (Singh, 2000).

Weiterhin wurde gezeigt, dass das DNA-Bindungsverhalten der Homeodomäne von Pax6 von der paired domain beeinflusst wird. Bei strukturellen Veränderungen der paired domain bindet die Homeodomäne an andere DNA-Stellen (Singh, 2000).

Pax-Gene sind nicht nur imstande, die Transkription bestimmter DNA-Abschnitte einzuleiten, sie können sie auch unterdrücken. Deletionsanalysen bei *Pax2* zeigten zum Beispiel, dass die Transkription mit Hilfe des Oktapeptidmotivs negativ reguliert werden kann (Lechner, 1996).

Die *Pax*-Gene besitzen zwei wesentliche Funktionen: Während der Embryogenese spielen sie eine wichtige Rolle bei Differenzierungsprozessen im Rahmen der Organogenese (Underhill, 2000). In adulten eukaryoten Zellen tragen sie zur Kontrolle der Zellidentität bei, sie steuern Wachstum und Differenzierung sowie Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen und der extrazellulären Matrix (Pattin, 2000). Pax5 (BSAP) beispielsweise reguliert als B-Zell-Transkriptionsfaktor die Expression des B-Zell-Markers CD 19 (Kozmik, 1992). Pax8 aktiviert die Transkription von Thyreoglobulin und Thyreoperoxidase in der Schilddrüse (Mansouri, 1998).

Spezifische Mutationen der *Pax*-Gene führen in adulten Organismen zur Entstehung einer Vielzahl von Tumoren (Maulbecker, 1997). Weiterhin sind bestimmte Mutationen dieser Gene mit kongenitalen Fehlbildungssyndromen beim Menschen assoziiert (Underhill, 2000). *Pax*-Mutanten zeigen dabei meist eine Reduktion der Größe verschiedener Organe oder den Verlust eines bestimmten Organs (Dahl, 1997). Heterozygote *Pax*-Mutationen führen durch loss-of-function zu einem charakteristischen Phänotyp, bei der Maus resultieren Mutationen von *Pax1*, *Pax3* oder *Pax6* im Phänotyp „*undulated*“ (Chalepakakis, 1991), „*splotch*“ (Goulding, 1993) oder „*small eye*“ (Schmahl, 1993).

Beim Menschen existieren verwandte Syndrome. Eine Mutation von *PAX3* ist verantwortlich für das Waardenburg-Syndrom I mit sensorineuraler Schwerhörigkeit und Pigmentierungsstörungen; zugrunde liegt eine gestörte Melanozytenmigration aus der Neuralleiste (Tassabehji, 1992).

Eine Mutation von *PAX6* führt je nach Ausmaß der Deletion zu Aniridie (sog. Peters Anomalie) oder, wenn auch das *WT1*-Gen erfasst wird, zum WAGR-Syndrom (Wilms-Tumor, Aniridie, urogenitale Missbildungen, geistige Retardierung) (Jordan, 1992).

Bei heterozygoten frame-shift-Mutationen von *PAX2* findet sich eine Hypoplasie der Nieren oder als Maximalvariante das „renal coloboma syndrome“ mit einer Nierenhypoplasie und Kolobomen der Nn. optici (Sanyanusin, 1995).

Die Differenzierung der endokrin aktiven Zellen des Pankreas wird unter anderem von *PAX4* und *PAX6* gesteuert. In *Pax4*-knock-out-Mäusen bleibt die Bildung von β - und δ -Zellen im Pankreas aus (Sosa-Pineda, 1994), während die Langerhans-Inseln von *Pax6*-knock-out-Mäusen keine α -Zellen enthalten (St-Onge, 1997).

Heterozygote *Pax9*-defiziente Mäuse zeigen keine morphologischen Auffälligkeiten.

Bei Ausschaltung beider Allele resultiert jedoch ein charakteristischer Phänotyp. Die Mäuse sterben kurz nach der Geburt. Die Derivate der dritten und vierten Schlundtasche sind bei ihnen nicht angelegt, sie besitzen nur eine rudimentäre im Pharynx lokalisierte Thymusanlage, während Nebenschilddrüsen und Ultimobranchialkörper ganz fehlen. Weiterhin besitzen die *Pax9*-knock-out-Mäuse keine Zähne und weisen neben einer Spaltbildung im sekundären Gaumen eine Reihe von Skelettanomalitäten auf, wie z.B. überzählige Digitati und fehlende Muskelgruppen (Peters, 1998).

Für *PAX9* als jüngst-entdecktes Mitglied der PAX-Genfamilie wurden bereits Fälle nachgewiesener Genmutation beim Menschen veröffentlicht und das klinische Erscheinungsbild beschrieben. So wurde der Fall eines dreijährigen Jungen mit einer Deletion auf dem langen Arm des väterlichen Chromosoms 14 publiziert, die auch den *PAX9*-Genlokus erfasste. Das Kind war psychomotorisch retardiert und wies zahlreiche kraniofaziale Missbildungen auf, z.B. eine bilaterale Lippen-Gaumen-Spalte und bilaterale Kolobome des N. opticus, ferner lagen eine Balkenagenesie und ein Pes calcaneovarus vor. In den Laboruntersuchungen stieß man auf erhöhte TSH-Werte bei Hyperthyreose (Schuffenhauser, 1999). Weiterhin wurde eine Familie mit einer autosomal dominanten Oligodontie beschrieben. In dieser Familie kommt es zu einer frame-shift-Mutation, die auch die paired box von *PAX9* einbezieht. Den Betroffenen fehlen nach Entwicklung eines unauffälligen Milchgebisses die meisten permanenten Molaren (Stockton, 2000).

Ein Teil dieser phänotypischen Veränderungen bei *PAX*-Mutanten kann als Versagen der induktiven Mechanismen zwischen Epithel und Mesenchym aufgefasst werden. Bestimmte Organe wie Lungen, Nieren, Zähne oder Haare entwickeln sich aus einer ins Mesenchym

sprossenden Epithelknospe (Thesleff, 1995). Hierfür sind mesenchymal-epitheliale Interaktionen verantwortlich (Dahl, 1997).

Gain-of-function-Mutationen, die oft Folge einer chromosomalen Translokation sind, führen in erster Linie zu malignen Veränderungen (Gerber, 2002).

In bestimmten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen gerät *PAX5* als Folge einer Translokation [t(9;14) (p13;q23)] unter die Kontrolle des Immunglobulin-Schwerkettengens, was zu einer Überexpression von *PAX5* führt (Busslinger, 1996).

In alveolären Rhabdomyosarkomen findet sich häufig eine Translokation, die in der Entstehung von *PAX3*- oder *PAX7-FKHR*-Hybridgenen resultiert (Anderson, 1999). Der 5'Part von *PAX3* (2q35) kommt dadurch an das 3'Fragment des *FKHR*-Transkriptionsfaktor-Gens (13q14) zu liegen (Barr, 1993). An einem P19-Zellmodell wurde gezeigt, dass das *PAX3-FKHR*-Fusionsprotein die Transkription von *PDGFR α* aktivieren kann, wozu *PAX3* alleine nicht in der Lage ist (Epstein, 1998).

Weitere Beispiele sind die Beteiligung von *PAX2* und *PAX8* an der Entstehung von Wilms-Tumoren (Poleev, 1992), von *PAX5* an der Entstehung von Hirntumoren (Kozmik, 1995) oder *PAX6* bei Karzinomen des Kolons und der Blase (Salem, 2000).

Anhand verschiedener *in vitro*-Modelle wurde belegt, dass *PAX*-Gene bei Überexpression oder Mutation zu Tumorwachstum und maligner Entartung beitragen können.

In einer *in vitro*-Studie wurden Zellkulturen untersucht, in denen verschiedene *Pax*-Gene der Maus (*Pax1*, *Pax2*, *Pax3*, *Pax6* und *Pax8*) unter der Kontrolle des CMV-Promotor/Enhancers überexprimiert wurden. Als direkter Effekt der erhöhten Konzentrationen an Pax-Proteinen in diesen Zelllinien resultierte eine Zellproliferation mit verminderter oder aufgehobener Kontaktinhibition (Maulbecker, 1992).

Ferner wurden *in vivo*-Experimente an jungen Nacktmäusen durchgeführt. Nach Injektion von Zellen, die *Pax1*, *Pax2*, *Pax3*, *Pax6* und *Pax8* überexprimierten, konnte nach einer Latenz von zwei bis sechs Wochen die Entstehung Pax-Protein-induzierter solider Tumoren beobachtet werden. Diese Tumoren ähnelten Spindelzellsarkomen und wiesen invasive und infiltrative Eigenschaften auf (Maulbecker, 1992).

Die Fähigkeit von *PAX2*, *PAX5* und *PAX8*, direkt an das *p53*-Tumorsuppressorgen zu binden und dadurch die *p53*-Expression zu unterdrücken, könnte bei diesem Transformationsprozess

eine Rolle spielen. Der *p53*-Promotor (im ersten Exon von *p53*) besitzt eine spezifische PAX-Protein-Bindungsstelle (Stuart, 1995). Auch für PAX1 konnte eine – allerdings vergleichsweise schwache – Affinität zu *p53* nachgewiesen werden (Stuart, 1995).

Dagegen wurde eine Über- oder Unterexpression von *PAX9* bei malignen Tumoren bislang nicht untersucht.

Bei den ersten systematischen Untersuchungen der Lokalisation von *Pax9* in der Maus zeigte sich, dass das Gen unter anderem im mehrschichtigen Plattenepithel des Ösophagus exprimiert wird (Neubüser, 1995). In einer späteren Studie wurde auch der menschliche Ösophagus als Expressionsort von *PAX9* beschrieben (Peters, 1997). Das Expressionsmuster von *PAX9* im Epithel wurde dagegen noch nicht untersucht. Mit der Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen *PAX9* ist nun unter Einsatz der Immunhistochemie eine Analyse des Expressionsmusters möglich.

Mehrschichtiges unverhornendes Plattenepithel als häufiger Ursprungsort von Plattenepithelkarzinomen findet sich beim Menschen im oberen Gastrointestinaltrakt und in der Cervix uteri. In der vorliegenden Arbeit wurde die *PAX9*-Expression daher hauptsächlich im gesunden Epithel sowie in präneoplastischen und neoplastischen Veränderungen des Ösophagus und der Cervix uteri immunhistochemisch untersucht.

Folgende Fragen sollen in dieser Arbeit beantwortet werden:

- Welche Zellen im gesunden Ösophagus- und Cervixepithel sind positiv für *PAX9*?
- Wie verändert sich die *PAX9*-Expression während der Differenzierung der Epithelzellen von basal nach luminal im gesunden Plattenepithel?
- Kann ein Zusammenhang zwischen der Differenzierung und der *PAX9*-Expression festgestellt werden?
- Wie verhält sich die Expression in benignen Läsionen am Beispiel der hyperplastischen Basalzellen?
- Wie wird *PAX9* in dysplastischen Veränderungen des ösophagealen Epithels und in zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) exprimiert?
- Welche Expressionsmuster finden sich in malignen invasiven Ösophagus- und Cervixkarzinomen? (Untersucht wurden neben Plattenepithelkarzinomen auch einige Adenokarzinome des Ösophagus.)

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewebeproben

Untersucht wurden Präparate von menschlichen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und der Cervix uteri sowie Adenokarzinome des Ösophagus, ferner präneoplastische Läsionen und morphologisch unauffälliges Plattenepithel gleicher Lokalisationen.

Das untersuchte Material stammt von Patienten des Klinikums rechts der Isar, München und wurde im Zeitraum von 1995 bis 1999 auf endoskopischem oder operativem Wege entnommen. Nach der Fixierung in vierprozentiger gepufferter wässriger Formaldehydlösung (pH 7,0) wurden die Proben in Paraffin eingebettet.

2.1.1.1 Vorbemerkungen zur histologischen Klassifikation der präneoplastischen und malignen Läsionen

Präneoplastische Läsionen des Plattenepithels werden als Dysplasie bezeichnet.

In dysplastischen Arealen sind Proliferation und Differenzierung der Zellen entkoppelt; als Konsequenz finden sich Mitosen auch oberhalb der Basalzellschicht (Crissman, 1993). Gemäß der internationalen histologischen Tumor-Klassifikation der WHO weist eine plattenepitheliale Dysplasie unter anderem folgende Kennzeichen auf: Die Zellkerne sind vergrößert, zeigen eine Hyperchromasie und verstärkte mitotische Aktivität (Watanabe, 1990). Bei einer leichtgradigen Dysplasie finden sich diese atypischen Zellen nur in der Basalzone, während zur Epitheloberfläche hin eine zytoplasmatische und nukleäre Ausreifung stattfindet. Mit zunehmendem Schweregrad der Dysplasie nimmt der Anteil atypischer Zellen zu und das Ausmaß der Ausreifung ab. Bei einer mäßiggradigen Dysplasie reicht die atypische Proliferationszone bis zur unteren Hälfte des Epithels. Die schwere Dysplasie (oder Carcinoma in situ) des Plattenepithels umfasst mindestens 75% der Epitheldicke.

Eine weitere Studiengruppe unterteilte die verschiedenen Dysplasiegrade folgendermaßen (Dawsey, 1994): Bei einer geringgradigen Dysplasie sind Zellatypien auf das untere Epitheldrittel begrenzt und bei einer mäßiggradigen Dysplasie auf die unteren zwei Drittel des Epithels. Die Begriffe hochgradige Dysplasie und Carcinoma in situ werden zusammengefasst

und bezeichnen eine Läsion, bei der das Epithel in seiner ganzen Breite atypische Zellen aufweist.

Zur Vereinheitlichung dieser verschiedenen Definitionen schlug die WHO-Arbeitsgruppe 2000 den Begriff der „intraepithelialen Neoplasie (IEN)“ vor, wobei zwischen low-grade und high-grade intraepithelialer Neoplasie differenziert wird (Hamilton, 2000). Die Bezeichnung low-grade IEN umfasst die leichtgradige und mäßiggradige Dysplasie. Die hochgradige Dysplasie und das Carcinoma in situ werden zur high-grade IEN zusammengefasst. Somit beschreibt der Begriff der IEN präinvasive neoplastische Veränderungen des Epithels, wobei reaktive oder regenerative Veränderungen nicht eingeschlossen werden (Hamilton, 2000).

Die Definition und Unterteilung der Dysplasiegrade gilt auch für die präneoplastischen Läsionen des Plattenepithels der Cervix uteri (zervikale intraepitheliale Neoplasie = CIN).

Die Begriffe schwere Dysplasie und Carcinoma in situ werden hier ebenfalls zusammengefasst und gemeinsam als CIN III bezeichnet (Tavassoli, 2002).

Da in der vorliegenden Arbeit sowohl Material des Ösophagus als auch der Cervix uteri untersucht wurden, wird zur besseren Vergleichbarkeit und dem Vorschlag der WHO (Hamilton, 2000) entsprechend im folgenden das Carcinoma in situ des ösophagealen Plattenepithels mit der Gruppe der schweren Epitheldysplasie zusammengefasst.

Auch für die invasiven Karzinome existieren Klassifikationssysteme.

Für die Beschreibung der anatomischen Ausdehnung eines Karzinoms schlug die UICC (Union International Contre le Cancer) 1987 das TNM-System vor (Wittekind, 1987). Neben der Größe und Ausdehnung eines Tumors werden hier auch der Befall der regionalen Lymphknoten und der Nachweis von Fernmetastasen berücksichtigt. In der vorliegenden Arbeit wurde die 5. Auflage 1997 berücksichtigt (Wittekind, 1997a).

Mit dem sog. „*Grading*“ wird der Differenzierungsgrad des malignen Gewebes erfasst. Hier wird festgestellt, in welchem Ausmaß die Karzinomzellen noch morphologische Ähnlichkeit mit nichtneoplastischen Plattenepithelzellen besitzen. Je weniger differenziert die malignen Zellen sind, umso ausgeprägter weisen sie pleomorphe Züge auf, ferner nimmt das Ausmaß der Verhornung ab.

Ein guter Differenzierungsgrad entspricht einem relativ niedrigen Malignitätsgrad und wird als G1 bezeichnet. G2 bedeutet, dass der Tumor einen mäßigen Differenzierungs- bzw.

mittleren Malignitätsgrad aufweist. Ein schlecht differenzierter Tumor trägt die Bezeichnung G3 und besitzt einen hohen Malignitätsgrad. Tumoren ohne jede Differenzierung werden als undifferenzierte Tumoren (G4) bezeichnet. In den meisten Fällen existieren innerhalb eines Karzinoms uneinheitliche Differenzierungsgrade, die Benennung richtet sich nach dem am wenigsten ausgereiften Anteil (Broders, 1932).

2.1.1.2 Untersuchtes Material des Ösophagus

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von *PAX9* in insgesamt 52 gesunden und 45 dysplastischen Plattenepithelarealen und in 44 invasiven Karzinomen des Ösophagus untersucht. Weiterhin wurden 15 Fälle einer sog. Basalzellhyperplasie, einer benignen Epithelveränderung, untersucht. Die mitotisch aktiven basalen Epithelzellen können mit einer verstärkten Proliferationsaktivität auf eine chronische entzündliche Irritation der Mucosa reagieren. Wenn die Zone der Basalzellen mehr als 15% der Epitheldicke beträgt, spricht man von einer Basalzellhyperplasie (Hamilton, 2000). Diese Veränderung ist beispielsweise bei Patienten mit gastroösophagealer Refluxkrankheit anzutreffen (Ismail-Beigi, 1970).

Die Basalzellhyperplasie entsteht als Reaktion auf einen chronischen Entzündungsreiz der Ösophagusschleimhaut. Durch die verstärkte mitotische Aktivität in der basalen Zellschicht soll der erhöhte Zellumsatz gedeckt werden (Haggit, 2000).

Obwohl es sich per definitionem um eine benigne Läsion handelt, ist dieser Befund regelmäßig bei der Untersuchung von Hochrisikogruppen für das invasive Ösophaguskarzinom zu erheben (Hamilton, 2000).

An präneoplastischen Läsionen wurden 45 Areale mit dysplastischem Plattenepithel untersucht. Anhand des zytomorphologischen Erscheinungsbildes wurden diese Areale verschiedenen Schweregraden zugeordnet (Abb. 2.1.): Zwölf Läsionen entsprachen einer leichtgradigen Dysplasie, neun einer mäßiggradigen Dysplasie und 24 Fälle einer schweren Dysplasie (vgl. Abb 2.1).

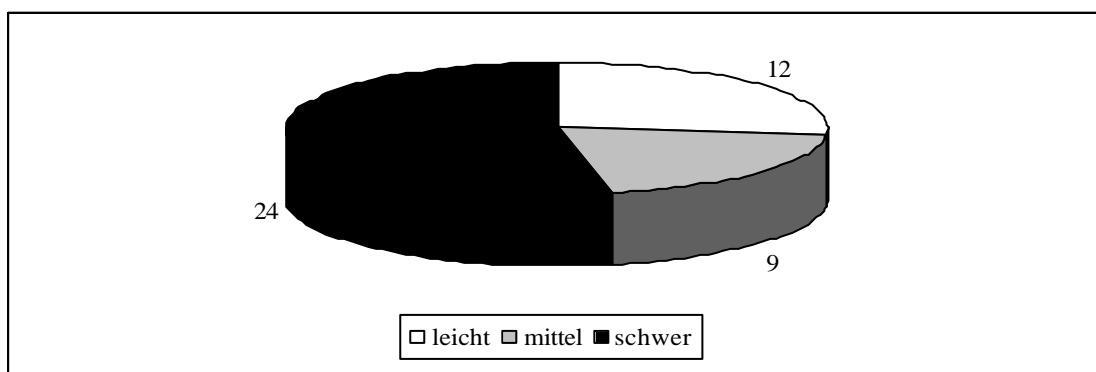


Abb.2.1: Dysplasiegrad der untersuchten präneoplastischen Läsionen des Ösophagus

Insgesamt 44 invasive Plattenepithelkarzinome des Ösophagus (43 OP-Präparate, eine Biopsieprobe) wurden auf die PAX9-Expression untersucht. Die TNM-Stadien und der Malignitätsgrad lassen sich aus Tabelle 2.1 entnehmen.

<u>Tumorstadium:</u>	T1	T2	T3	T4
n	13	8	20	2
<u>Lymphknotenstatus:</u>	N0	N1	Nx	
n	21	21	1	
<u>Malignitätsgrad:</u>	G1	G2	G3	
n	1	13	30	

Tab. 2.1.: TNM-Stadium und Malignitätsgrad der untersuchten Plattenepithelkarzinome des Ösophagus

Neben den plattenepithelialen Karzinomen und Präkanzerosen wurden auch Veränderungen des ösophagealen Zylinderepithels im Sinne einer Barrett-Metaplasie (ohne Dysplasie, neun Fälle), einer Barrett-Dysplasie (neun Fälle) sowie 14 invasive Barrett-Adenokarzinome untersucht. Bei der so genannten Barrett-Metaplasie findet aufgrund chronisch-entzündlicher Prozesse ein allmählicher Umbau des Plattenepithels in einschichtiges intestinales Zylinderepithel statt. Der weitere Weg läuft über dysplastische Läsionen bis hin zum invasiven Adenokarzinom des Ösophagus, dem so genannten Barrett-Karzinom.

Malignitätsgrad und Tumorstadium der 14 Adenokarzinome sind in Tabelle 2.2 dargestellt. Da bei drei Adenokarzinomen nur eine Probebiopsie entnommen worden war, konnte das Tumorstadium nur in elf Fällen bestimmt werden.

<u>Tumorstadium:</u>	T1	T2	T3	T4
n	6	3	2	0
<u>Lymphknotenstatus:</u>	N0	N1	Nx	
n	7	3	1	
<u>Malignitätsgrad:</u>	G1	G2	G3	
n	1	9	4	

Tab. 2.2: TNM-Stadium und Malignitätsgrad der untersuchten Adenokarzinome des Ösophagus

2.1.1.3 Untersuchtes Material der Cervix uteri

In 29 Schnittpräparaten mit unauffälligem Plattenepithel wurde die PAX9-Expression immunhistochemisch untersucht. An präneoplastischen plattenepithelialen Läsionen fanden sich vier Fälle einer leichten zervikalen epithelialen Dysplasie (CIN I), sieben Fälle einer mittelgradigen Dysplasie (CIN II) sowie 20 Fälle einer schweren Dysplasie (CIN III/ Cis), (siehe Abb. 2.2).

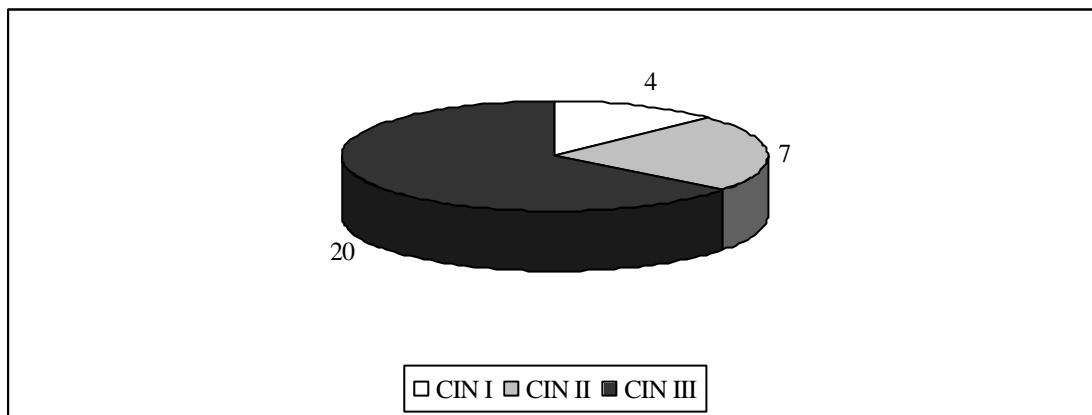


Abb. 2.2: Dysplasiegrad der untersuchten präneoplastischen Läsionen der Cervix uteri

Insgesamt wurden elf Plattenepithelkarzinome ausgewertet, die im Rahmen einer Hysterektomie oder einer Konisation entnommen wurden.

Tumorstadium und Malignitätsgrad der untersuchten Cervixkarzinome sind in Tab. 2.3 zusammengefasst.

<u>Tumorstadium:</u>	T1	T2	T3	T4
n	10	1	0	0
<u>Lymphknotenstatus:</u>	N0	N1	Nx	
n	6	1	4	
<u>Malignitätsgrad:</u>	G1	G2	G3	
n	0	4	7	

Tab. 2.3: TNM-Stadium und Malignitätsgrad der untersuchten Cervixkarzinome

2.1.2 Charakterisierung des eingesetzten Antikörpers zur PAX9-Detektion

Der eingesetzte monoklonale Antikörper zur PAX9-Detektion wurde in Kooperation mit dem Institut für Säugetiergenetik der GSF München entwickelt (Gerber, 2002). Zunächst wurde ein Fusionsprotein konstruiert, das sich aus dem Maltose-binding protein und den 80 Carboxy-terminalen Aminosäuren von murinem Pax9 zusammensetzt (MBP-Pax9) (Peters, 1998). Um vollständiges Pax9 mit einem C-terminalen Histidin-Tag (6x His) zu exprimieren, wurde die *Pax9* cDNA mittels PCR vervielfältigt und in das Plasmid pVL1392 (Pharmlingen) eingefügt. Die Codons für das Histidin-Tag wurden anhand von PCR-Primern erstellt. Eine DNA-Sequenzanalyse bestätigte die Integrität der entstandenen Plasmide. Das rekombinante Pax9-Protein mit dem Histidin-Tag wurde in Sf9-Zellen exprimiert (Invitrogen) und aufgereinigt (Gerber, 1997). Anschließend wurden 50 µg des gereinigten MBP-Pax9-Fusionsproteins in PBS aufgelöst und mit Freund's Adjuvant versetzt. Die Lösung wurde Lou/C-Ratten sowohl intraperitoneal als auch subkutan verabreicht. Nach Ablauf von vier Wochen wurde den Ratten ein abschließender Boost von 50 µg des Proteins ohne Adjuvant verabreicht. Nun erfolgte die Fusion von Immunzellen aus der Rattenmilz mit der Myelomzell-Linie P3X63-Ag8.653 zu Hybridomzellen (Kremmer, 1995). Die produzierten monoklonalen Antikörper wurden in einem Immunoassay mit an Mikrotiterplatten gebundenem His-Tag-Pax9-Protein getestet (Gerber, 2002).

Einer der auf diese Weise gewonnenen monoklonalen Antikörper, P9C23, band in Western-blot-Untersuchungen von Proteinextrakten aus Mäusen und menschlichem Ösophagusgewebe an ein 38 kDa-Protein. Dieses Molekulargewicht stimmt mit dem geschätzten Molekulargewicht des murinen und menschlichen Pax9-Proteins überein (Peters, 1998).

Um zu zeigen, dass P9C23 spezifisch mit Pax9 reagiert, wurden Ösophagusproben von Wildtyp- und *Pax9*^{-/-}-Mäuseembryonen untersucht. Hier konnte eine Reaktion im Ösophagusepithel der Wildtypmäuse beobachtet werden, während P9C23 mit keinem Epitop der *Pax9*-Mutanten reagierte. Untersuchungen an der embryonalen Wirbelsäule erbrachten dasselbe Ergebnis. Dadurch konnte eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit Pax1 ausgeschlossen werden (Gerber, 2002). Pax1 ist eng verwandt mit Pax9 und wird in der embryonalen Wirbelsäule stark exprimiert (Neubüser, 1995).

Pax9-spezifische monoklonale Antikörper sind somit gegen den C-Terminus des murinen Pax9-Proteins gerichtet und reagieren auch mit dem humanen Protein.

2.2 Die immunhistochemische Arbeitsmethode

2.2.1 Allgemeine Grundlagen der Immunhistochemie

Das Grundprinzip der Immunhistochemie besteht darin, die spezifische Antikörperbindung eines im Gewebe vorliegenden Antigens zu nutzen, um dieses gesuchte Antigen nachzuweisen. Sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper können zu diesem Zweck eingesetzt werden, wobei insbesondere monoklonale Antikörper mit sehr hoher Spezifität entwickelt wurden (Wittekind, 1997b).

Der gegen das gesuchte Antigen gerichtete Primär-Antikörper kann wiederum als Antigen für einen oder mehrere Brücken-Antikörper dienen, da Immunglobuline gute Immunogene sind (Richards, 1981). Zur Darstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion werden neben Fluoreszenz-Markierungen hauptsächlich enzymatische Methoden eingesetzt. Hier finden bevorzugt die Enzyme Meerrettich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase Verwendung. Es entsteht ein stabiles, unlösliches Reaktionsprodukt, das im Lichtmikroskop erkannt werden kann (Swanson, 1988).

Die Anwendung immunhistochemischer Arbeitstechniken ermöglicht einerseits den Nachweis eines gesuchten Proteins, gleichzeitig kann die Morphologie des feingeweblichen Verbundes, in dem das Antigen lokalisiert ist, dargestellt werden (Wittekind, 1997b).

Die wesentliche Voraussetzung für die Bindung des Antikörpers im Gewebe ist, dass das Antigen durch die Gewebeaufbereitung nicht zerstört wird. Durch die Einwirkung fixierender Aldehyde können Antigene sowohl einer Spaltung als auch einer Quervernetzung unterliegen. Ferner kann eine Denaturierung der Proteine eine Konformationsänderung herbeiführen, so dass die Affinität des Antikörpers zum Antigen nicht mehr gewährleistet ist (Swanson, 1988). Manche Epitope werden durch diese Prozesse irreversibel zerstört, andere werden nur „maskiert“ und können eventuell durch eine geeignete Vorbehandlung wieder freigelegt werden (Miettinen, 1990). Deshalb kann vor der Zugabe des Antikörpers eine Aufbereitung durch Antigen-Demaskierung notwendig sein. Eine Möglichkeit hierzu besteht in einer proteolytischen Vorbehandlung, wodurch die Formalin-bedingten Quervernetzungen wieder gespalten werden und auch die Permeabilität der Zellen für Antikörper zunimmt. Allerdings führt diese Protease-Methode nicht immer zum Erfolg, manche Antigene werden durch die Andauung sogar zerstört (Ordonez, 1987). Als weitere Alternative kann eine Hitzebehandlung der in Pufferlösung aufbewahrten Schnittpräparate in der Mikrowelle oder im Dampfkochtopf

erfolgen (Gown, 1993). Die besten Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit mit der Demaskierung der Antigene im Dampfkochtopf erzielt.

2.2.2 Das Prinzip der Streptavidin-Biotin-Methode

Zur Darstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion muss das Enzym, das den Farbstoff bildet, an den Brücken-Antikörper gebunden werden. In der vorliegenden Arbeit wurde alkalische Phosphatase zur Farbstoffentwicklung eingesetzt. Das leuchtendrote Reaktionsprodukt ist sehr gut im Lichtmikroskop zu erkennen. Zur Kopplung des Enzyms an den Antigen-Antikörper-Komplex werden Biotin und Avidin bzw. Streptavidin eingesetzt.

Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin (Vitamin H) von niedrigem Molekulargewicht (244 dal) und lässt sich aus Hühnereiweiß isolieren. Über eine Carboxylgruppe kann es mit NH₂-Resten verschiedener Proteine reagieren. Physiologisch stellt es unter anderem einen Kofaktor für bestimmte Carboxylasen dar (Coggi, 1986). Größere Mengen an endogenem Biotin finden sich beispielsweise in der Niere, in der Leber oder im Gehirn (Wang, H. 1999). Aufgrund ihrer geringen Größe können mehrere Biotin-Moleküle an Proteine, z.B. Immunglobuline oder Enzym-Moleküle, gebunden werden, ohne die Antigenbindung bzw. die Enzymaktivität zu beeinflussen (Swanson, 1988). Zur immunhistochemischen Anfärbung liegen biotinylierte Brücken-Antikörper und biotinylierte Enzymmoleküle vor. Die Bindung zwischen zwei Biotin-Molekülen erfolgt durch Avidin bzw. Streptavidin, wodurch das biotinylierte Enzym an den biotinylierten Brücken-Antikörper gekoppelt wird (Hsu, 1981).

Das basische Glykoprotein Avidin wird aus Hühnereiweiß gewonnen. Es setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, von denen jede eine hydrophobe Nische zur nicht-kovalenten Bindung von Biotin aufweist. Somit kann jedes Avidin-Molekül vier Biotin-Moleküle binden (Coggi, 1986). Der Einsatz von Avidin birgt einige Nachteile: Aufgrund ihrer Größe sind die Avidin-Biotin-Komplexe schlecht gewebebegängig, und es besteht die Gefahr unspezifischer Präzipitationen (Sternberger, 1986). Ferner neigt der Glykoproteinanteil von Avidin zu unspezifischen Interaktionen mit Zellmembranen und Nukleinsäuren (Green, 1975).

Bei der Weiterentwicklung dieser Methode wird deshalb statt Avidin das sog. Streptavidin eingesetzt. Streptavidin ist ein Biotin-bindendes Protein, das von *Streptomyces avidinii* produziert wird. Auch hier liegen vier Untereinheiten und somit vier Biotin-Bindungsstellen vor. Da es im Gegensatz zum Avidin keine Oligosaccharid-Reste aufweist, neigt es weniger zu unspezifischen Bindungen (Swanson, 1988).

Das Prinzip der Streptavidin-Biotin-Methode ist in Abb. 2.3 dargestellt.

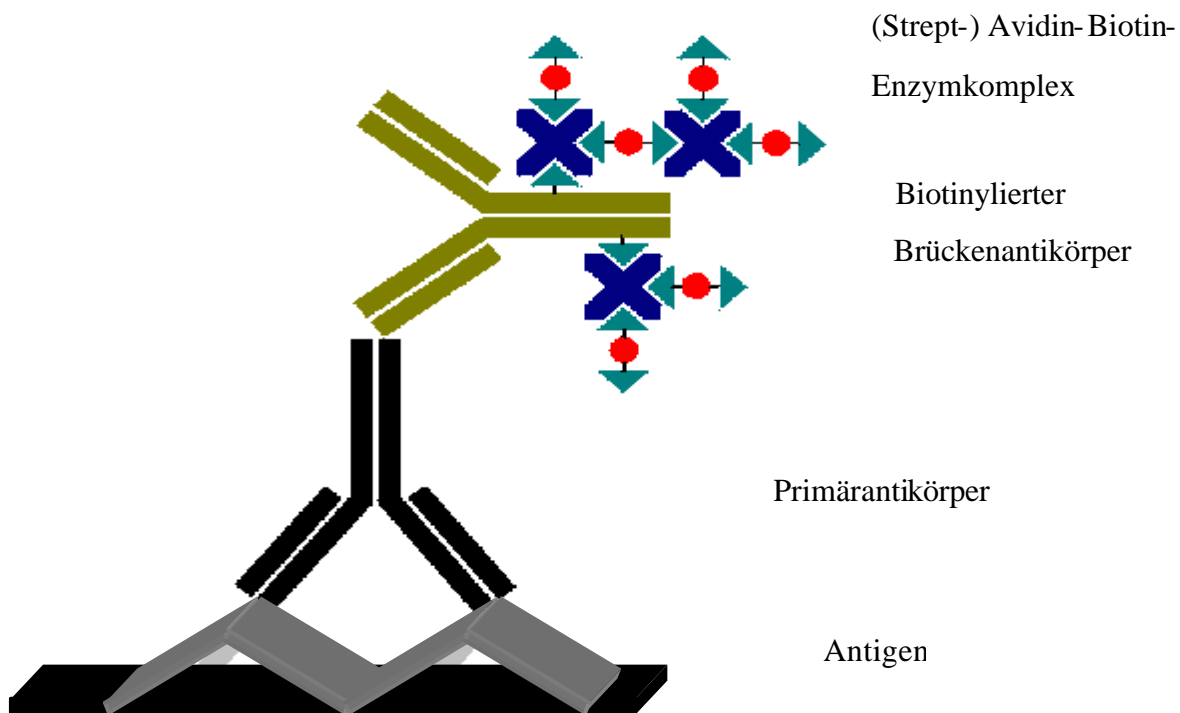


Abb. 2.3: Darstellung der Streptavidin-Biotin-Methode: Der Primärantikörper (aus der Ratte) richtet sich gegen das Antigen (z.B. PAX9). Ein biotinylierter Brückenantikörper gegen Ratte-Immunglobulin bindet an den Primärantikörper. Bei Zugabe des Streptavidin-Biotin-Enzymkomplexes bindet Streptavidin an die Biotin-Moleküle des Brückenantikörpers. Nach Zusatz des Enzymsubstrats entsteht ein Farbstoffniederschlag, wodurch das Antigen im Lichtmikroskop lokalisiert werden kann.

2.2.3 Arbeitsprotokoll für PAX9-Färbungen

Die Gewebeblöcke wurden zunächst bei 0°C gekühlt, dann wurden mit dem Mikrotom 2-3µm dicke Schnittpräparate gefertigt und mit PolyL-Lysin-Pritt-Bastelkleber auf Superfrost-Objektträger aufgeklebt und anschließend luftgetrocknet.

Die Wahl eines geeigneten Objektträgers erwies sich als essentiell, da sich die Schnittpräparate ansonsten während des Kochvorgangs (s. u.) ablösten. Dagegen zeigte sich, dass auf das Aufkleben verzichtet werden kann.

Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden die Schnittpräparate zunächst entparaffiniert. Nachdem sie für 2x 10 Minuten in Xylol inkubiert wurden, erfolgte die Rehydrierung über eine absteigende Ethanolreihe (100% = Isopropanol, 96% und 70% Ethanol).

Da durch die Fixierung in Formalin Quervernetzungen zwischen den verschiedenen Gewebeantigenen entstehen, wurde das Antigen retrieval durch Kochen im Dampfkochtopf durchgeführt. Die Schnittpräparate wurden für 4 bis 5 Minuten in sprudelndem Citratpuffer (pH 6,0) im Dampfkochtopf gekocht.

Vor der Applikation der verschiedenen Antikörper musste für eine halbe Stunde mit 4%igem Magermilchpulver in TRIS-Puffer geblockt werden, um eine Hintergrundfärbung durch unspezifische Bindungen zu reduzieren. Auch die verschiedenen Antikörper-Verdünnungen enthielten 2%iges Magermilchpulver. Der verwendete Primär-Antikörper (Pax9, Ak23) wurde in Antibody-diluent (Antikörperverdunnungsmedium, DAKO Nr. S 2022) 1: 10 verdünnt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnittpräparate sorgfältig mit TRIS-Puffer gespült. Danach erfolgte die dreißigminütige Inkubation mit einem Anti-Ratten-Antikörper aus der Spezies Maus (Firma Immunotech, Marseille, Frankreich, Nr. 0140). Nach erneutem Waschen in TRIS-Puffer (3x fünf Minuten) wurde der gebrauchsfertige biotinylierte anti-mouse-link-Antikörper aus dem DAKO-Streptavidin-Kit (Nr. K 5005) für 30 Minuten aufgetragen. Nach einem erneuten Spülvorgang mit TRIS-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Komplex aus dem DAKO-Kit für wiederum 30 Minuten. Zur Farbentwicklung wurde das Chromogen Neufuchsin (Fast Red von DAKO) eingesetzt, das innerhalb von 18 bis 20 Minuten einen leuchtend roten unlöslichen Farbkomplex bildet. Die Reagenzien enthalten unter anderem Levamisole, das zur Unterdrückung der endogenen Phosphatase-Aktivität zugesetzt wird. Anschließend wurde unter fließendem Leitungswasser sorgfältig gespült. Zur Kerngegenfärbung diente Hämalaun. Nach der Dehydrierung in einer aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96% Ethanol, Isopropanol) wurden die Schnittpräparate im Xylolbad inkubiert und anschließend blasenfrei mit Pertex eingedeckt.

Im September 1999 ergab sich eine kleine Änderung dieses Färbeprotokolls, da als neuer Zwischenantikörper ein biotinylierter anti-rat-Antikörper aus der Maus (Firma DAKO) eingesetzt wurde. Dieser Antikörper ersetzte die Inkubation mit dem anti-rat-Antikörper und dem biotinylierten anti-mouse-link-Antikörper, führte also zu einer Zeitersparnis von einer halben Stunde und vereinfachte die Antikörper-Schichtung. Er wurde in der Verdünnung 1:100 für dreißig Minuten aufgetragen, da sich in der Austestung die Verdünnungen 1:300 und 1:200 als zu schwach erwiesen.

2.2.4 Verwendete Antikörper-Detektionssysteme

Zur Darstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion diente die indirekte Streptavidin-Biotin-Methode. Im Einzelnen wurden folgende Reagenzien verwendet (DAKO-Kit K 5005, DAKO, Hamburg):

- DAKO ChemMate Detektionskit Alkalische Phosphatase/ RED, Kaninchen/Maus
- Biotinylierter Sekundärantikörper (aus der Ziege), der gleichermaßen mit Kaninchen- und Maus-Immunglobulinen reagiert; in Pufferlösung mit Trägerprotein und Natriumazid
- Das alkalische Phosphatase-konjugierte Streptavidin wird hergestellt aus Streptavidin, das aus *Streptomyces avidinii* isoliert wurde, sowie aus alkalischer Phosphatase aus Kälberdarmmucosa. Die Konjugation erfolgt durch eine verfeinerte Zweistufen-Glutaraldehyd-Methode. Das Streptavidin-Konjugat befindet sich in Pufferlösung mit Trägerprotein, Stabilisatoren und Natriumazid
- Chromogen-Substrat: Neufuchsin liefert ein unlösliches rotes Reaktionsprodukt an der Stelle des Antigens (drei Flaschen mit Chromogen 1,2 und 3 sowie AP-Substrat-Puffer)
- Levamisole zur Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase-Aktivität

2.3 Vorgehensweise bei der Auswertung

Im gesunden unverhornten Plattenepithel des Ösophagus sowie auch in anderen Lokalisationen im Mund-Rachen-Larynx-Bereich und in der Cervix uteri zeigt PAX9 ein spezifisches Expressionsmuster.

Im gesunden und dysplastischen Epithel sowie im invasiven Karzinom wurde der Anteil PAX9-positiver Zellkerne ermittelt. Weiterhin wurde untersucht, inwieweit sich der prozentuale Anteil PAX9-positiver Zellen mit fortschreitendem Atypiegrad verändert. Einige Gewebeproben wiesen lediglich eine leichte zytoplasmatische Reaktion auf. Da PAX9 als Transkriptionsfaktor nukleär lokalisiert ist und keine Daten zur zellulären Regulation von PAX9 vorliegen, wurden Fälle mit zytoplasmatischer Anfärbung als negativ gewertet. Fanden sich auf einem Schnittpräparat mehrere Areale unterschiedlichen Dysplasie- bzw. Malignitätsgrades, so wurden diese Areale unabhängig voneinander in der Auswertung erfasst.

3. Ergebnisse

3.1 Das Expressionsmuster von PAX9 im gesunden und dysplastischen Plattenepithel des Ösophagus und in invasiven Ösophaguskarzinomen

3.1.1 Die Expression von PAX9 im gesunden Plattenepithel

Im nichtverhornenden mehrschichtigen Plattenepithel im menschlichen Ösophagus lassen sich drei wesentliche Schichten erkennen (vgl. Abb. 3.1): Direkt im Anschluss an die Basalmembran befinden sich die Basalzellen, bei denen es sich um weitgehend undifferenzierte und mitotisch aktive Stammzellen handelt. Diese unterliegen einer Differenzierungs-assoziierten Migration ins Stratum spinosum (Stachelzellschicht). Die Stachelzellen stehen miteinander über zahlreiche Zytoplasma-Ausstülpungen mit Desmosomen in Verbindung und transformieren zu abgeflachten Superfizialzellen. Diese ausdifferenzierten Keratinozyten bestehen hauptsächlich aus Tonofilamenten. Die Zellorganelle sind zu basophilen granulären Strukturen verklumpt, eine Verhornung findet aber im Gegensatz zum Ösophagus der Nagetiere nicht statt (Karam, 1999).

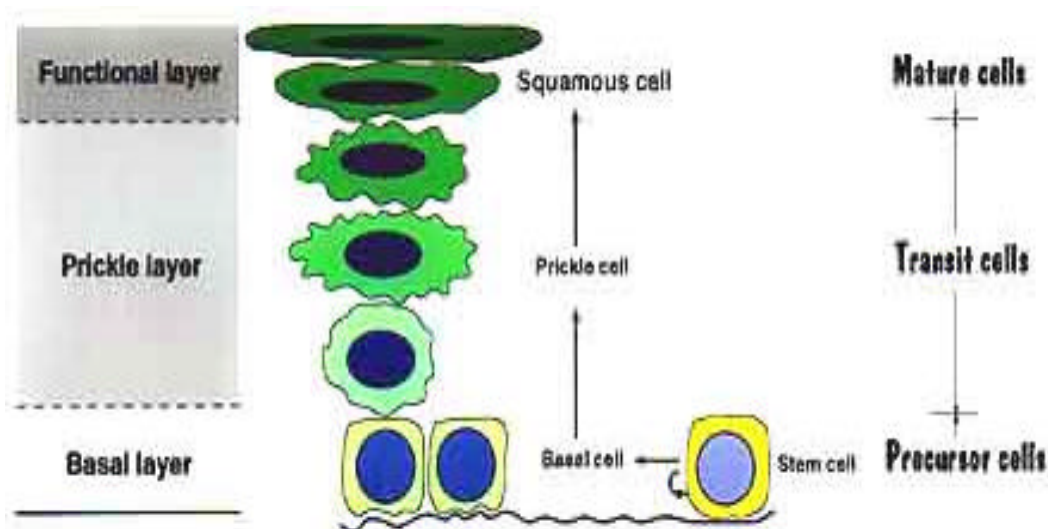


Abb. 3.1: Zelldifferenzierung im Ösophagusepithel (aus Karam, 1999)

Anhand der 52 untersuchten Ösophagus-Präparate mit morphologisch unauffälligem Plattenepithel konnte festgestellt werden, dass der Anteil PAX9-positiver Zellkerne innerhalb der epithelialen Zellschichten von basal nach luminal beträchtlich variiert.

In den Basal- und Suprabasalzellen des Ösophagus fand sich kein einheitliches Expressionsmuster. Dagegen zeigte die überwiegende Mehrzahl der Präparate in den mittleren ausdifferenzierten Zelllagen eine sehr starke Expression, die sich beim Großteil der luminal gelegenen Zellschichten wieder verlor. In fast allen Fällen waren diese Zellschichten PAX9-negativ.

3.1.1.1 Die Expression von PAX9 in den Basalzellen des Ösophagusepithels

Die Zellen des Stratum basale liegen der Basalmembran direkt an, sind mit ihr durch Hemidesmosomen verknüpft und erscheinen kuboid oder flach zylindrisch. Als Zeichen ihrer geringen Differenzierung besitzen sie eine hohe Kern-Zytoplasma-Relation (Karam, 1999).

Basalzellen als proliferativer Pool des Epithels sind mitotisch aktiv. Bei der Zellteilung können zum einen neue Basalzellen entstehen, zum anderen können differenziertere Stachelzellen entstehen, die nach oben ins Stratum spinosum wandern.

In 18 von 52 Fällen (35%) war in den Basalzellen kein PAX9 nachzuweisen, und in 17 von 52 Fällen (33%) waren alle Basalzellen PAX9-positiv (vgl. Abb. 3.2).

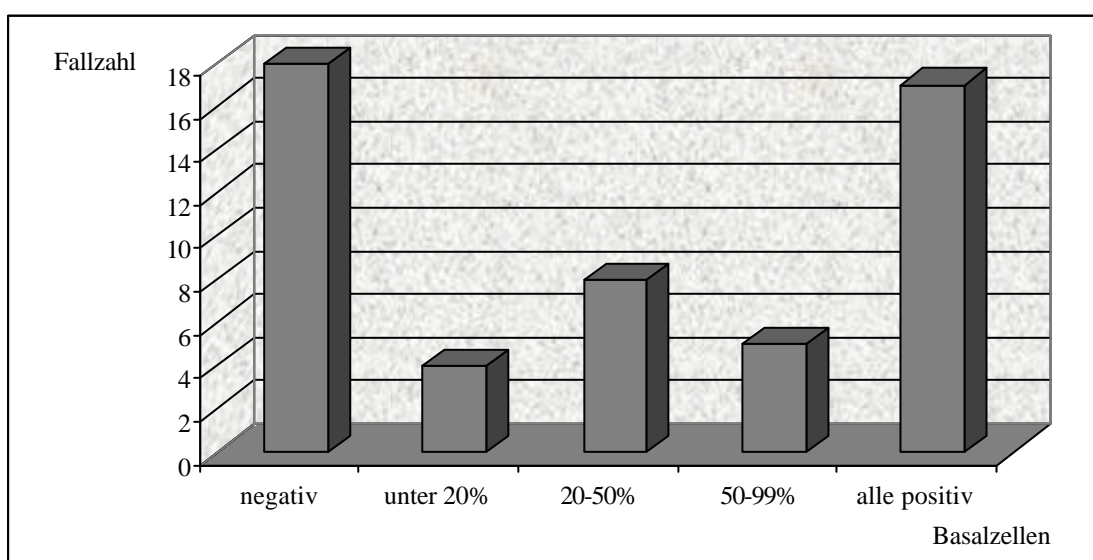


Abb.3.2: Anteil PAX9-exprimierender Basalzellen im ösophagealen Plattenepithel

3.1.1.2 Expression von PAX9 in der suprabasalen Zellschicht

Als Suprabasalzellen bezeichnet man jene Zellen, die den Basalzellen am nächsten sind, diese Zellen haben bereits einen Schritt mehr in der Differenzierung zum Keratinozyten durchlaufen.

Das Expressionsmuster in den Suprabasalzellen ähnelte dem in den Basalzellen, jedoch waren im Durchschnitt quantitativ mehr Kerne PAX9-positiv als in den benachbarten Basalzellen. Auf 15 von 52 (29%) Gewebeschnittpräparaten exprimierten die Suprabasalzellen kein PAX9. Bei einer Probe waren bis zu einem Fünftel der Kerne PAX9-positiv, und auf weiteren 10 Schnittpräparaten fand sich PAX9 in 20-50% der Kerne. In sechs Fällen waren mehr als die Hälfte, jedoch nicht alle Zellen positiv. Bei dem größten Anteil, in 20 Fällen (39%), enthielten alle suprabasalen Zellenkerne das Protein (vgl. Abb. 3.3).

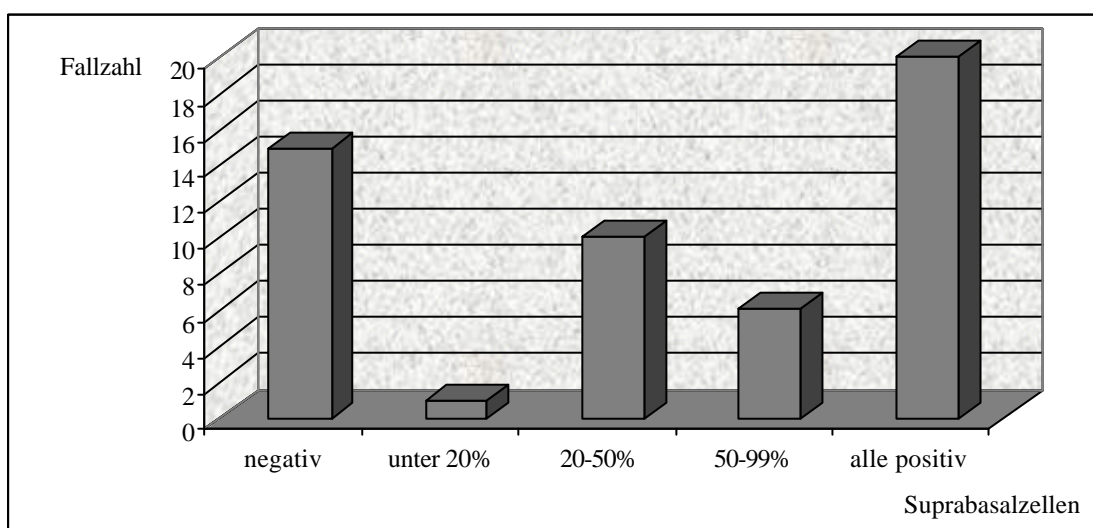


Abb.3.3: Anteil PAX9-positiver Suprabasalzellen im ösophagealen Plattenepithel

3.1.1.3 Das Expressionsmuster von PAX9 im Stratum spinosum

Die Zellen des Stratum spinosum entstehen aus den Basalzellen infolge der Differenzierung und Migration nach luminal. Über ihre Zytoplasmfortsätze, von denen sich die Bezeichnung „Stachelzellen“ ableitet, stehen sie miteinander in Kontakt.

Im Gegensatz zu den relativ undifferenzierten basalen und suprabasalen Zellen wies die große Mehrheit der ausgereiften Keratinozyten in den mittleren Schichten des ösophagealen Epithels ein einheitlicheres Expressionsmuster für PAX9 auf.

Unter den 52 untersuchten Präparaten befand sich nur eines mit einer negativen Reaktion in der mittleren Zellschicht. Weniger als die Hälfte der Kerne färbten sich nur in zwei Fällen an, und bei drei Gewebeproben waren mehr als 50%, aber nicht alle Kerne positiv. In 46 von 52 Fällen (89%) enthielten alle Kerne das Protein (vgl. Abb. 3.4).

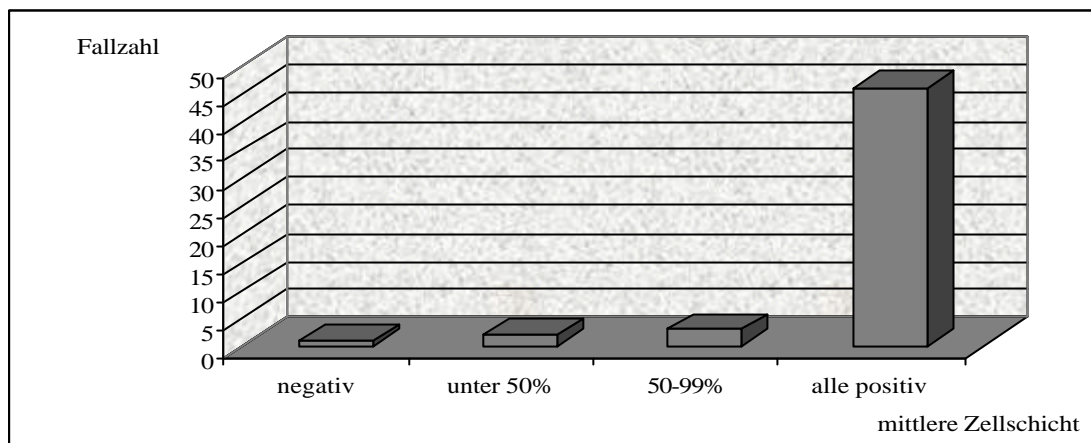


Abb. 3.4: Anteil PAX9-exprimierender Zellen im Stratum spinosum des Ösophagusepithels

3.1.1.4 PAX9 in den oberflächlichen Plattenepithelzellen

Auch in den oberflächlichsten, zum Lumen des Ösophagus hin gelegenen Zellschichten ließ sich ein dominierendes Motiv im Färbeverhalten herausarbeiten (vgl. Abb. 3.5): Von den 52 Gewebeschnittpräparaten fand in 41 Fällen (79%) keine oberflächliche PAX9-Expression statt. In sieben Fällen (14%) waren dagegen alle oberflächlichen Zellen PAX9-positiv. Drei Präparate enthielten einen Anteil positiver Zellen von unter 50%, und in einem Fall fand sich in mehr als der Hälfte, jedoch nicht in allen Zellen, das PAX9-Protein.

Morphologische Unterschiede, die auf einen unterschiedlichen Reifegrad der Superfizialzellen hindeuten würden, waren nicht zu erkennen.

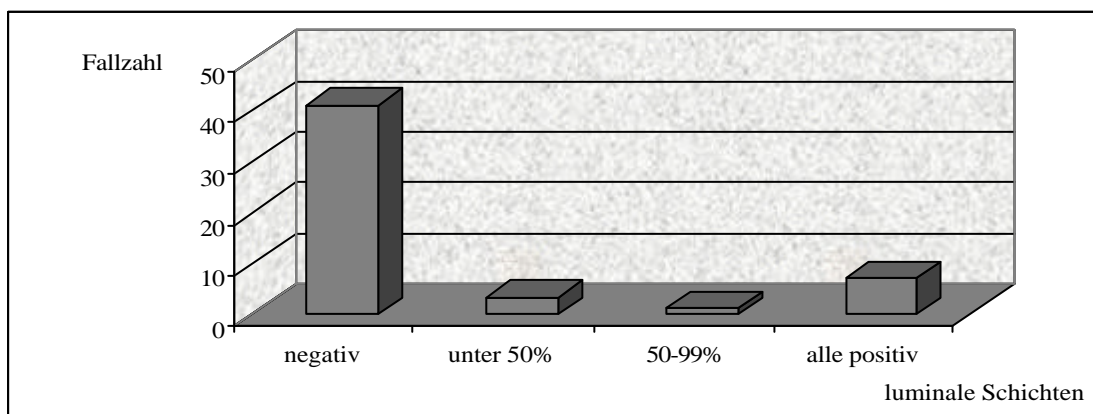


Abb. 3.5: Anteil PAX9-positiver Superfizialzellen im Plattenepithel des Ösophagus

3.1.1.5 Zusammenfassung: Die PAX9-Expression in den verschiedenen Schichten des ösophagealen Plattenepithels

Bei den bisher untersuchten Expressionsmustern wurde eine Analyse des Anteils positiver Zellen bzw. der Reaktionsintensität auf jeweils eine Schicht innerhalb des ösophagealen Plattenepithels beschränkt durchgeführt. Nun soll versucht werden, die Entwicklung der PAX9-Expression von den basalen zu den luminal gelegenen Zellschichten zu beschreiben.

Bei 12 von 52 Fällen (23%) nahm der Anteil PAX9-enthaltender Zellen von den Basalzellen über die Suprabasalzellen bis zu den Kernen der mittleren Epithelschicht immer mehr zu, während die oberflächlichen Zellschichten negativ oder nur zu einem geringen Teil positiv waren.

Bei 26 Fällen (50%) konnte man keinen Unterschied bezüglich der Expression von PAX9 in den basalen und suprabasalen Zellen feststellen, während deutlich mehr Zellen der mittleren Lage das Protein enthielten und die Superfizialzellen wieder negativ oder nur zum kleinen Teil positiv waren. In dieser Gruppe exprimierten in 12 von den 26 Beispielen die Basal- und Suprabasalzellen kein PAX9, und in 14 Fällen waren unter den Basal- und Suprabasalzellen gleich viele PAX9-positive Zellen enthalten.

Bei den restlichen 14 Präparaten passte keine dieser Beschreibungen, dort fanden sich andere Expressionsmuster, auf die jedoch aufgrund der geringen Anzahl von Beispielen nicht näher eingegangen werden soll.

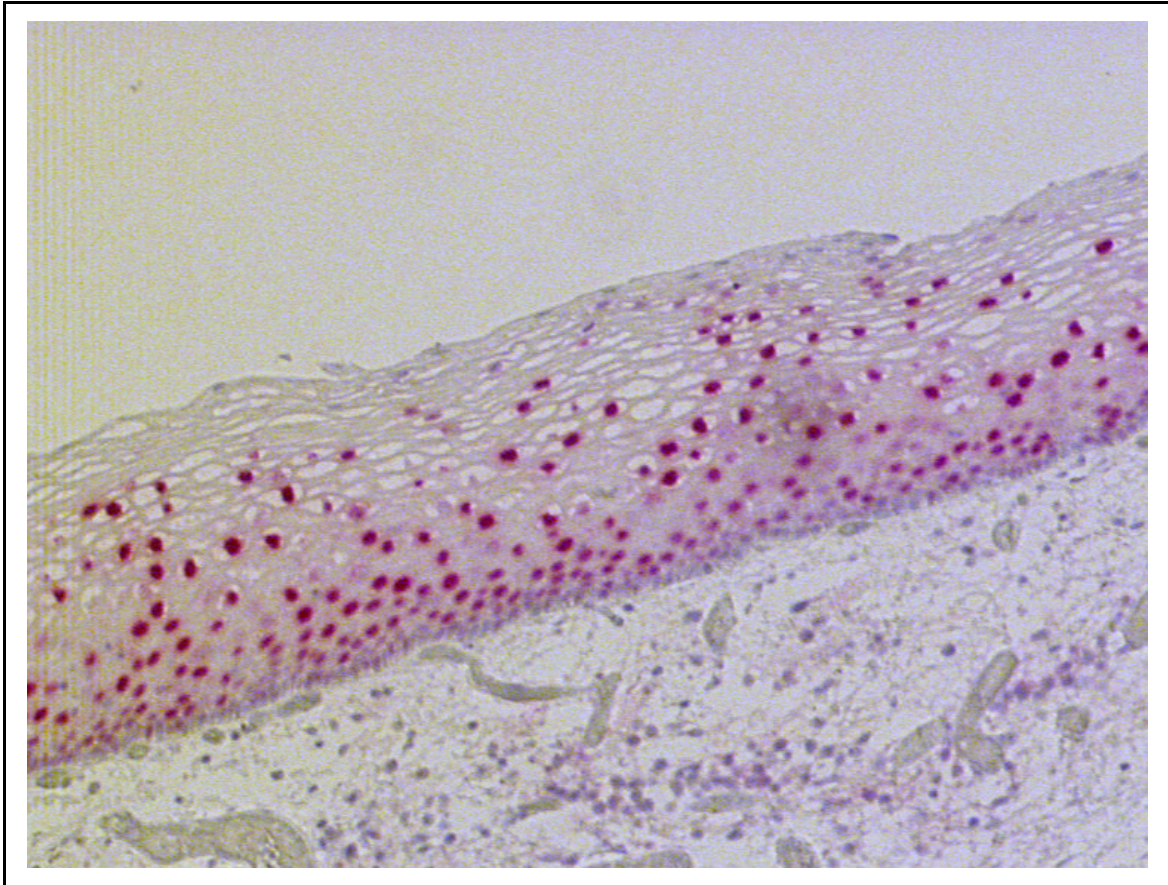


Abb. 3.6: Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im Ösophagusepithel

3.1.1.6 Expression von PAX9 in submukösen Drüsen des Ösophagus

Auf achtzehn der untersuchten Schnittpräparate fanden sich seröse bzw. muköse oder seromuköse Drüsen in der Submukosa des Ösophagus. Alle dieser Drüsen enthielten PAX9. Bis auf zwei Ausnahmen wurde *PAX9* in mehr als 50% der Drüsenepithelzellen exprimiert (vgl. Abb. 3.7).

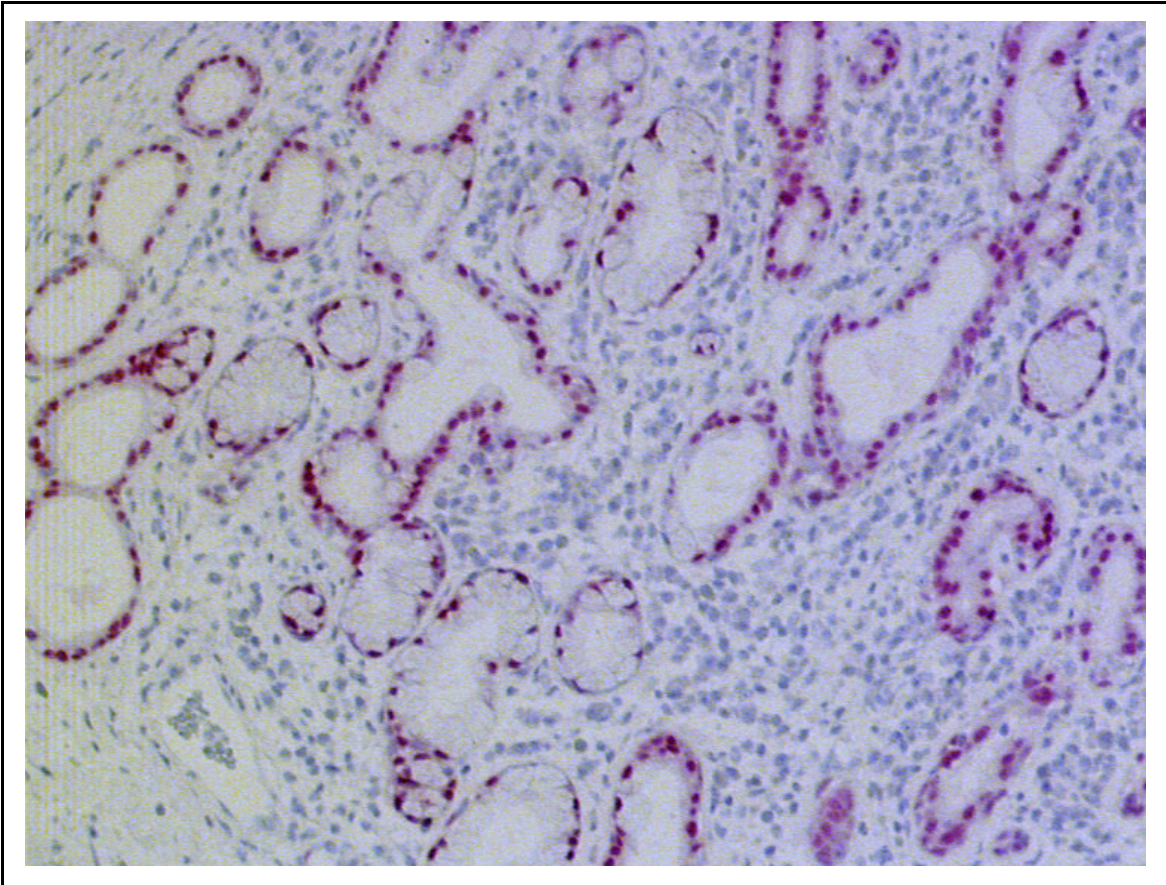


Abb. 3.7: Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression in submukösen Drüsen des Ösophagus

3.1.2 Die Expression von PAX9 bei benignen Läsionen des Ösophagusepithels am Beispiel der Basalzellhyperplasie

Auf fünfzehn Schnittpräparaten befanden sich Areale mit einer Basalzellhyperplasie. Nur bei zwei von diesen fünfzehn Schnittpräparaten (13%) konnte in den betroffenen Basalzellen kein PAX9 detektiert werden. Somit war der prozentuale Anteil PAX9-positiver Basalzellen in Bereichen mit Basalzellhyperplasie mit 87% höher als im unauffälligen Epithel (65 % PAX9-positiv Basalzellen und 71% PAX9-positiv Suprabasalzellen).

Das Protein fand sich in acht der 15 Fälle (53%) mit Basalzellhyperplasie in allen Kernen der Basalzellen (vgl. Abb. 3.8), verglichen mit 17 von 52 Fällen (33%) in den Basalzellen im gesunden Epithel und 20 von 52 Fällen (38%) in den Suprabasalzellen.

Zwei Präparate mit Basalzellhyperplasie enthielten mit weniger als 5% einen geringen Anteil PAX9-positiver Zellen, bei jeweils einem Fall fanden sich 30%, 50% bzw. 80% positive Kerne.

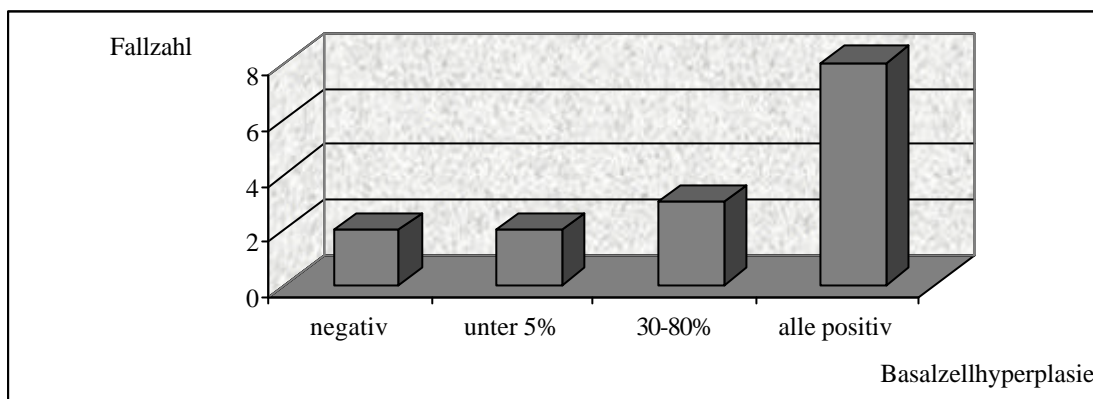


Abb.3.8: Anteil PAX9-exprimierender Basalzellen in Bereichen mit Basalzellhyperplasie des Ösophagusepithels

Bei fünf Präparaten, die neben der Basalzellhyperplasie auch normales Plattenepithel enthielten, war es möglich, die Expression von *PAX9* in Arealen mit Basalzellhyperplasie und unauffälligen Basalzellen direkt zu vergleichen. Eines dieser Präparate wies an beiden Stellen PAX9-negative Basalzellen auf. Bei einem Fall waren die Kerne in Bereichen mit Basalzellhyperplasie zu 30% positiv, während der Anteil positiver Kerne bei den unauffälligen basalen Zellen weniger als 5% ausmachte. In drei von den fünf Fällen exprimierten alle Kerne im Bereich der Basalzellhyperplasie *PAX9*, während sich in den Basalzellen im normalen Epithel kein PAX9 nachweisen ließ. Insgesamt fand sich somit eine etwas stärkere Expression von PAX9 als im unauffälligen Plattenepithel.

Das Expressionsmuster von *PAX9* in den ausgereiften mittleren und superfizialen Keratinozyten der Areale mit Basalzellhyperplasie unterschied sich nicht von dem bereits beschriebenen Muster im normalen Plattenepithel. In den Superfizialzellen fand sich das Protein nicht.

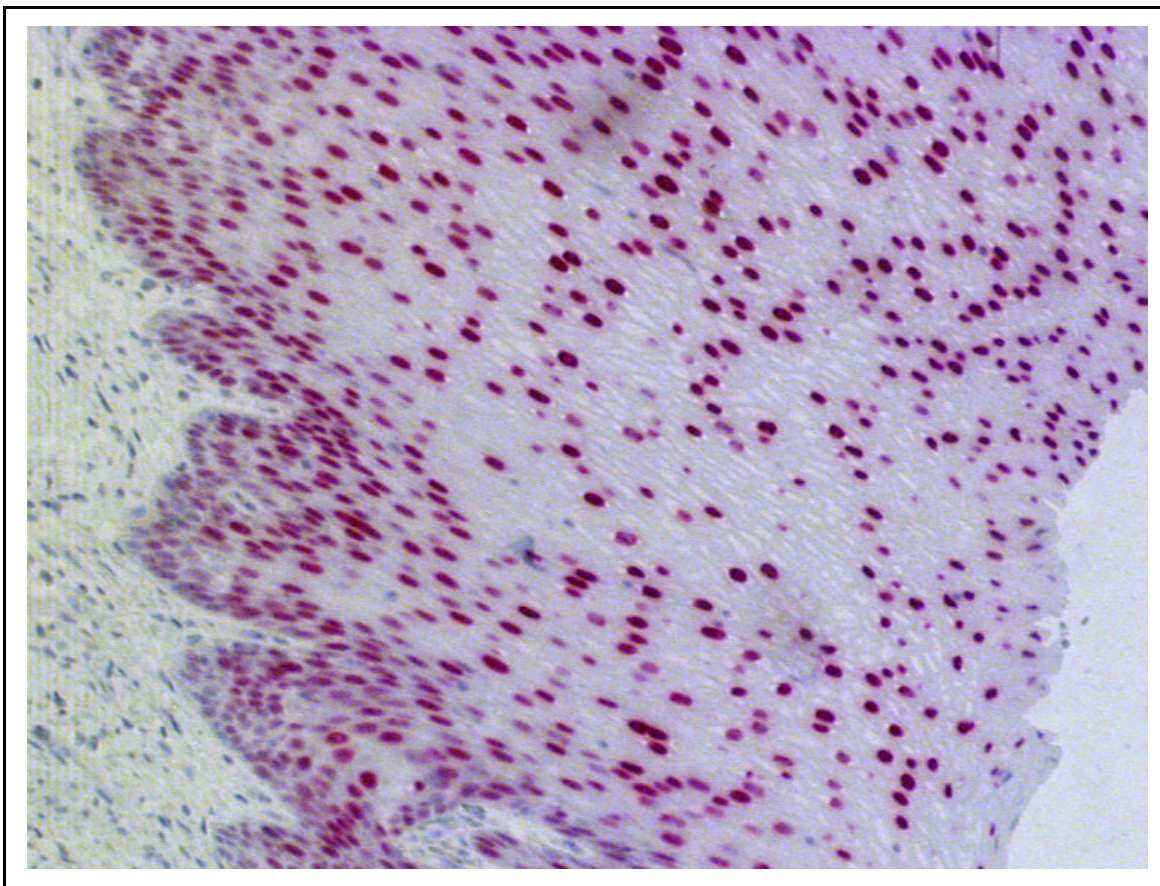


Abb. 3.9: Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression bei einem Fall von Basalzellhyperplasie des Ösophagusepithels

3.1.3 Die PAX9-Expression in präkanzerösen Läsionen des Ösophagus-Plattenepithels

Untersucht wurden 45 Schnittpräparate mit Plattenepithel verschiedenen Dysplasiestadien. Ferner enthielten einige Schnittpräparate normales und dysplastisches Epithel oder Epithelstellen unterschiedlichen Dysplasiestadien; hier war ein direkter Vergleich der PAX9-Expression möglich.

3.1.3.1 Die Expression von PAX9 im leichtgradig dysplastischen Plattenepithel

Zwölf Schnittpräparate enthielten geringgradig dysplastisches Plattenepithel. Hiervon fanden sich vier Fälle mit PAX9-negativen Basalzellen und zwei Fälle, bei denen alle basalen Zellen PAX9 exprimierten. In sechs Fällen waren zwischen 5 und 80% der basalen Zellen positiv (vgl. Abb. 3.10).

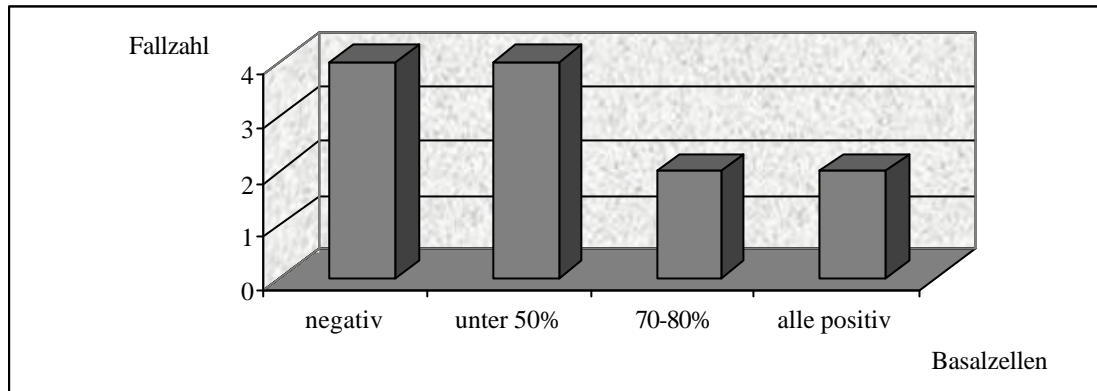


Abb. 3.10: Anteil PAX9-exprimierender Basalzellen im leichtgradig dysplastischen Ösophagusepithel

Die Keratinozyten in der mittleren Epithellage exprimierten in allen Fällen das PAX9-Protein. Bei jeweils zwei Schnittpräparaten waren 50% bzw. 80% der Kerne positiv, in den restlichen acht Fällen konnte PAX9 in jedem Kern detektiert werden (vgl. Abb. 3.11).

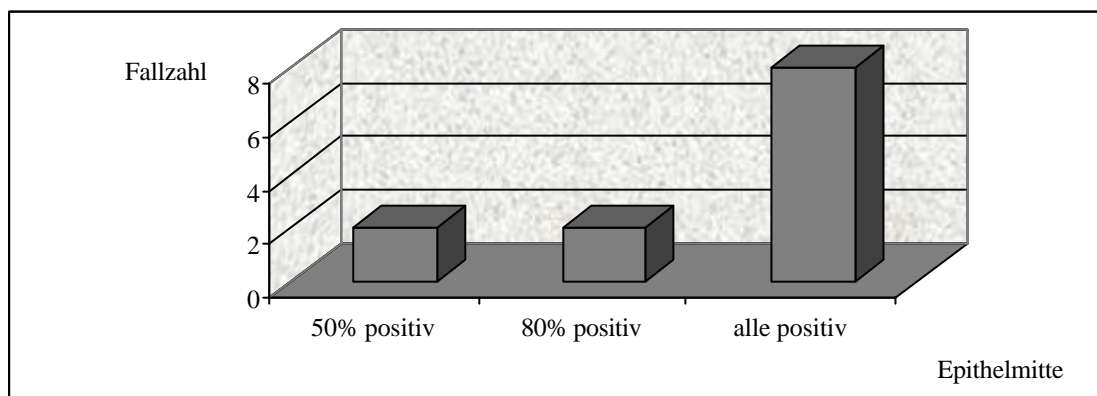


Abb. 3.11: Anteil PAX9-exprimierender Zellen im Stratum spinosum bei leichtgradiger Dysplasie des Ösophagusepithels

Die luminal gelegenen Superfizialzellen erwiesen sich in allen zwölf Fällen als PAX9-negativ.

Bei sieben Schnittpräparaten unterschied sich die Expression in der basalen und suprabasalen Schicht nicht, während die mittleren Lagen deutlich stärker PAX9-positiv waren.

Darunter befanden sich drei Schnittpräparate mit negativen basalen und suprabasalen Zellen. Bei zwei Gewebeproben nahm die Expression von den basalen Zellen über die suprabasalen Zellen zur Epithelmitte hin zu. Bei den anderen drei Fällen ließ sich das Färbeverhalten keinem dieser Muster zuordnen.

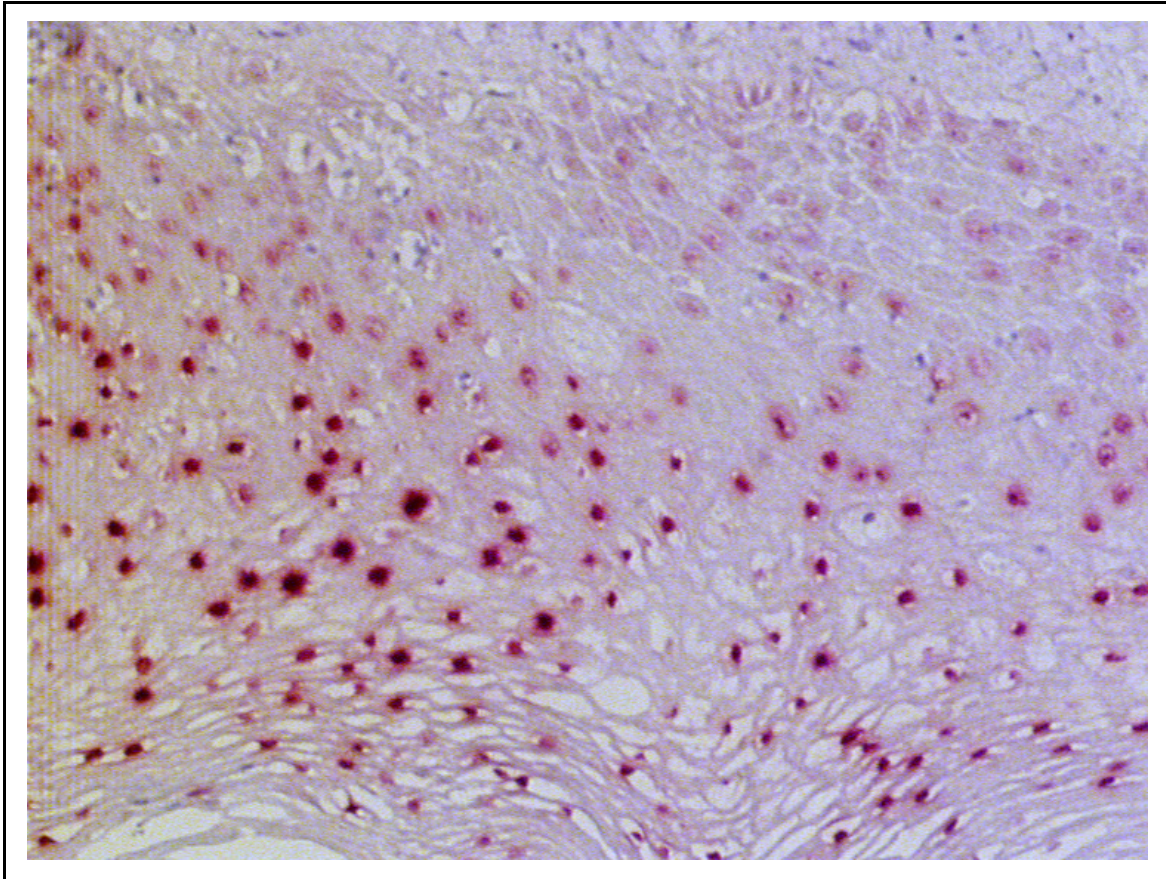


Abb. 3.12: Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im leichtgradig dysplastischen ösophagealen Plattenepithel

Auf sechs Schnittpräparaten befanden sich sowohl Anteile des leichtgradig dysplastischen Epithels neben Arealen mit normalem Plattenepithel. Verglichen mit der Expression von *PAX9* im unauffälligen Plattenepithel war in einem Fall kein Unterschied zur leichten Dysplasie festzustellen, in drei Fällen wies die Expression im dysplastischen Epithel eine geringere Ausprägung und in zwei Fällen eine stärkere Ausprägung als im gesunden Epithel auf.

Zusammenfassend ist kein signifikanter Unterschied zwischen der *PAX9*-Expression im leichtgradig dysplastischen und im gesunden Plattenepithel des Ösophagus zu erkennen.

3.1.3.2 Die Expression von PAX9 im mäßiggradig dysplastischen Ösophagusepithel

Neun Schnittpräparate enthielten Epithelbereiche mit mäßiggradiger Dysplasie.

In zwei Fällen waren die der Basalmembran anliegenden Zellen PAX9-negativ, in drei Fällen enthielten alle Kerne PAX9. Bei den übrigen vier Fällen bewegte sich der Anteil PAX9-positiver Kerne zwischen 30% und 80% (vgl. Abb. 3.13).

Verglichen mit dem Anteil PAX9-positiver Basalzellen im gesunden Epithel fand sich im mäßiggradig dysplastischen Epithel somit eine leicht stärkere Expression von PAX9.

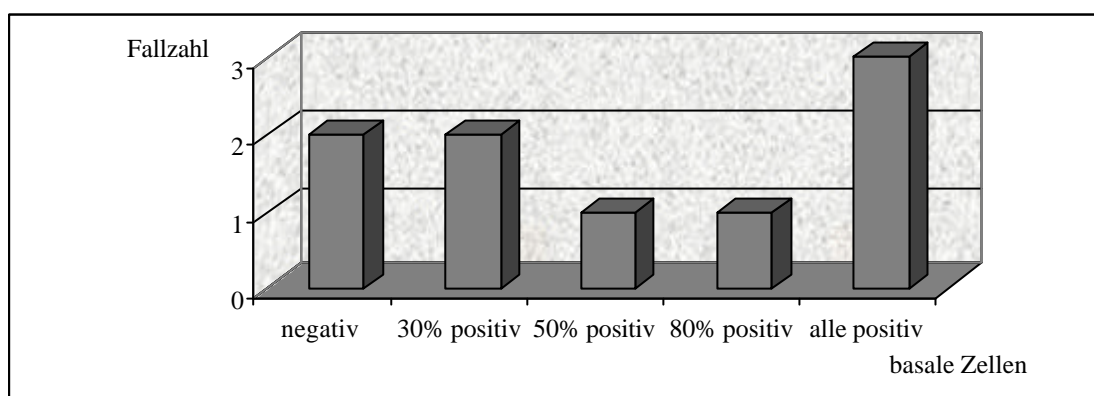


Abb. 3.13: PAX9-Expression in basalen Zellen bei mäßiggradiger Dysplasie des Ösophagusepithels

Der Anteil PAX9-positiver Kerne bei den Keratinozyten im mittleren Epithelbereich betrug in einem Fall 50%, sonst 100% (vgl. Abb. 3.14). Infolge der gestörten Ausreifung im dysplastischen Epithel besaßen diese Zellen nicht das morphologische Erscheinungsbild der Stachelzellen im gesunden Epithel. Die Superfizialzellen waren mit zwei Ausnahmen negativ. Bei fünf der neun Fälle nahm die Fraktion PAX9-positiver Zellen von den basalen Schichten zur Epithelmitte hin zu. Die PAX9-Expression war damit in den Zellen, die über den dysplastischen Arealen lagen, gesteigert.

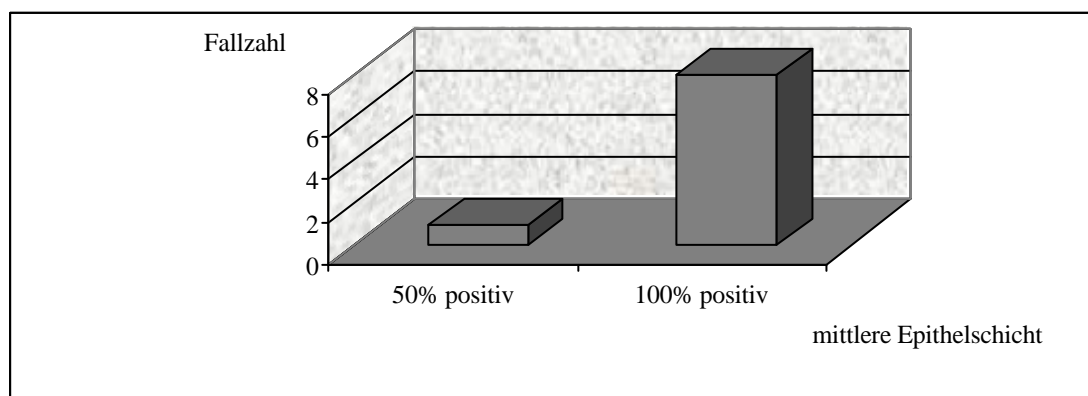


Abb. 3.14: PAX9-Expression in der Epithelmitte bei mäßiggradiger Dysplasie des Ösophagusepithels

Bei vier Fällen war ein direkter Vergleich mit der Reaktion im normalen Plattenepithel möglich. Hier fand sich in einem Fall eine stärkere *PAX9*-Expression in der mäßigen Dysplasie, in drei Fällen war jedoch die Reaktion im dysplastischen Areal gegenüber der Reaktion im gesunden Plattenepithel abgeschwächt.

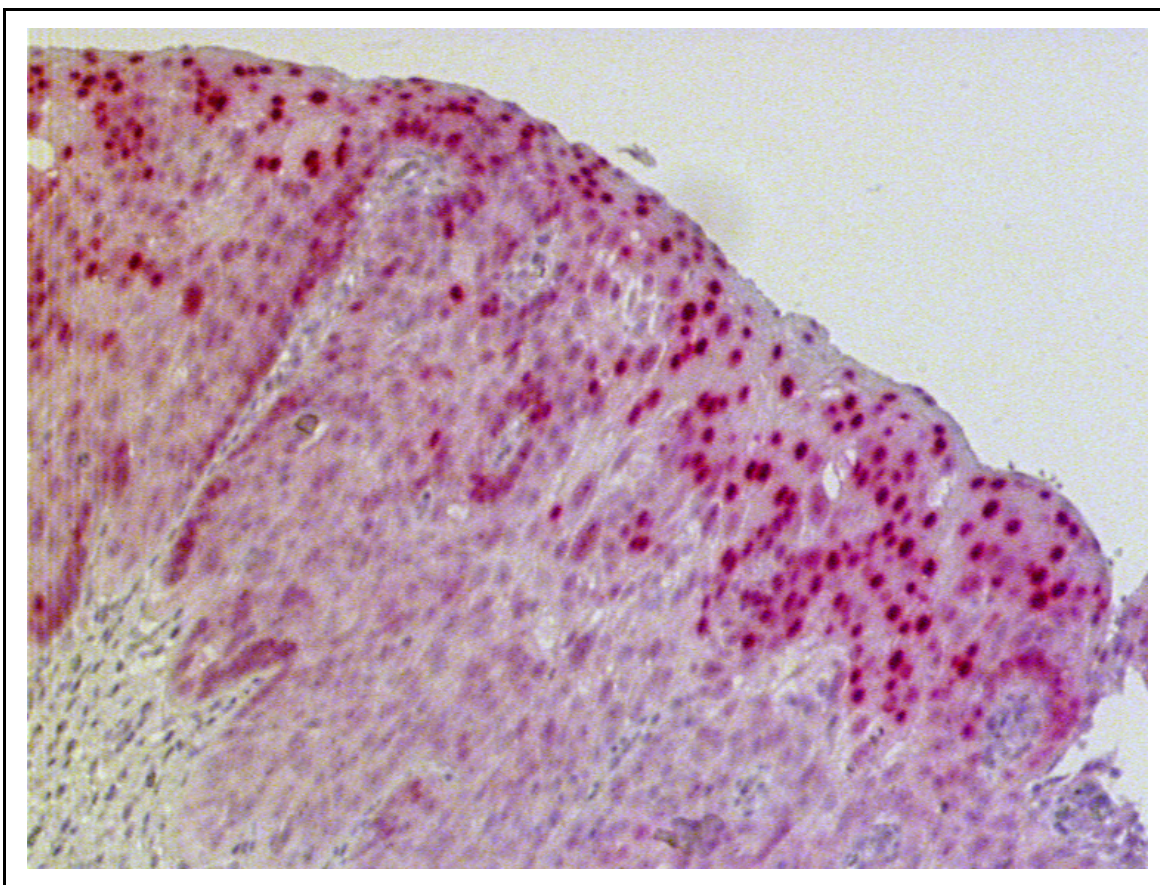


Abb. 3.15: Immunhistochemische Darstellung der *PAX9*-Expression im mäßiggradig dysplastischen ösophagealen Plattenepithel

3.1.3.3 Die Expression von *PAX9* im hochgradig dysplastischen Plattenepithel des Ösophagus

Auf 27 Schnittpräparaten fanden sich Stellen eines hochgradig dysplastischen Plattenepithels. Auffallend war, dass die *PAX9*-Expression in der Epithelschicht von den basalen zu den oberflächlichen Zellen in den meisten Fällen nahezu unverändert blieb, anders als im leicht- bis mäßiggradig dysplastischen Epithel, wo die Zellen doch eine gewisse Reifung nach luminal aufwiesen. Die Ausprägung der *PAX9*-Expression variierte dabei beträchtlich. Zwei Präparate (7%) waren in allen Epithelbereichen *PAX9*-negativ. In acht Fällen (30%)

reagierten bis zu 50% der Keratinozyten positiv, in weiteren acht Fällen (30%) zeigten 50 bis 80% und in neun Fällen (33%) 90 bis 100% der Kerne eine positive Reaktion (vgl. Abb. 3.16).

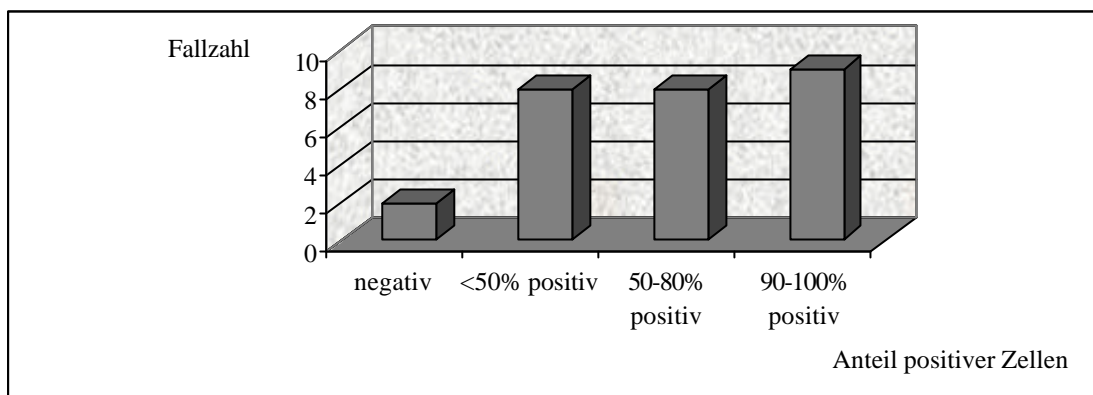


Abb 3.16: Anteil PAX9-positiver Zellen im hochgradig dysplastischen Ösophagusepithel

Bei siebzehn Schnittpräparaten blieb der Anteil PAX9-positiver Zellen von basal nach luminal konstant. In sechs Fällen nahm die Expression von basal nach luminal zu, in zwei Fällen ab, so dass nur die basalen Zellen PAX9 enthielten (vgl. Abb. 3.17). Zwei Schnittpräparate waren komplett negativ für PAX9.

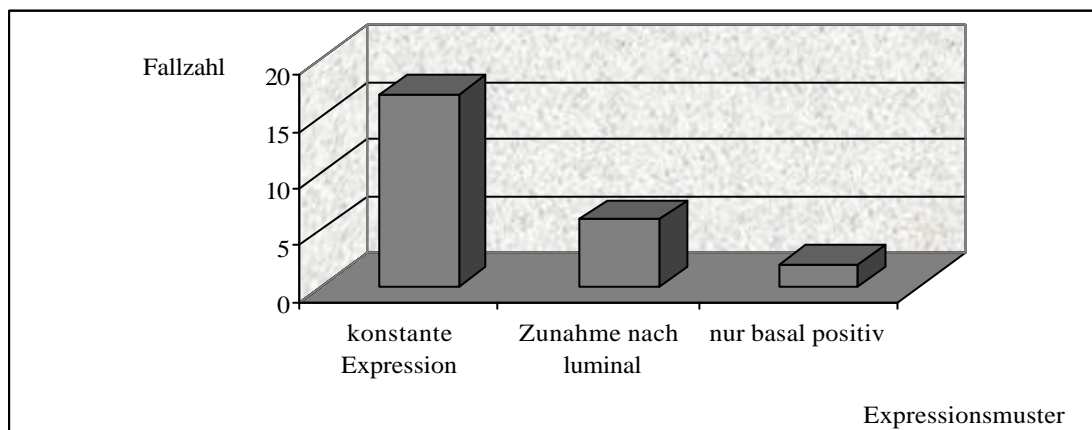


Abb. 3.17: Expressionsmuster von PAX9 im hochgradig dysplastischen Ösophagusepithel

In 23 Fällen konnte die Expression im hochgradig dysplastischen Epithel verglichen werden mit der Expression im normalen Epithel oder im leicht- oder mäßiggradig dysplastischen Epithel.

Bei 14 Fällen enthielten die Schnittpräparate sowohl normales als auch hochgradig dysplastisches Plattenepithel. Hier war in einem Fall kein Unterschied zum unauffälligen

Epithel festzustellen. Bei dreizehn Schnittpräparaten zeigte das hochgradig dysplastische Epithel eine deutlich schwächere Reaktion als das gesunde Epithel.

In neun Fällen war ein Vergleich zwischen leichter bzw. mäßiger und hochgradiger Dysplasie möglich. Das hochgradige Epithel wies in sieben Fällen eine geringere Expression auf, in zwei Fällen war die Expression gleich stark ausgeprägt.

Bei drei der Schnittpräparate konnten sowohl normales als auch gering bzw. mäßig dysplastisches und zusätzlich noch hochgradig dysplastisches Epithel gefunden werden.

In allen drei Fällen war die Reaktion im hochgradig dysplastischen Epithel am geringsten ausgeprägt.

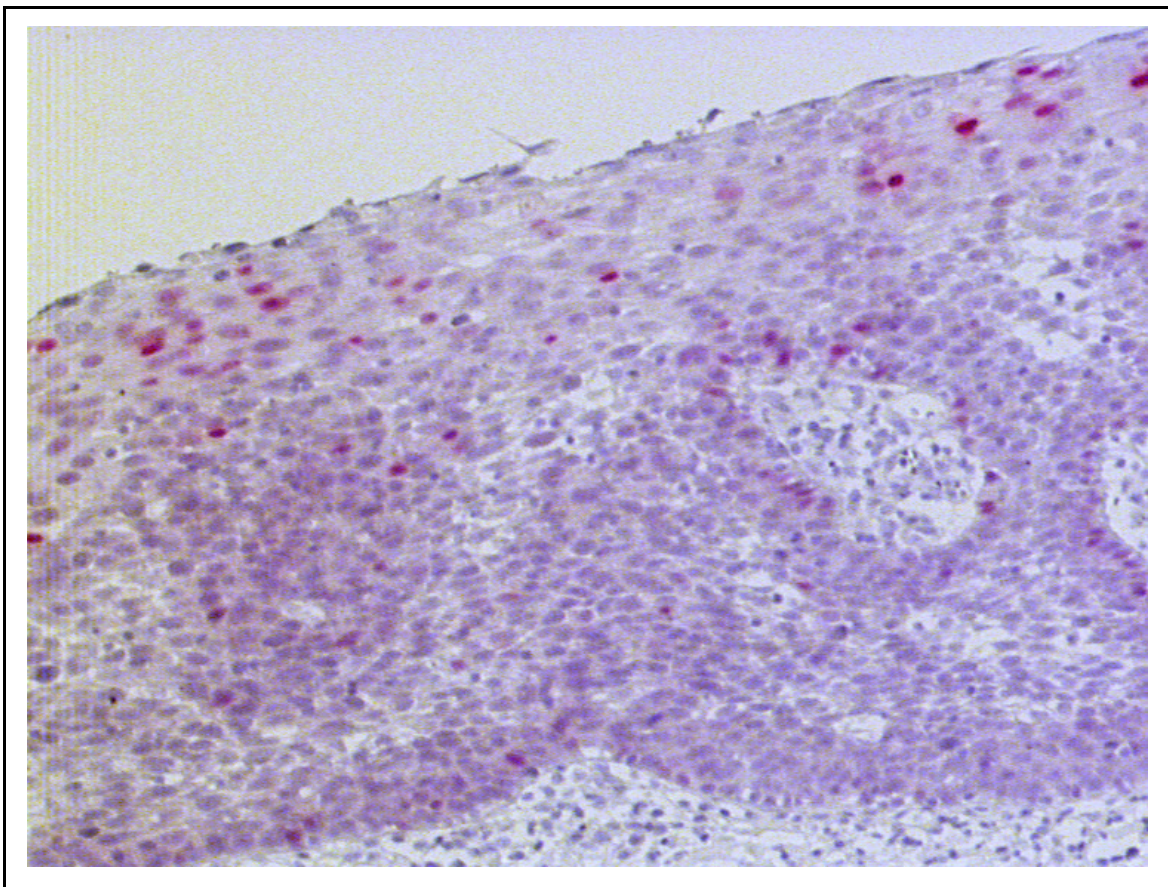


Abb. 3.18: Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im hochgradig dysplastischen Ösophagusepithel

3.1.4 Die Expression von PAX9 im invasiven Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von *PAX9* bei 44 invasiven Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus untersucht. Acht dieser Karzinome waren vor der Ösophagektomie mit Radio- oder Chemotherapie vorbehandelt worden.

Untersucht wurde der Anteil *PAX9*-exprimierender invasiver Tumorzellen. Sofern dies möglich war, wurde dieser prozentuale Anteil verglichen mit der Anzahl positiver Zellen im dysplastischen Epithel oder im Carcinoma in situ. Weiterhin wurde geprüft, ob die Expression von *PAX9* im jeweiligen Tumorareal gleichmäßig oder inhomogen ausgeprägt war.

3.1.4.1 Überblick: PAX9-Expression in Ösophaguskarzinomen

Im Großteil der untersuchten Ösophaguskarzinome konnte immunhistochemisch zumindest in einem Tumorareal eine *PAX9*-Expression nachgewiesen werden.

Nur drei der 44 Fälle waren vollständig *PAX9*-negativ (7%). Bei zwei weiteren Karzinomen ließen sich nur wenige vereinzelte Kerne anfärben, so dass sich der Anteil *PAX9*-positiver Zellen auf weniger als 5% belief. Somit waren insgesamt 39 Karzinome deutlich positiv (vgl. Abb. 3.19).

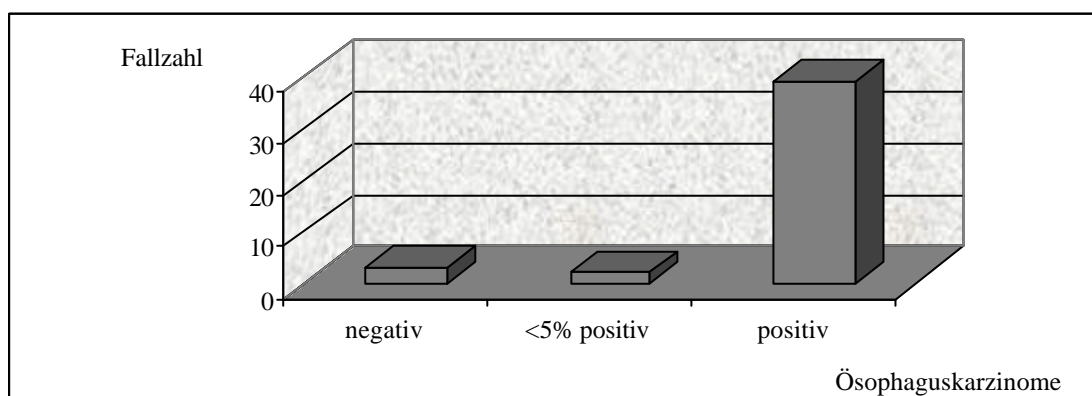


Abb. 3.19: PAX9-Expression in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

Bei 21 der 39 positiven Karzinome zeigte sich in den immunhistochemisch untersuchten Bereichen ein homogenes Expressionsmuster von *PAX9* (vgl. Abb. 3.20). In zwei Fällen lag ein mikroinvasives Karzinom mit nur geringer Invasion jenseits der Basalmembran vor; hier konnte keine Beurteilung bezüglich Homogenität oder Inhomogenität stattfinden.

16 Karzinome wiesen ein inhomogenes Expressionsmuster auf. Diese Inhomogenität zeigte sich entweder in einem unterschiedlichen Anteil *PAX9*-positiver Zellen in den einzelnen

invasiven Arealen oder im gleichzeitigen Vorliegen PAX9-positiver und PAX9-negativer Karzinomanteile.

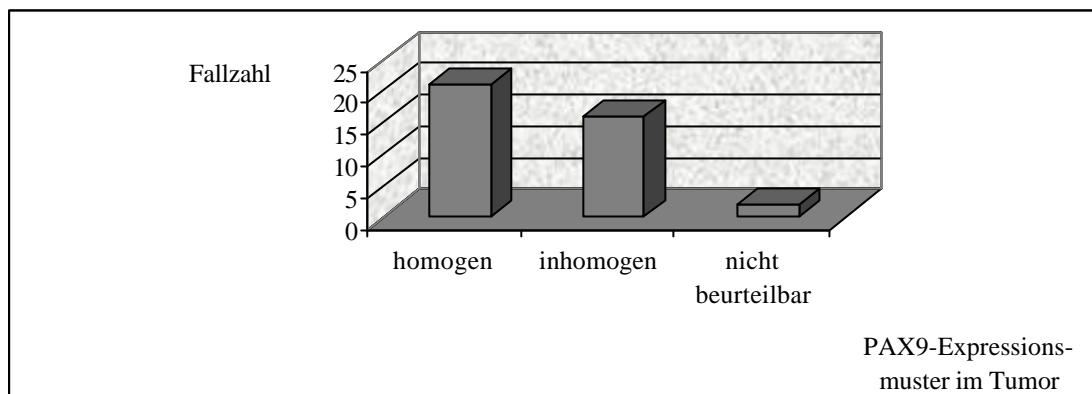
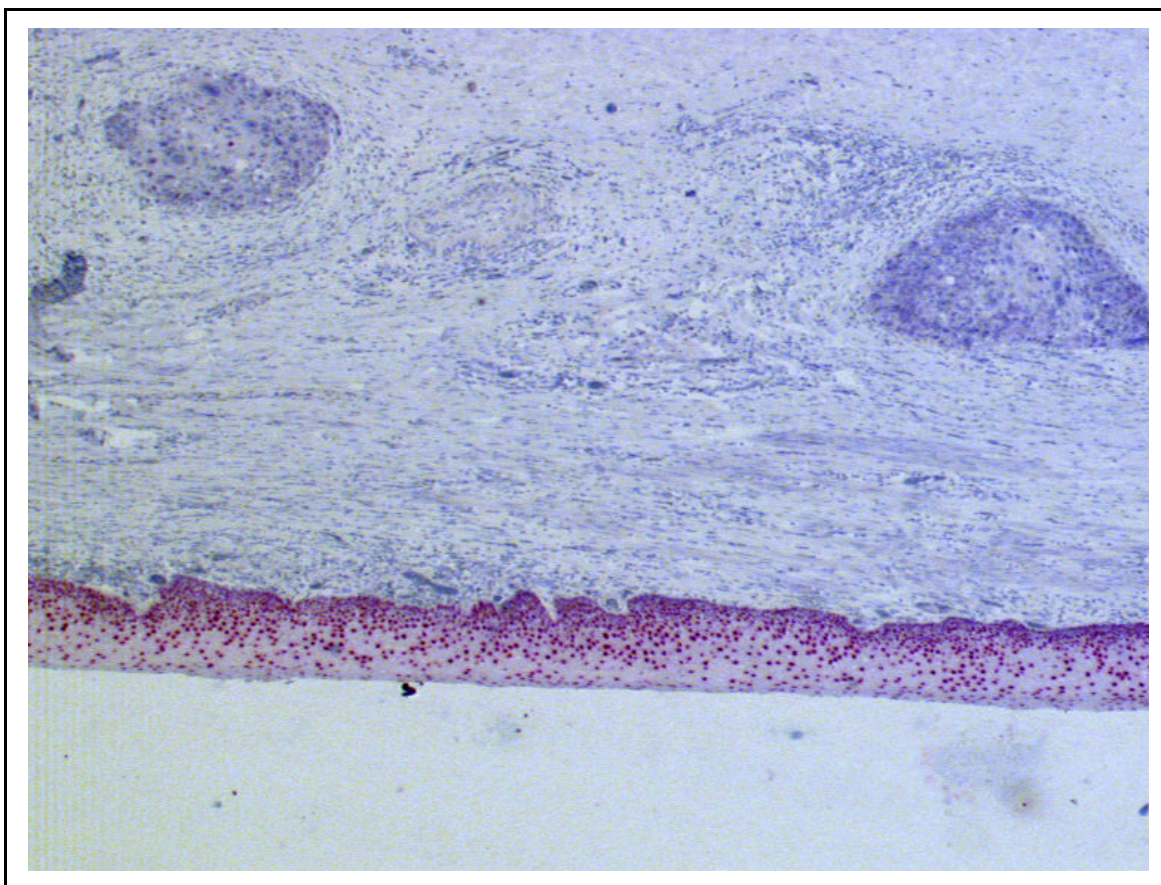
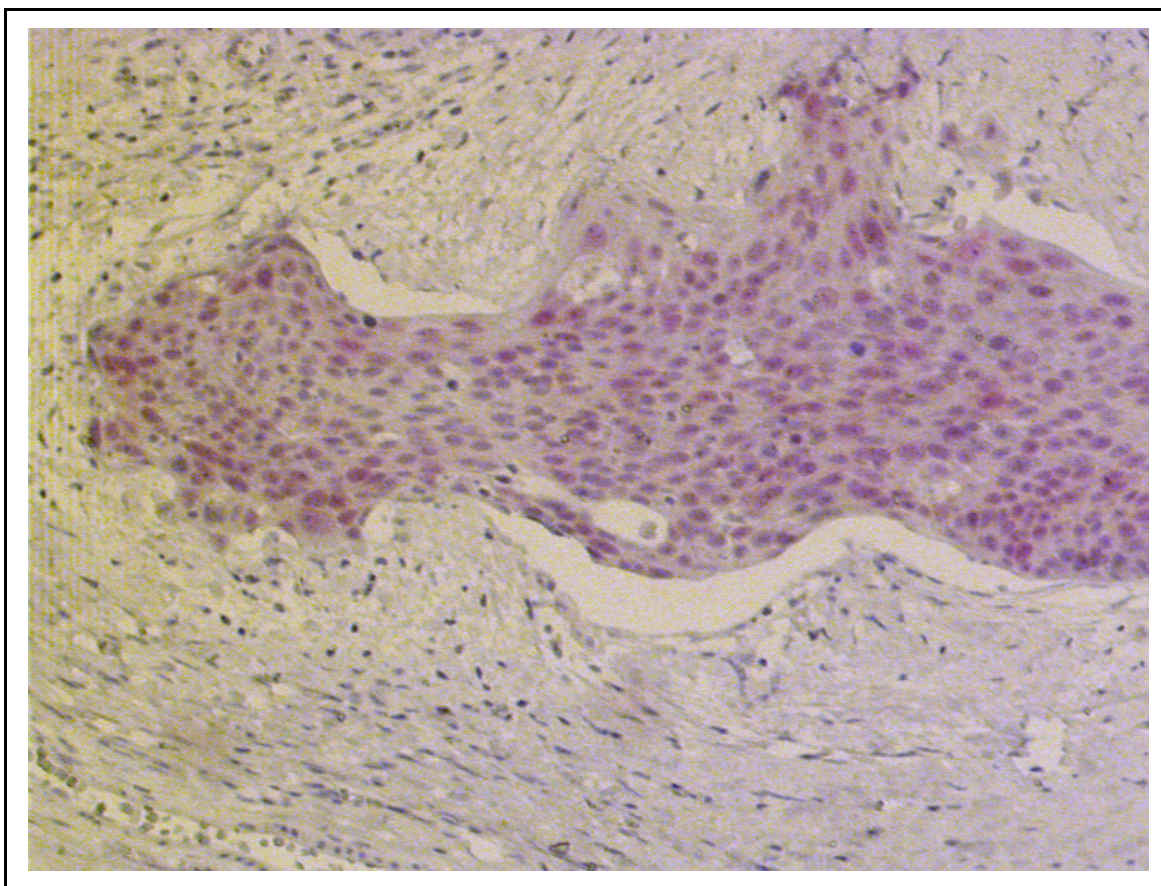


Abb. 3.20: Homogenität und Inhomogenität der PAX9-Expression in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

Fünf Ösophaguskarzinom-Präparate enthielten neben vitalen Tumorarealen auch Bereiche mit regressiven Veränderungen, d. h. Nekrosen. In diesem zugrundegegangenen Tumorgewebe ließ sich immunhistochemisch kein PAX9-Protein mehr detektieren.

Weiterhin fiel bei einigen Karzinompräparaten auf, dass sich die Stärke der immunhistochemischen Reaktion in Abhängigkeit von der Invasionstiefe des Karzinoms änderte. Bei einigen Epithel-assoziierten Karzinominseln nahm die Reaktionsstärke mit zunehmender Invasionstiefe stark ab. Bei anderen Tumorinseln war die Expression von *PAX9* in den peripher gelegenen Zellen deutlich stärker ausgeprägt als in den zentral gelegenen Karzinomzellen.



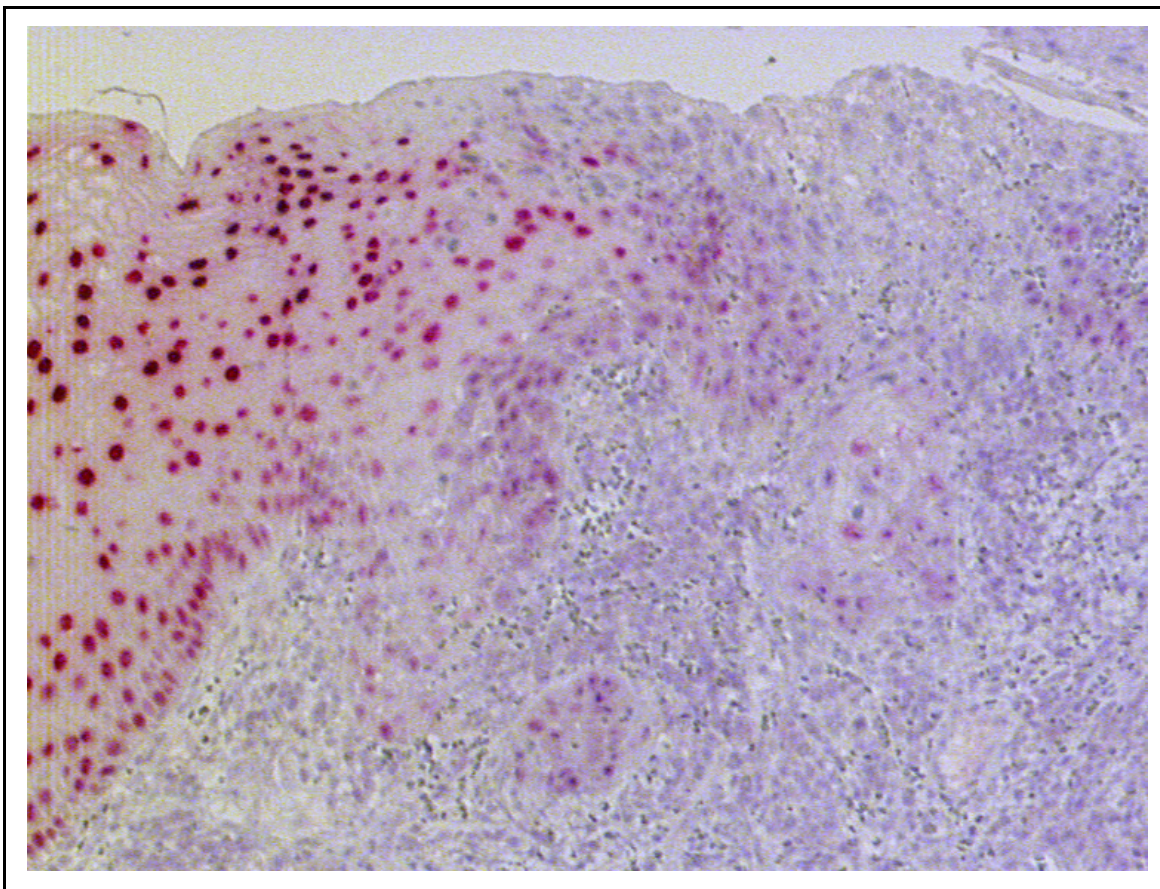


Abb. 3.21, 3.22 und 3.23: Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression in invasiven Ösophaguskarzinomen

3.1.4.2 Die PAX9-Expression in gut und mäßiggradig differenzierten Ösophaguskarzinomen (G1 und G2)

Unter den 44 ausgewerteten Plattenepithelkarzinomen befand sich nur ein gut differenziertes (G1) Karzinom. Dieser Tumor wies eine homogene *PAX9*-Expression mit einem Anteil positiver Tumorzellen von ca. 40% auf.

Unter den dreizehn untersuchten mäßiggradig differenzierten Karzinomen (G2) waren zwei Fälle negativ für *PAX9*. Zusätzlich wurde zu einem dieser negativen Fälle eine zugehörige Lymphknotenmetastase auf die Expression von *PAX9* untersucht; hier konnte das Protein ebenfalls nicht detektiert werden.

Von den 11 positiven G2-Karzinomen war die *PAX9*-Expression bei sechs Fällen (55%) homogen, bei vier Fällen inhomogen (vgl. Abb. 3.24). Weiterhin wurde ein mikroinvasives

Karzinom untersucht; hier konnte keine Aussage bezüglich Homogenität oder Inhomogenität des Färbeverhaltens getroffen werden.

Drei der G2-Karzinome enthielten neben vitalen Tumorbereichen auch nekrotische Areale; hier konnte kein PAX9 detektiert werden.

Bei keinem der mittelgradig differenzierten Karzinome war das Protein in allen Karzinomzellen enthalten, das heißt eine Überexpression von PAX9 im Karzinom konnte nicht nachgewiesen werden.

Zur Ermittlung des Anteils PAX9-positiver Kerne wurde bei inhomogenem Expressionsmuster der Mittelwert herangezogen.

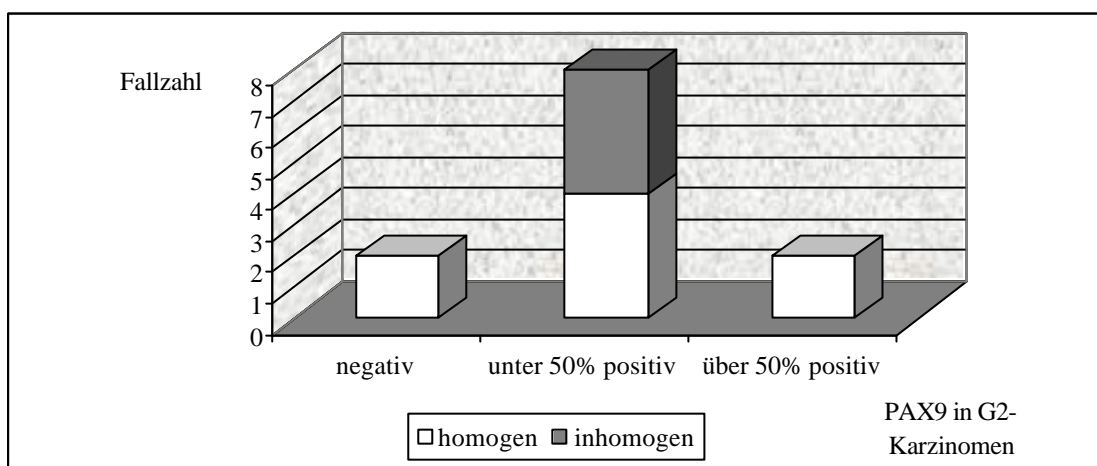


Abb. 3.24: PAX9-Expression in mäßig differenzierten Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

Bei drei der G2-Karzinome fand sich in den oberflächen- und epithelnah gelegenen Arealen eine stärkere *PAX9*-Expression, d. h. eine intensivere Anfärbung und eine größere Fraktion positiver Kerne. Die peripher gelegenen Tumorzellen in den Karzinominseln eines weiteren Falles zeigten eine stärkere Expression als die zentral lokalisierten Zellen. Bei einem anderen Präparat mit ausgeprägter Verhornungstendenz des Tumors enthielten die Tumoreale in der Nähe der Hornperlen deutlich mehr *PAX9* als in den restlichen Bereichen.

Auf neun Präparaten war neben invasiven Karzinomanteilen auch unauffälliges Plattenepithel zu erkennen, so dass ein direkter Vergleich der *PAX9*-Expression erfolgen konnte (vgl. Abb. 3.25). Bei zwei dieser Fälle exprimierte das Karzinom kein *PAX9*, während die Expression im Plattenepithel regelrecht war. Bei den sieben Fällen mit *PAX9*-positiven Tumorealen wies das Plattenepithel einen höheren Anteil positiver Zellen auf.

In allen fünf Fällen, in denen ein Vergleich zwischen *PAX9*-exprimierendem Plattenepithelkarzinom und gering- bis mäßiggradig dysplastischem Epithel möglich war, zeigten die dysplastischen Epithelbezirke eine ausgeprägtere Expression des Proteins.

Weiterhin enthielten acht der Schnittpräparate sowohl *PAX9*-positives Tumorgewebe als auch Anteile eines hochgradig dysplastischen Epithels. Hier war die *PAX9*-Expression in einem der invasiven Karzinome im Vergleich zum hochgradig dysplastischen Epithel erhöht, in zwei Fällen gleichbleibend und in fünf Fällen vermindert.

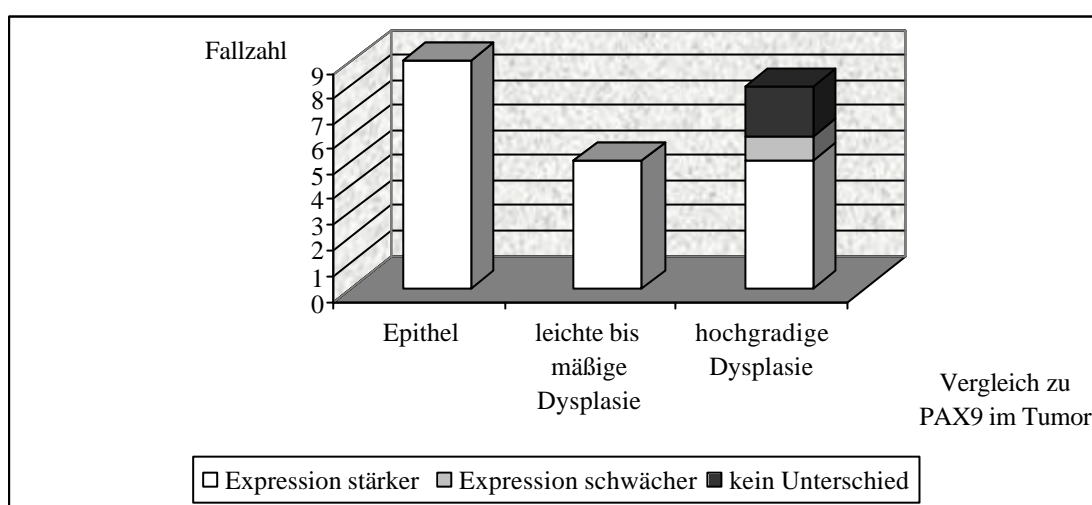


Abb. 3.25: Vergleich der *PAX9*-Expression im gesunden Epithel, im gering- bis mäßiggradig dysplastischen Epithel und im hochgradig dysplastischen Epithel mit der Expression im invasiven Ösophaguskarzinom (G1/G2)

3.1.4.3 Die Expression von *PAX9* in schlecht differenzierten Ösophaguskarzinomen (G3)

Untersucht wurden 30 schlecht differenzierte Ösophagus-Plattenepithelkarzinome (G3). Nur eines dieser Karzinompräparate war völlig *PAX9*-negativ. 14 der Karzinome zeigten ein inhomogenes Expressionsmuster mit *PAX9*-negativen und -positiven Tumorinseln. Zur Ermittlung des Anteils *PAX9*-positiver Kerne wurde bei inhomogenem Expressionsmuster wiederum der Mittelwert herangezogen. Unter den 29 *PAX9*-exprimierenden niedrig differenzierten G3-Karzinomen befanden sich 15 Fälle (56%) mit homogenem Muster (vgl. Abb. 3.26). Nur in einem Fall ließ sich das Protein in allen Tumorzellen nachweisen.

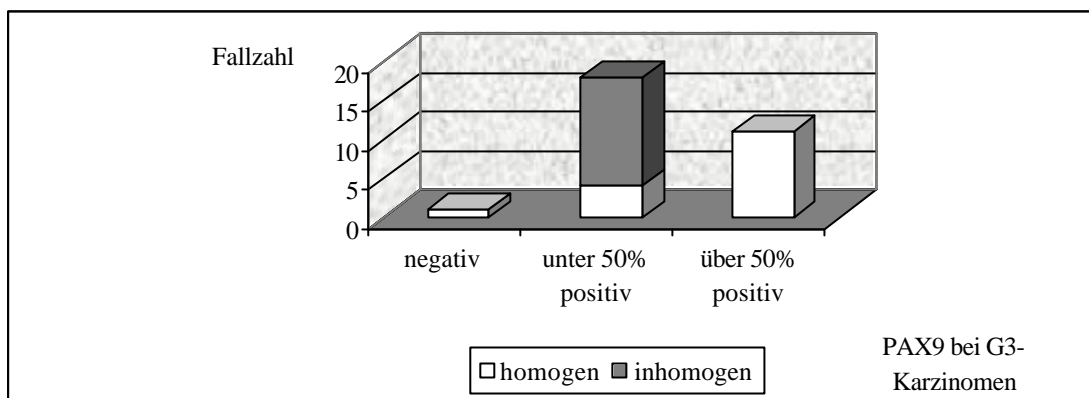


Abb. 3.26: PAX9-Expression in schlecht differenzierten Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

In dieser Gruppe existierten weiterhin zwei G3-Karzinome mit einer spindelzelligen Karzinomkomponente. Diese spindelzelligen Anteile waren vollständig PAX9-negativ, während sich in den epithelial differenzierten Bereichen eine PAX9-Expression nachweisen ließ. Zwei der G3-Karzinompräparate enthielten PAX9-negative nekrotische Tumorareale. Bei fünf Fällen mit inhomogener PAX9-Expression waren die epithelnah gelegenen invasiven Bereiche stärker PAX9-positiv als die Karzinomzellen in größerer Entfernung vom Epithel; mit zunehmender Invasionstiefe exprimierten die malignen Zellen kein PAX9 mehr. Zu einem dieser Präparate mit lediglich oberflächennah PAX9-positiven Tumorarealen existierte auch ein Präparat einer zugehörigen Lymphknotenmetastase; diese war PAX9-negativ.

Ein weiteres Präparat wies eine kontinuierliche Abnahme der Expressionsstärke vom PAX9-positiven Areal bis hin zum negativen Bereich auf, ohne dass ein Zusammenhang zur Nähe des Epithels gesehen werden konnte.

Auf fünf Schnittpräparaten konnte eine Infiltration der Lymphgefäße mit Tumorzellen im Sinne einer Lymphangiosis carcinomatosa festgestellt werden. Die infiltrierenden Karzinomzellen waren in diesen fünf Fällen PAX9-positiv, in zwei Fällen war der Anteil PAX9-exprimierender Zellen hier sogar höher als in den invasiven Tumorinseln.

Bei 21 der niedrig differenzierten Karzinome konnte auf demselben Schnitt neben dem Tumorgewebe auch normales ösophageales Epithel beurteilt werden, unter anderem auch auf dem PAX9-negativen Karzinomschnitt. In all diesen 21 Fällen zeigte das Epithel ein unauffälliges PAX9-Expressionsmuster.

Ein Vergleich der Reaktionsstärke im Tumor sowie im gering- bis mäßiggradig dysplastischen Plattenepithel war in 13 Fällen möglich. Hier konnte in drei Fällen kein

Unterschied festgestellt werden, während die *PAX9*-Expression im dysplastischen Epithel in den restlichen zehn Fällen deutlich stärker war.

Bei 15 Karzinomen konnte die Expression im Tumor der Expression im hochgradig dysplastischen Epithel gegenübergestellt werden (vgl. Abb. 3.27). In fünf Fällen war die Expression im Tumor in Relation zur Expression im dysplastischen Epithel erhöht, bei sechs Fällen vermindert, und bei vier Schnittpräparaten fand sich kein wesentlicher Unterschied.

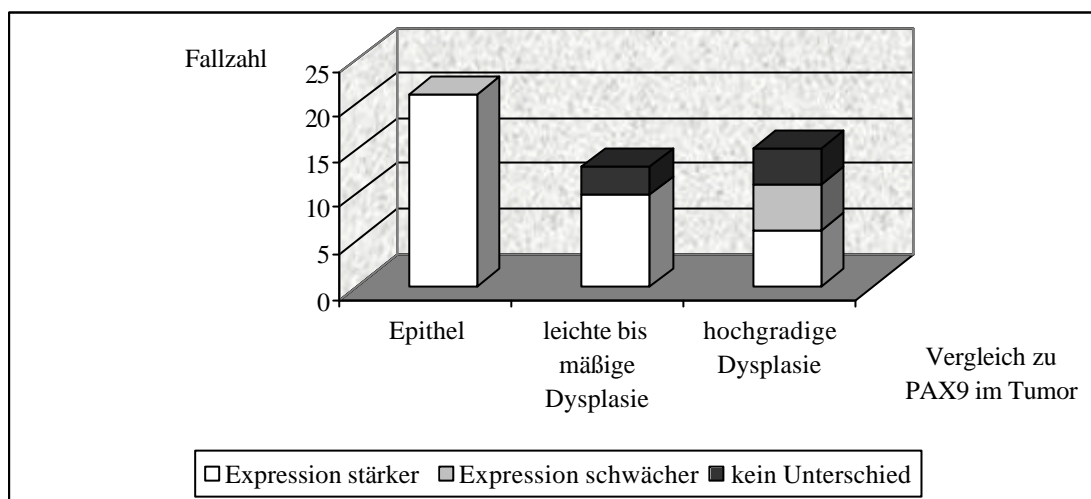


Abb. 3.27: Vergleich der *PAX9*-Expression im gesunden Epithel, im gering- bis mäßiggradig dysplastischen Epithel und im hochgradig dysplastischen Epithel mit der Expression im invasiven Ösophaguskarzinom (G3)

3.1.4.4 *PAX9*-Expression im Tumor bezogen auf den Differenzierungsgrad (Grading)

Die Klassifikation entsprechend einem guten, mäßiggradigen oder schlechten Differenzierungsgrad wurde im Abschnitt „Material und Methoden“ erläutert.

Durch eine Gegenüberstellung der *PAX9*-Expression in den gut, mittel und schlecht differenzierten Karzinomen sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der *PAX9*-Expression und dem Differenzierungsgrad aufgedeckt werden.

Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad der Karzinome und dem Anteil *PAX9*-positiver Tumorzellen war nicht ersichtlich (vgl. Abb. 3.28).

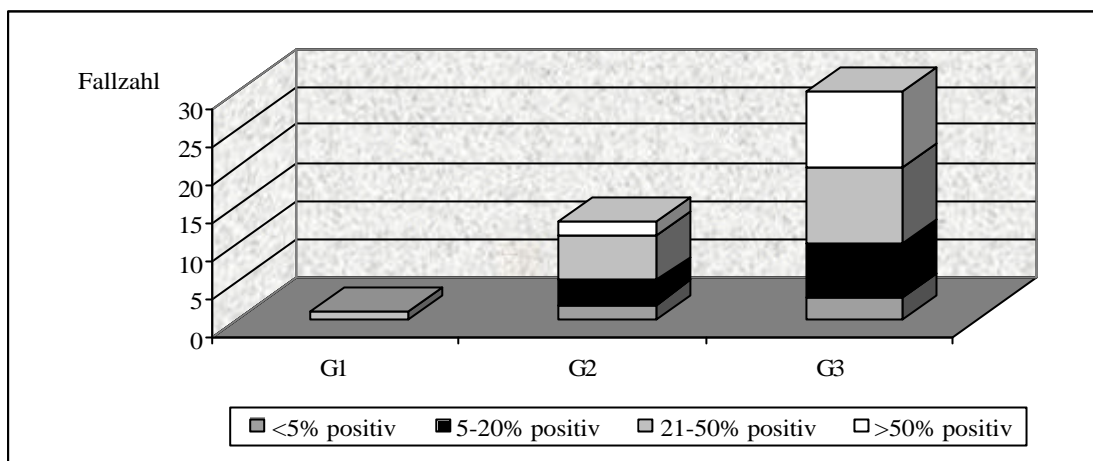


Abb. 3.28: Anteil PAX9-positiver Tumorzellen in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus bezogen auf den Differenzierungsgrad

3.1.4.5 PAX9-Expression im Tumor bezogen auf das T-Stadium

Das T-Stadium der TNM-Klassifikation dient zur Beschreibung der Infiltrationstiefe des Karzinoms (siehe „Material und Methoden“). Bei 43 operativ entfernten Präparaten war eine Bestimmung des Tumorstadiums möglich. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ermittelt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Ausdehnung des Karzinoms und dem Anteil PAX9-positiver Karzinomzellen besteht. Ein solcher Zusammenhang ließ sich jedoch nicht nachweisen (vgl. Abb. 3.29).

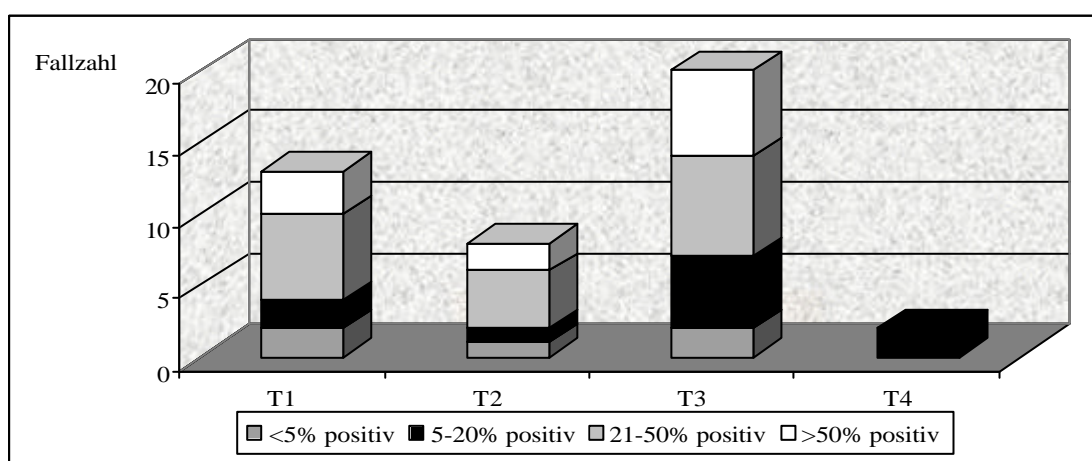


Abb. 3.29: PAX9-Expression und Tumor-Stadium bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

3.1.4.6 PAX9-Expression im Tumor bezogen auf den Lymphknotenstatus

Bei den untersuchten Karzinompräparaten wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der *PAX9*-Expression im Tumor und dem Befall regionärer Lymphknoten durch das Karzinom besteht. Eine Verbindung zwischen dem Anteil *PAX9*-exprimierender Tumorzellen und dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen ließ sich jedoch nicht nachweisen (vgl. Abb. 3.30).

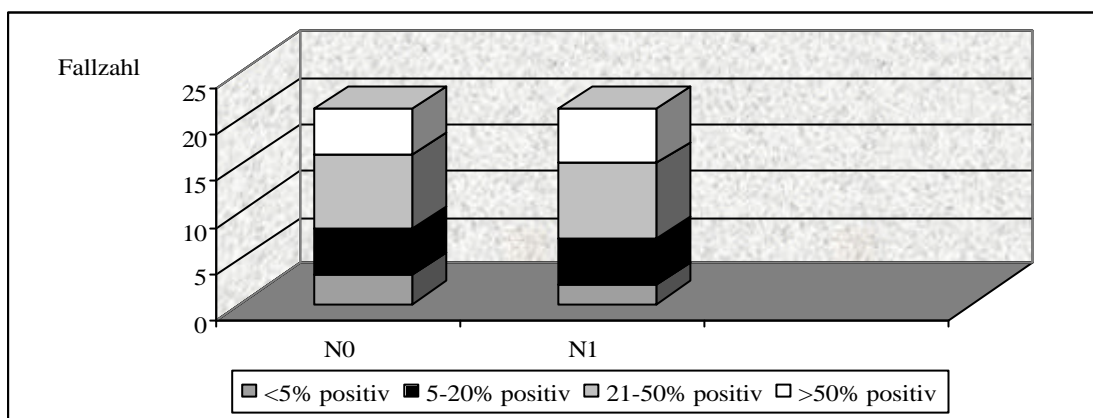


Abb. 3.30: PAX9-Expression und Lymphknotenstatus in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

3.1.5 Die PAX9-Expression im Barrett-Ösophagus

PAX9 wird hauptsächlich im mehrschichtigen Plattenepithel unterschiedlicher Lokalisation exprimiert. Wie jedoch die immunhistochemischen Studien vor allem der ösophagealen Wandschichten, aber auch des Pharynx oder der Cervix uteri zeigten, lässt sich das *PAX9*-Protein zum Teil auch in submukösen Drüsenepithelien nachweisen. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die *PAX9*-Expression in ösophagealer Mucosa mit intestinaler Metaplasie oder Dysplasie untersucht.

3.1.5.1 Die Expression von PAX9 im metaplastischen ösophagealen Zylinderepithel

Es fanden sich insgesamt neun Epithelstellen mit metaplastischem Zylinderepithel ohne Atypien im Sinne einer epithelialen Dysplasie.

Hiervon konnte in vier Fällen kein *PAX9* im metaplastischen Epithel gefunden werden. Eines dieser Präparate wies zwar eine zytoplasmatische Färbung auf, wurde jedoch als negativ gewertet, da *PAX9* als Transkriptionsfaktor ein nukleäres Protein ist. Auf einem Schnitt

fanden sich sowohl positive als auch negative Areale. Bei vier weiteren Fällen wurde *PAX9* von allen Zellen des Zylinderepithels exprimiert (vgl. Abb. 3.31).

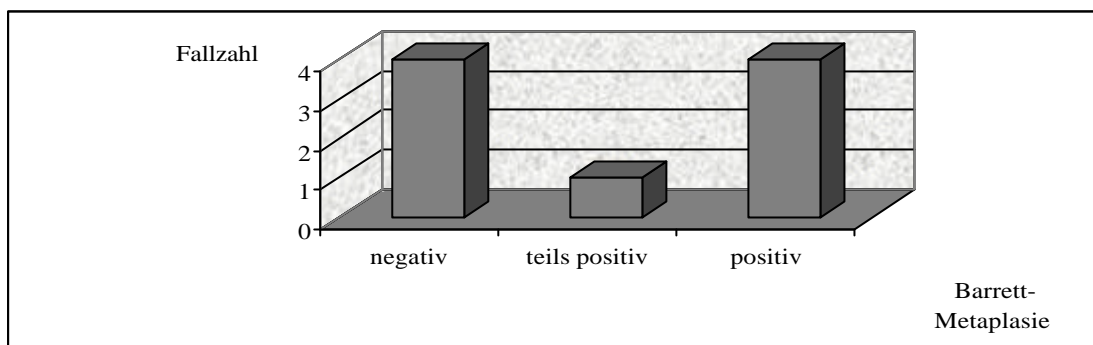


Abb. 3.31: PAX9-Expression im metaplastischen Zylinderepithel des Ösophagus

3.1.5.2 Die Expression von PAX9 im dysplastischen Barrett-Epithel

Die neun Fälle mit dysplastischem Barrett-Zylinderepithel im Ösophagus ließen sich in fünf Fälle mit leichter bis mäßiger Dysplasie und vier Fälle mit hochgradiger Dysplasie unterteilen. Unter den leicht-bis mäßiggradigen Dysplasien fanden sich zwei PAX9-negative Proben, ein Beispiel mit einem Anteil positiver Kerne von 40% und zwei Fälle, bei denen alle Zylinderepithelzellen PAX9 enthielten (vgl. Abb. 3.32).

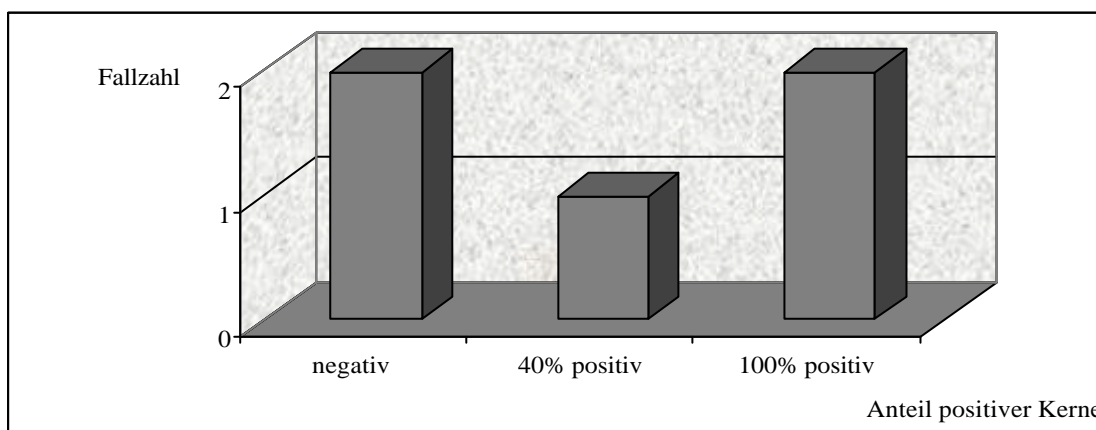


Abb. 3.32: PAX9-Expression im leicht- bis mäßiggradig dysplastischen Zylinderepithel des Ösophagus

Von den vier hochgradigen Dysplasien waren zwei teilweise PAX9-positiv (30% bzw. 40% positive Kerne). Zwei Fälle waren PAX9-negativ (vgl. Abb. 3.33).

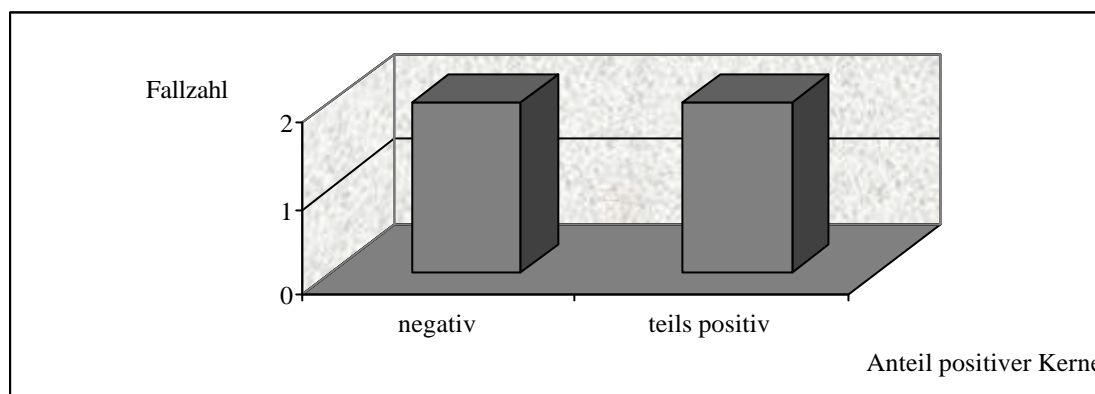


Abb. 3.33: PAX9-Expression im hochgradig dysplastischen Zylinderepithel des Ösophagus

3.1.5.3 Die Expression von PAX9 im invasiven Barrett-Karzinom

Untersucht wurden 14 invasive Adenokarzinome des distalen Ösophagus. Davon wiesen fünf Fälle immunhistochemisch eine zytoplasmatische Anfärbung auf; da PAX9 als Transkriptionsfaktor allerdings seine Funktion im Zellkern ausübt, wurden diese Fälle als negativ gewertet. Somit waren neun von 14 Adenokarzinomen PAX9-negativ (64%). Bei vier Präparaten belief sich der Anteil positiver Zellen auf bis zu 50%, meist fanden sich hierbei nur inhomogen eingestreute positive Zellgruppen. Nur in einem Fall war in allen Kernen des Adenokarzinoms PAX9 nachzuweisen (vgl. Abb. 3.34).

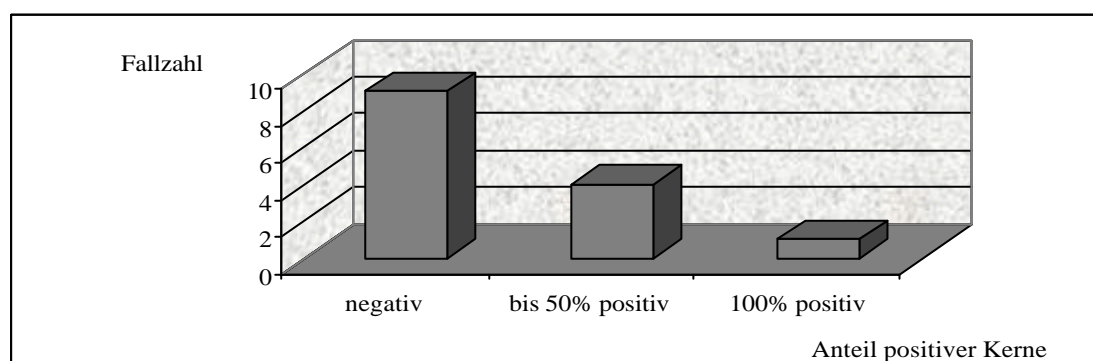


Abb. 3.34: PAX9-Expression im invasiven Adenokarzinom des Ösophagus

Bezüglich ihres Malignitätsgrades ließen sich die Adenokarzinome in einem Fall als G1, in neun Fällen als G2 und in vier Fällen als G3 bzw. G4 klassifizieren. Der G1-Fall war PAX9-negativ. Unter den als G2 eingeordneten Barrettkarzinomen befanden sich fünf negative, drei teilweise positive und ein 100% positiver Schnitt. Unter den hochmalignen G3- und G4-Präparaten enthielt ein Schnitt PAX9-positive Kerne, die anderen drei Präparate waren negativ (vgl. Abb. 3.35).

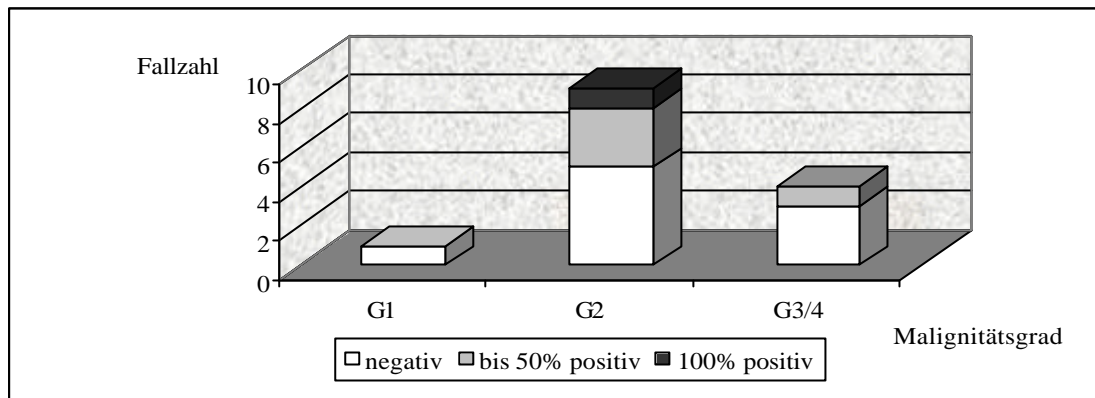


Abb. 3.35: PAX9-Expression bei gut, mäßig und schlecht differenzierten Adenokarzinomen des Ösophagus

Verglichen mit der *PAX9*-Expression im dysplastischen Zylinderepithel war in einem Fall eines G2-Karzinoms die Expression im invasiven Anteil gesteigert. Dagegen war im Falle des G1-Karzinoms das dysplastische Epithel teilweise *PAX9*-positiv, während das invasive Karzinom kein *PAX9* exprimiert. Weiterhin enthielten zwei Schnittpräparate sowohl metaplastisches Epithel ohne Dysplasie und invasive Adenokarzinome der Malignitätsstufe G2. Hiervon waren in einem Fall sowohl die Plattenepithelmetaplasie als auch die Tumorzellinseln *PAX9*-negativ, während im zweiten Fall beide positiv waren.

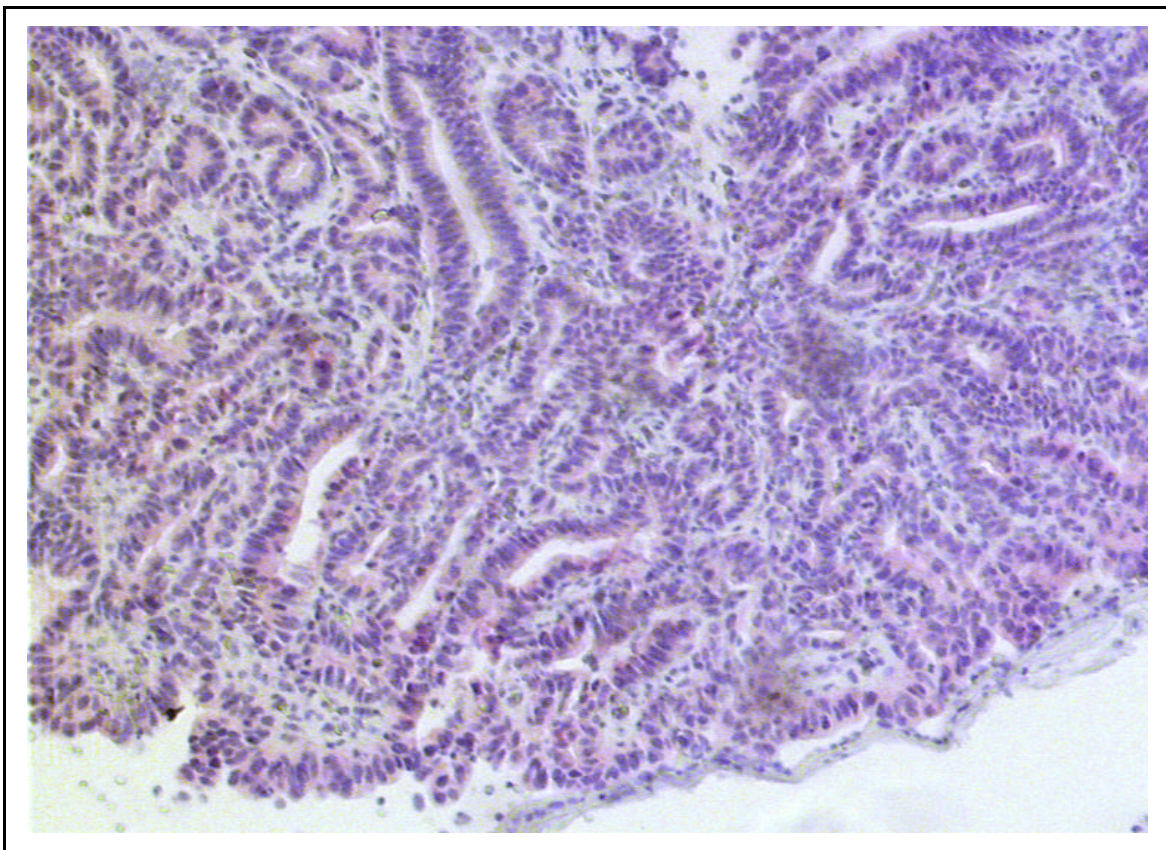


Abb. 3.36: Immunhistochemische Darstellung der *PAX9*-Expression im Barrett-Karzinom

3.1.6 Zusammenfassung: Die PAX9-Expression im gesunden und dysplastischen Ösophagusepithel und in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

Die Untersuchungen am gesunden Plattenepithel des menschlichen Ösophagus zeigten, dass sich die Expression von *PAX9* in Abhängigkeit von der Zellmigration nach luminal verändert. Während dieser Zellmigration von basal nach luminal durchlaufen die Epithelzellen einen Differenzierungsprozess. Als Ergebnis dieser Ausreifung entstehen die Superfizialzellen, die mechanischen und chemischen Einflüssen standhalten können.

Auffällig war die uneinheitliche *PAX9*-Expression in der Basalzellschicht des Ösophagusepithels. Bei 35% der untersuchten Präparate waren die Basalzellen *PAX9*-negativ, bei 33% wurde das *PAX9*-Protein in allen Kernen der Basalzellschicht detektiert.

In der Schicht der Suprabasalzellen war die Fraktion *PAX9*-positiver Zellkerne höher als in der Basalzellschicht. Die weitgehend ausgereiften Stachelzellen des Stratum spinosum waren mit einer Ausnahme *PAX9*-positiv. Dagegen konnte bei den Superfizialzellen in 79% der Fälle ein Verlust der *PAX9*-Expression beobachtet werden.

Bemerkenswert war die starke *PAX9*-Expression in den submukösen Drüsenepithelien des Ösophagus. In allen 18 Präparaten mit Drüsenepithelzellen wurde *PAX9* exprimiert.

Bei der Untersuchung von Arealen mit Basalzellhyperplasie fiel auf, dass die hyperplastischen Basalzellen stärker *PAX9* exprimierten als die Basalzellen im unauffälligen Epithel. Bei 87% der Präparate mit Basalzellhyperplasie ließ sich *PAX9* in den Kernen nachweisen.

Die *PAX9*-Expression in den 45 Präparaten mit Anteilen von gering- bis hochgradig dysplastischem Plattenepithel wurde mit der Expression im gesunden Epithel verglichen. Es fand sich eine Abnahme der Genexpression mit zunehmendem Schweregrad der Dysplasie.

In Fällen mit geringgradiger Dysplasie ließ sich kein wesentlicher Unterschied zur *PAX9*-Expression im gesunden Epithel feststellen. Dagegen war die *PAX9*-Expression in Arealen mit mäßiggradiger Dysplasie in 75% der Fälle gegenüber der Expression im normalen Epithel vermindert, in Arealen mit hochgradiger Dysplasie sogar in 93% der Fälle.

Diese Tendenz der Verringerung des *PAX9*-Gehalts mit zunehmendem Dysplasiegrad zeigte sich auch bei der Auswertung von Schnittpräparaten, die gleichzeitig geringgradig und

hochgradig dysplastisches Epithel enthielten. Hier war die *PAX9*-Expression in 78% der Fälle in der hochgradigen Dysplasie geringer als in der leichten Dysplasie.

Die Resultate bei der Untersuchung der *PAX9*-Expression in 44 invasiven Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus waren weniger einheitlich.

Drei Karzinome (7%) exprimierten kein *PAX9*, bei weiteren zwei Fällen (5%) war das Protein nur vereinzelt in Karzinomzellen enthalten. Die restlichen 39 Fälle (89%) waren *PAX9*-positiv, wobei der Anteil der positiven Tumorzellen von 10 bis 100% reichte. In je etwa der Hälfte der Fälle fand sich ein einheitliches (57%) bzw. inhomogenes (43%) Expressionsmuster in den invasiven Arealen.

Dennoch ließen sich in diesen komplexen Expressionsmustern einige wiederkehrende Motive herausarbeiten. Bei neun Karzinomen mit epithelnahen invasiven Anteilen konnte beobachtet werden, dass die näher am Oberflächenepithel lokalisierten Tumorabschnitte eine stärkere *PAX9*-Expression aufwiesen als die epithelfernen Anteile. Bei einem weiteren Karzinom fand sich in den Randbereichen der invasiven Malignominseln eine stärkere *PAX9*-Expression als im Zentrum der Tumorinseln. Ein anderes Präparat wies vereinzelt Hornperlen auf; die den verhornenden Arealen benachbarten Tumorzellen zeigten eine verstärkte *PAX9*-Expression. Zwei weitere Karzinome wurden aufgrund einer spindelzelligen Tumorkomponente als gering differenziert eingestuft. Während die entdifferenzierten Spindelzellanteile kein *PAX9* enthielten, konnte in den anderen Tumorarealen *PAX9* detektiert werden.

Allerdings konnte keine Korrelation zwischen der *PAX9*-Expression und dem Malignitätsgrad der Karzinome (Grading) festgestellt werden. Ferner ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Ausdehnung des Primärtumors (T-Stadium) bzw. dem Lymphknotenbefall (N-Stadium) und der Expression von *PAX9* nachweisen.

Bei 30 der 44 Karzinome konnte die Expression im Tumor mit der Expression im gesunden Plattenepithel verglichen werden. In allen 30 Fällen war die Expression in den invasiven Arealen schwächer als im normalen Epithel.

Weiterhin war in fünf Fällen neben invasiven Karzinomen auch gering- bis mäßiggradig dysplastisches Epithel enthalten; in diesen fünf Fällen war die Expression im Karzinom ebenfalls schwächer als in der Dysplasie.

Dagegen zeigte sich beim Vergleich von Karzinom und acht Fällen hochgradiger Epitheldysplasie, dass die Expression im Karzinom nur in fünf Fällen schwächer war als im Epithel. In zwei Fällen konnte kein Unterschied festgestellt werden, während die *PAX9*-Expression im Tumor in einem Fall sogar gesteigert war.

In der Zusammenschau der Ergebnisse zeigt sich eine Abnahme der PAX9-Expression vom gesunden Epithel über die verschiedenen Schweregrade der Dysplasie bis hin zum invasiven Karzinom. Eine PAX9-Überexpression im Ösophaguskarzinom konnte nicht beobachtet werden.

Neben Läsionen des ösophagealen Plattenepithels und invasiven Plattenepithelkarzinomen wurden in dieser Arbeit auch Präparate mit ösophagealer Zylinderzellmetaplasie, -dysplasie sowie invasive Barrettkarzinome untersucht. Die Ergebnisse hier waren jedoch sehr uneinheitlich. Unter den benignen wie den malignen Veränderungen befanden sich PAX9-positive und PAX9-negative Präparate. Ein Zusammenhang zwischen Morphologie und PAX9-Expression kann hier nicht hergestellt werden.

3.2 Das Expressionsmuster von PAX9 im gesunden und dysplastischen Plattenepithel der Cervix uteri und in invasiven Cervixkarzinomen

Bislang liegen noch keine Publikationen über die Expression von *PAX9* im Plattenepithel der Cervix uteri vor. Auch zur Expression der anderen Gene der *PAX*-Gruppe in der Ektozervix existieren bis dato keine Untersuchungen.

Das Pax9-Protein lässt sich im mehrschichtigen nichtverhornenden Plattenepithel der menschlichen Cervix uteri nachweisen. Analog zum Ösophagusepithel zeigt sich in den einzelnen Schichten des gesunden Epithels ein spezifisches Expressionsmuster.

3.2.1 Das Expressionsmuster von PAX9 im normalen Plattenepithel der Cervix uteri

Der histologische Aufbau des zervikalen Plattenepithels entspricht dem Aufbau des unverhornten ösophagealen Plattenepithels:

Die undifferenzierten Zellen des nur aus einer Zellschicht bestehenden Stratum basale grenzen direkt an die Basalmembran. Sie sind der proliferative Pool des Epithels.

Im Rahmen der Zellteilung verlieren die Tochterzellen den Kontakt zur Basalmembran und durchwandern die anschließenden Schichten des Stratum suprabasale und des Stratum

spinosum. Dabei flachen sie stetig ab und befinden sich schließlich als Superfizialzellen auf der luminalen Seite des Epithels, wo sie abgeschilfert werden (Herber, 1995)

In der vorliegenden Arbeit wurden 29 Schnittpräparate mit Arealen eines unauffälligen zervikalen Plattenepithels ausgewertet. Bei Betrachtung der Expression von *PAX9* in den Plattenepithelzellen der Cervix uteri fanden sich mehrere wiederkehrende Muster.

Im Folgenden soll das *PAX9*-Expressionsmuster im Verlauf durch die ganze Breite der Epithelschicht von der Basalmembran zum Lumen des Zervikalkanals hin betrachtet werden.

3.2.1.1 Die Expression von *PAX9* in den Basal- und Suprabasalzellen

Die der Basalmembran benachbarten Zellschichten, das heißt die Basal- und Suprabasalzellen, zeigten im Normalfall keine oder höchstens eine schwache Expression von *PAX9* in einer geringen Zahl von Zellkernen (vgl. Abb. 3.37).

In der Mehrzahl der Fälle, d. h. bei 23 von 29 Schnittpräparaten (80%), konnte in den Basalzellen kein *PAX9* detektiert werden. Bei zwei Präparaten belief sich der Anteil *PAX9*-exprimierender Basalzellen auf 30 bzw. 40%, die anderen vier Fälle mit teilweise *PAX9*-positiven basalen Zellen wiesen einen wesentlich geringeren Anteil auf.

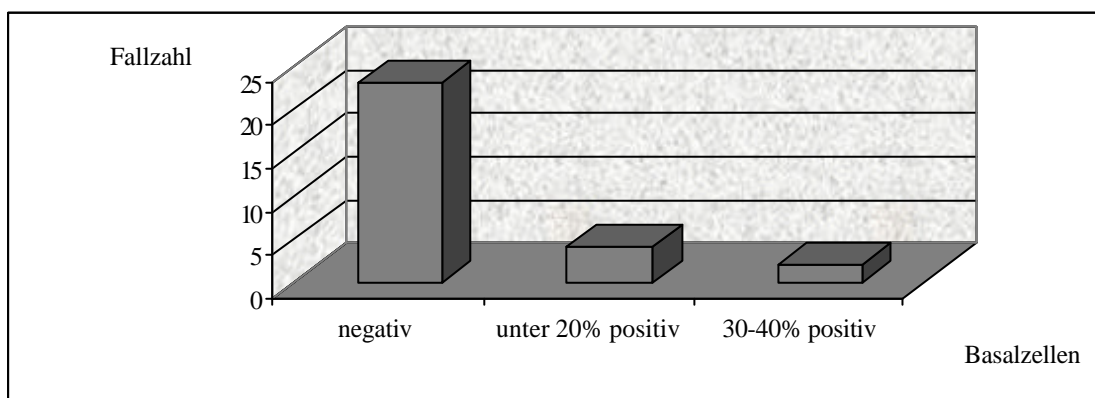


Abb. 3.37: Expression von *PAX9* in den Basalzellen des Plattenepithels der Cervix uteri

Der durchschnittliche Anteil *PAX9*-positiver Basalzellen belief sich insgesamt auf nur 10%. Dagegen waren in der suprabasalen Zellschicht deutlich weniger Fälle vollständig *PAX9*-negativ, insgesamt mit 13 Fällen weniger als die Hälfte (45%). Allerdings war auch hier bei den *PAX9*-enthaltenden Präparaten der Anteil *PAX9*-exprimierender Zellen eher gering (vgl. Abb. 3.38): Nur bei drei Schnittpräparaten betrug der Prozentsatz positiver Suprabasalzellen 30 bis 40%, bei den restlichen 13 Fällen war der Anteil positiver Zellen noch geringer.

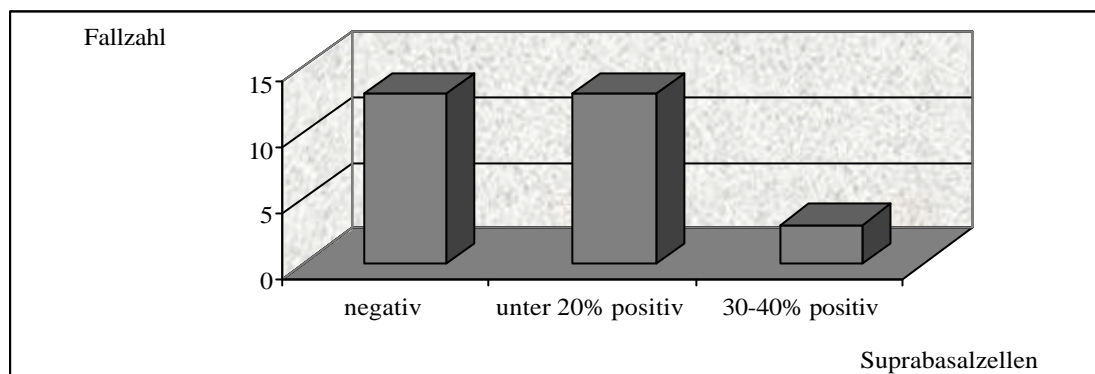


Abb. 3.38: Expression von PAX9 in den suprabasalen Zellen des Plattenepithels der Cervix uteri

Bei PAX9-negativen Basalzellen konnte auch in den Suprabasalzellen in keinem Fall PAX9 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.39).

Vier Schnittpräparate wiesen eine Expression von PAX9 sowohl in den Basalzellen als auch in der suprabasalen Zellschicht auf; es waren im Mittel 21% der Zellen positiv. Allerdings streute dieser Anteil positiver Zellen im Bereich zwischen 5% und 40%.

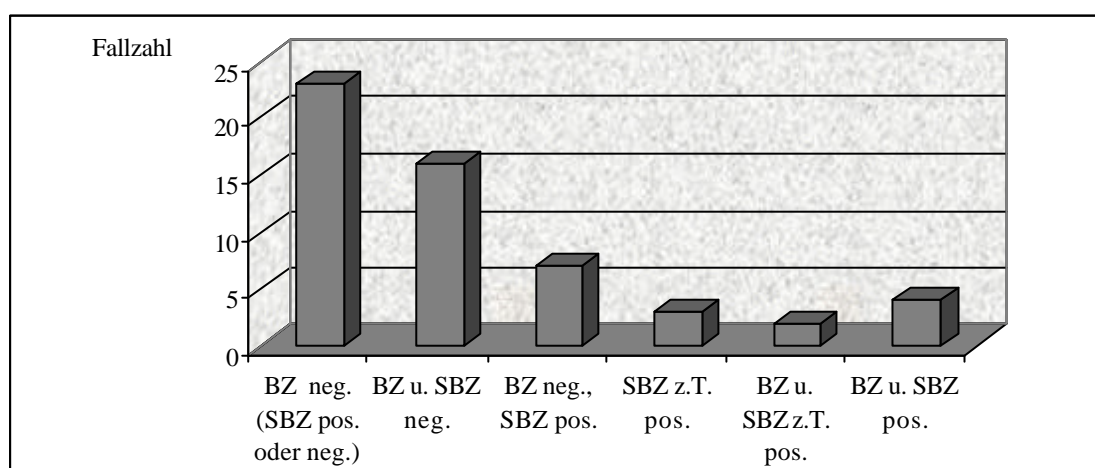


Abb. 3.39: PAX9-Expression in Basalzellen (BZ) und Suprabasalzellen (SBZ) des Plattenepithels der Cervix uteri

Bei fünf Schnittpräparaten konnten bei überwiegend PAX9-negativen Basal- und/ oder Suprabasalzellen dennoch an umschriebenen Stellen kleine Gruppen PAX9-exprimierender (Supra-) Basalzellen detektiert werden. Waren lediglich die Suprabasalzellen an einzelnen Epithelstellen positiv, so hielt sich dieser Anteil positiver Zellen unter 5%; dies war bei drei Schnittpräparaten der Fall. Bei zwei Präparaten fand sich PAX9 hingegen stellenweise sowohl in den Basal- als auch in den Suprabasalzellen, und hier waren 40% dieser Zellkerne positiv.

3.2.1.2 Die Expression von PAX9 in den mittleren und oberflächlichen Epithelschichten

Bei der Ausreifung der Zellen nach luminal nahm der Anteil PAX9-positiver Zellkerne zu. In den mittleren Epithelbereichen wird *PAX9* im Gegensatz zur Basal- und Suprabasalzellschicht in der Mehrzahl der Kerne exprimiert (vgl. Abb. 3.40).

Bei 27 der 29 untersuchten Präparate waren alle Zellen des Stratum spinosum PAX9-positiv (93%). Nur in je einem Fall färbten sich weniger als 5% der Kerne bzw. 70% der Kerne an.

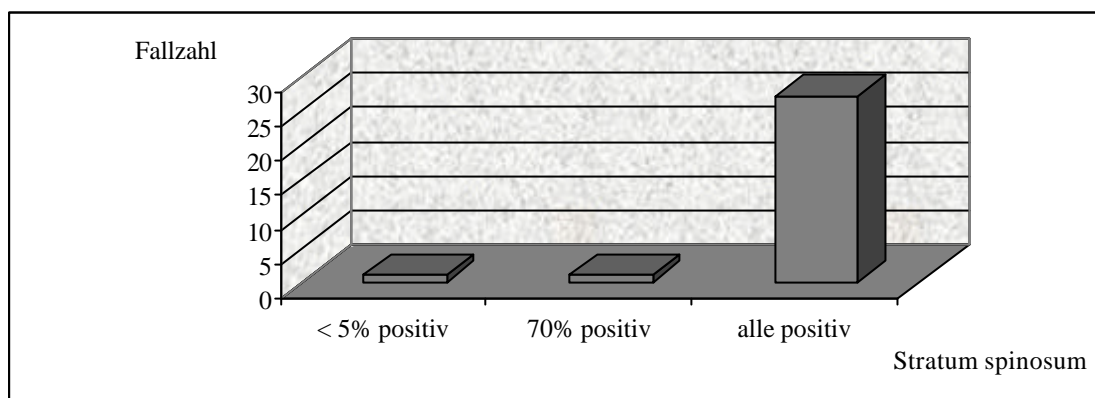


Abb. 3.40: Anteil PAX9-positiver Zellen im Stratum spinosum des Plattenepithels der Cervix uteri

Zur Epitheloberfläche hin nahm der Anteil *PAX9*-exprimierender Zellen ab, teils konnte auch ein abrupter Verlust der Reaktion beobachtet werden. Die Zellen des Stratum superficiale waren in allen 29 Fällen PAX9-negativ (vgl. Abb. 3.41).

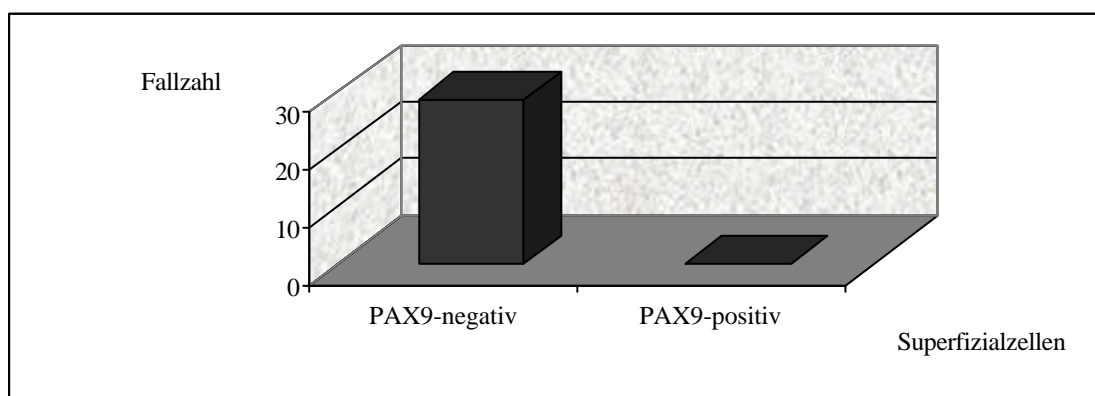


Abb. 3.41: PAX9-Expression im Stratum superficiale des Zervixepithels

3.2.1.3 Zusammenfassung: Die PAX9-Expression in den verschiedenen Schichten des Plattenepithels der Cervix uteri

Bei der Untersuchung der *PAX9*-Expression im Plattenepithel der Cervix uteri fiel auf, dass die verschiedenen Schichten innerhalb des Epithels ebenso wie im Ösophagusepithel unterschiedliche Anteile *PAX9*-positiver Zellen besitzen.

In der Mehrzahl der untersuchten Präparate (79%) ließ sich kein *PAX9* in den Basalzellen nachweisen; fand doch eine *PAX9*-Expression statt, belief sich der Anteil *PAX9*-positiver Zellen im Durchschnitt auf weit weniger als 40%. Dagegen waren die Suprabasalzellen nur auf 45% der Schnittpräparate vollständig *PAX9*-negativ. Im Stratum spinosum ließ sich das Protein in 97% der Präparate nachweisen, der Anteil *PAX9*-positiver Zellen war mit einer Ausnahme stets größer als in der Basal- und Suprabasalzellschicht. Die Superficialzellen waren in allen Fällen *PAX9*-negativ.

Dieses Expressionsmuster entspricht im Wesentlichen der *PAX9*-Expression im Ösophagusepithel.

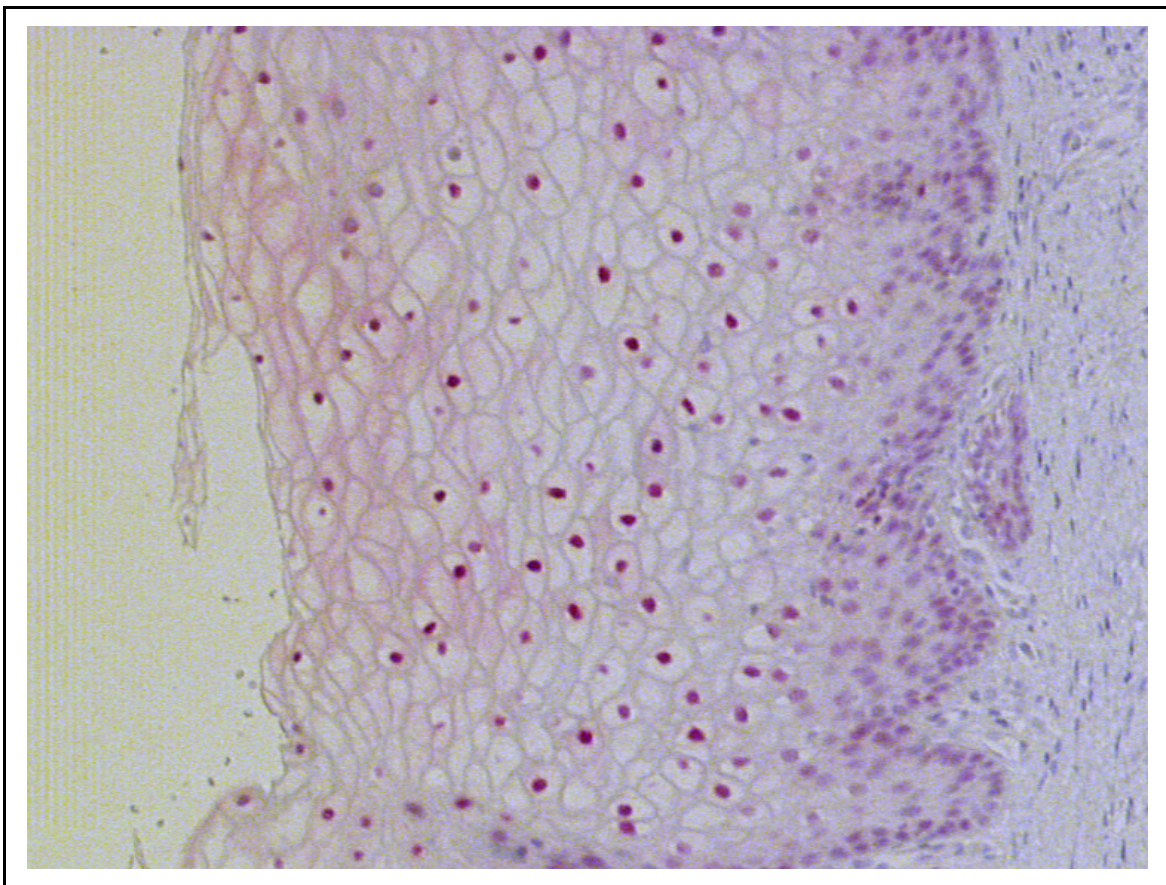


Abb. 3.42: Immunhistochemische Darstellung der *PAX9*-Expression im Plattenepithel der Cervix uteri

3.2.1.4 Die PAX9-Expression am Übergang zum Zylinderepithel der Endocervix

Die Zylinderepithelzellen der Endocervix waren überwiegend PAX9-negativ. Jedoch konnte bei insgesamt fünf Schnittpräparaten, auf denen der Übergang von Plattenepithel zum Zylinderepithel erkennbar war, gezeigt werden, dass die Zylinderepithelzellen des Übergangs PAX9 exprimieren (vgl. Abb. 3.43). Die Expression bleibt dabei auf eine kleine Zahl Zylinderepithelzellen beschränkt. Bei sieben Schnittpräparaten waren die auf das Plattenepithel folgenden Zylinderepithelzellen jedoch negativ.

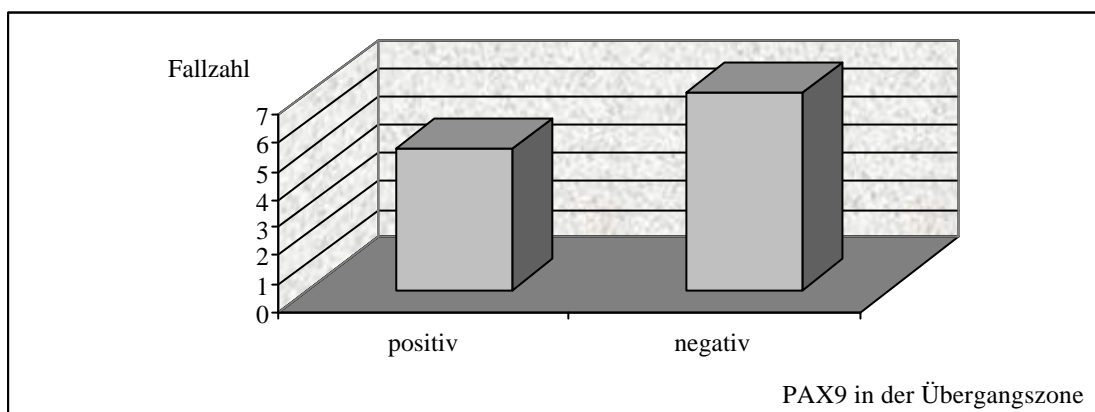


Abb. 3.43: PAX9-Expression im Zylinderepithel der zervikalen Junctionszone

Außerdem war in 13 Fällen ersichtlich, dass in umschriebenen Bereichen des Zylinderepithels oder submuköser zervikaler Drüsen eine PAX9-Expression stattfand, die sich dann jedoch stets auf kleinere Zellgruppen beschränkte.

3.2.2 Das Expressionsmuster im dysplastischen Plattenepithel der Cervix uteri

An präneoplastischen Läsionen des Cervixepithels wurden 31 Schnittpräparate mit cervikalen Dysplasien unterschiedlichen Schweregrades (CIN I – III) immunhistochemisch angefärbt und ausgewertet.

Ebenso wie bei den untersuchten Läsionen des Ösophagus konnte auf einigen Schnittpräparaten die immunhistochemische Reaktion im unauffälligen Plattenepithel mit der Anfärbung im dysplastischen Epithel oder im invasiven Karzinom direkt verglichen werden.

3.2.2.1 PAX9-Expression in leicht- und mittelgradigen Epitheldysplasien (CIN I und CIN II)

Bei insgesamt elf Schnittpräparaten fanden sich Epithelabschnitte mit einer leichten oder mäßiggradigen Dysplasie entsprechend CIN I (vier Fälle) oder CIN II (sieben Fälle). Im Vergleich zu der eher gleichförmigen Expression im normalen Plattenepithel besitzt die Expression im dysplastischen Plattenepithel ein wesentlich vielfältigeres Erscheinungsbild (vgl. Abb. 3.44). In sieben von elf Fällen (63,6%) exprimierten die basalen Zellen kein *PAX9*. Bei drei Schnittpräparaten enthielten 10 bis 30% der Basalzellen das *PAX9*-Protein, und in einem Fall waren alle Basalzellen *PAX9*-positiv.

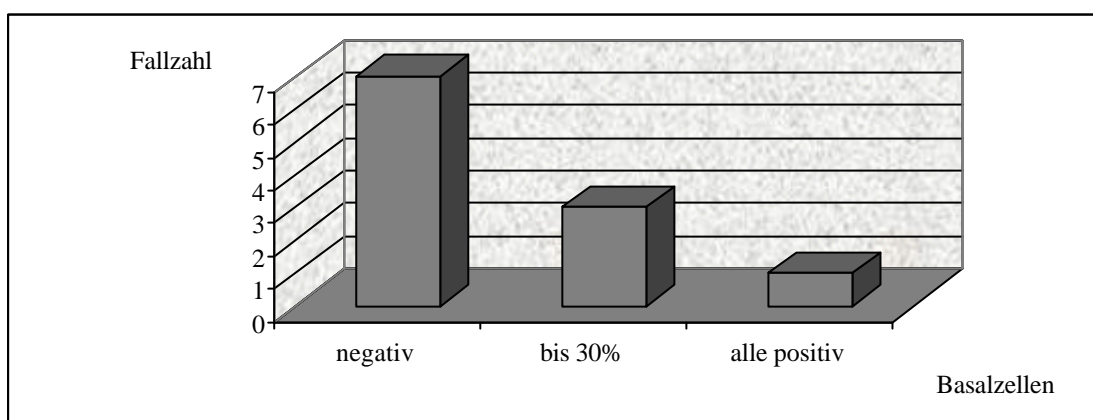


Abb. 3.44: PAX9-Expression in Basalzellen des leicht- und mäßiggradig dysplastischen Plattenepithels der Cervix uteri (CIN I und CIN II)

Bei Betrachtung der *PAX9*-Expression in den Keratinozyten in der Epithelmitte fand sich das Protein in fünf Fällen in allen Kernen, zwei Fälle waren *PAX9*-negativ, je einmal belief sich der Anteil *PAX9*-positiver Kerne auf 5 bzw. 30%, zwei weitere Schnittpräparate enthielten in der mittleren Epithelschicht je 70% *PAX9*-exprimierende Keratinozyten (vgl. Abb. 3.45).

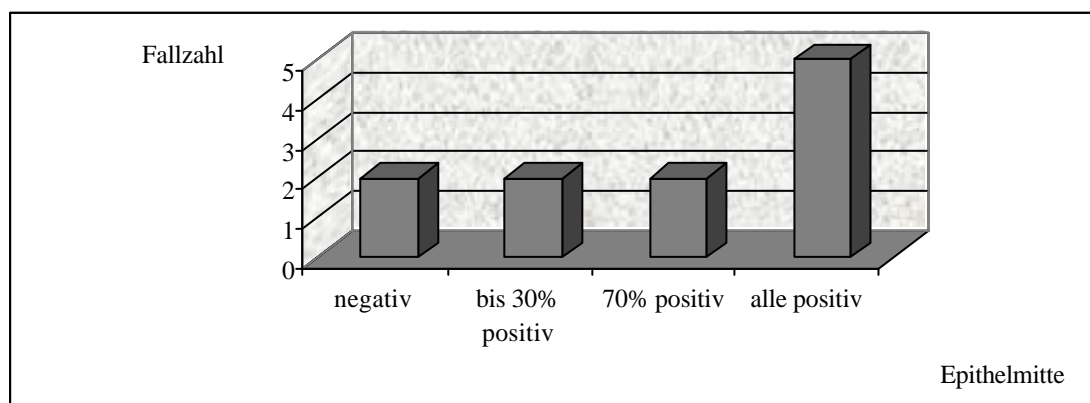


Abb. 3.45: PAX9-Expression in der Epithelmitte des leicht- und mäßiggradig dysplastischen Plattenepithels der Cervix uteri (CIN I und CIN II)

Die luminal gelegenen Zellen waren in sieben von elf Fällen (64%) PAX9-negativ. Bei zwei weiteren Schnittpräparaten waren nur vereinzelt positive Kerne sichtbar, und in je einem Fall enthielten 70% bzw. alle Kerne das Protein (vgl. Abb. 3.46).

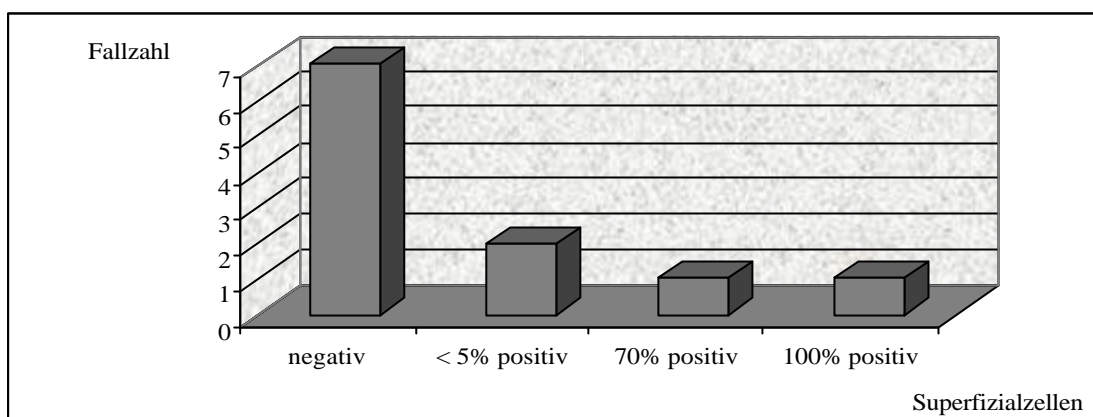


Abb. 3.46: PAX9-Expression in Superfizialzellen des leicht- und mäßiggradig dysplastischen Plattenepithels der Cervix uteri (CIN I und II)

Bei acht der elf untersuchten Gewebeproben war ein direkter Vergleich mit auf demselben Schnittpräparat enthaltenen normalen Plattenepithel möglich.

In vier Fällen war der Anteil PAX9-positiver Zellen in den dysplastischen Epithelarealen geringer als im gesunden Epithel, in drei Fällen konnte kein Unterschied festgestellt werden, und bei einer Probe schien die *PAX9*-Expression in der Dysplasie gesteigert zu sein.

3.2.2.2 Die PAX9-Expression in hochgradigen Epitheldysplasien (CIN III) der Cervix uteri

Auf 20 Schnittpräparaten fanden sich Anteile eines hochgradig dysplastischen Plattenepithels im Sinne einer CIN III. Eine Differenzierung der Epithelzellen von basal nach luminal war nicht mehr erkenntlich. Die Ausprägung der *PAX9*-Expression war hier nicht einheitlich (vgl. Abb. 3.47). Die Fraktion PAX9-positiver Zellen lag bei 16 Präparaten zwischen 20 und 80%, in drei Fällen waren nur vereinzelte Zellen positiv, und bei einem weiteren Präparat wurde *PAX9* in allen dysplastischen Zellen exprimiert.

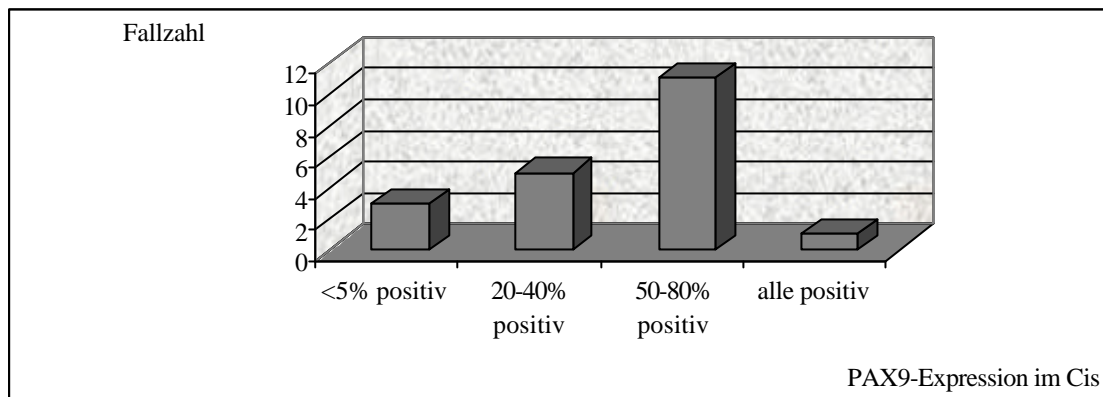


Abb. 3.47: Expression von PAX9 im hochgradig dysplastischen Plattenepithel der Cervix uteri (CIN III)

Bei neun der 20 Fälle (45%) blieb die Expression innerhalb des Epithels konstant, bei den restlichen elf Präparaten war die Reaktion in der mittleren Epithelschicht am stärksten ausgeprägt. Insgesamt zeigte sich im hochgradig dysplastischen Epithel somit eine geringere Expression von *PAX9* als im normalen Plattenepithel.

Auf 16 der untersuchten Schnittpräparate war neben hochgradig dysplastischem Epithel auch unauffälliges Plattenepithel enthalten. Hier konnte die Expression direkt verglichen werden; in zwei Fällen war kein qualitativer oder quantitativer Unterschied festzustellen, während die immunhistochemische Reaktion in 12 Fällen im dysplastischen Epithel gegenüber dem gesunden Epithel deutlich verringert war. In zwei Fällen fand im dysplastischen Epithel eine stärkere Expression als im gesunden Epithel statt.

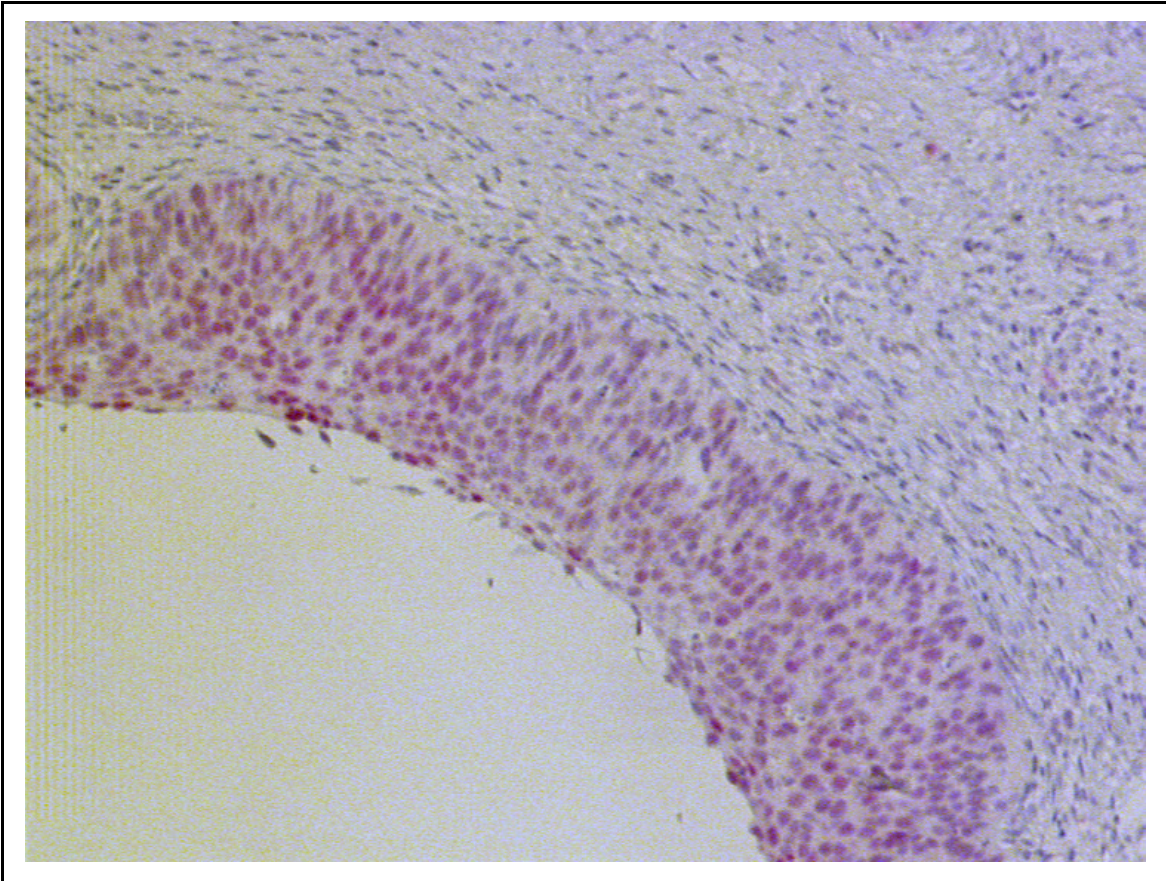


Abb. 3.48: Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im hochgradig dysplastischen Plattenepithel der Cervix uteri

3.2.3 Die Expression von PAX9 in Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri

3.2.3.1 Das Expressionsmuster in invasiven Cervixkarzinomen

Die Expression von *PAX9* wurde bei elf Fällen mikroinvasiver bzw. invasiver Plattenepithelkarzinome der Cervix uteri untersucht.

Keines dieser elf Karzinomen war vollkommen PAX9-negativ. Allerdings wiesen zwei davon neben PAX9-positiven Arealen vitale Bereiche auf, in denen kein PAX9 zu detektieren war (vgl. Abb. 3.49).

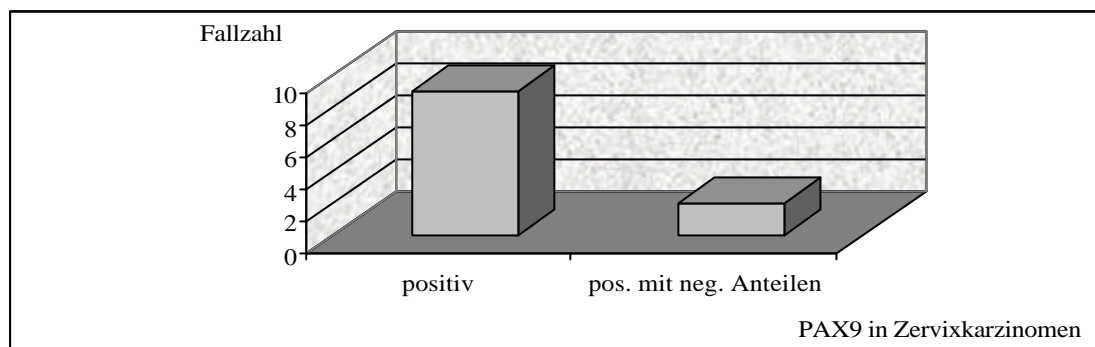


Abb. 3.49: PAX9-Expression in invasiven Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri

Der Anteil PAX9-positiver Tumorzellen bewegte sich in einem breiten Bereich von weniger als 5% positiven Kernen bis zu 70% PAX9-exprimierenden Zellkernen in einem Fall eines mikroinvasiven Plattenepithelkarzinoms. Die Verteilung zeigt, dass der Anteil positiver Zellkerne bei der Mehrzahl der Cervixkarzinome zwischen 20 und 50% lag (vgl. Abb. 3.50).

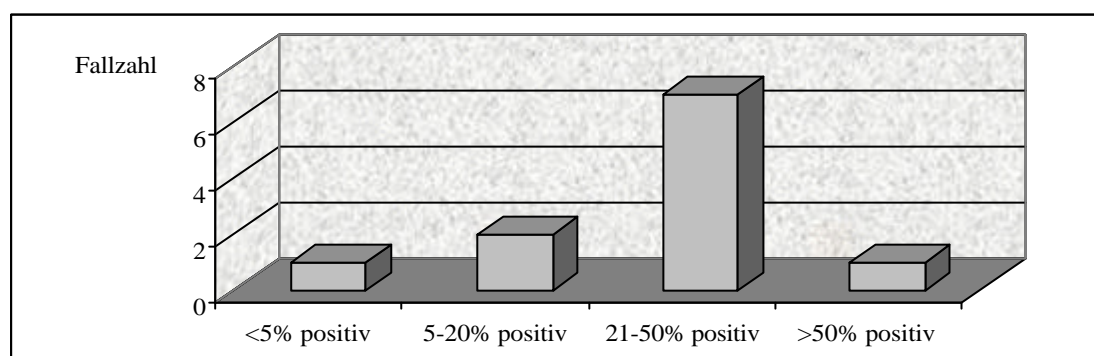


Abb. 3.50: Prozentualer Anteil PAX9-exprimierender Tumorzellen in Cervixkarzinomen

Mit Ausnahme der beiden bereits erwähnten Fälle mit PAX9-negativen Tumorearealen waren die PAX9-exprimierenden Kerne homogen im Tumorgebiet verteilt. Gelegentlich traten PAX9-positive Zellen allerdings gruppiert auf, bei einem Schnittpräparat beispielsweise überwiegend im Zentrum der invasiven Tumorinseln.

Bei zehn der elf Karzinompräparate existierten Areale des invasiven Plattenepithelkarzinoms neben Arealen von unauffälligem Plattenepithel auf demselben Schnittpräparat, so dass der Anteil PAX9-positiver Zellen verglichen werden konnte. In neun von zehn Fällen war die Expression im Karzinom deutlich geringer als im Epithel, nur bei einem Schnittpräparat enthielt das Karzinom einen größeren Anteil PAX9-positiver Kerne (vgl. Abb. 3.51).

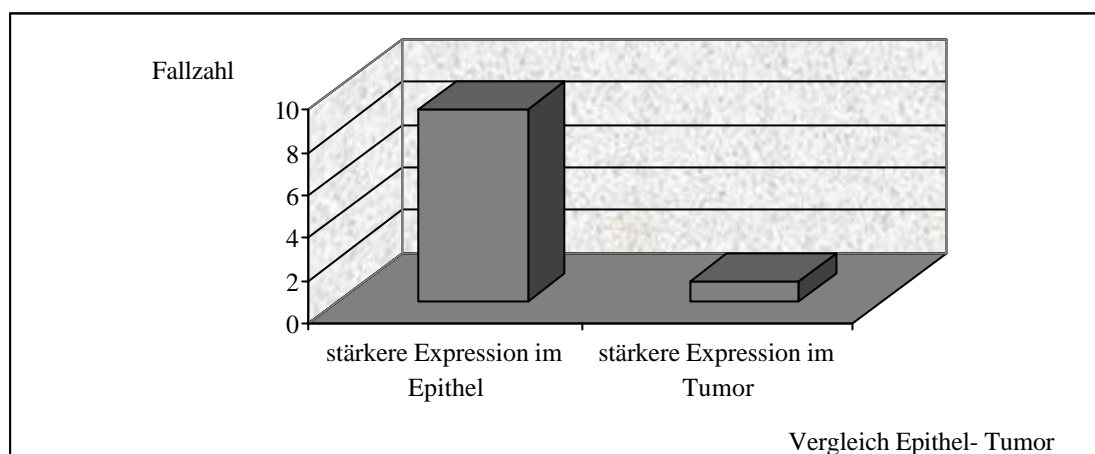


Abb. 3.51: Vergleich der PAX9-Expression im gesunden Plattenepithel der Cervix uteri und im Karzinom

Bei zwei Schnittpräparaten konnte die Expression im Karzinom der Expression im leichtgradig dysplastischen Epithel (CIN I) gegenübergestellt werden; hier war die Expression in je einem Fall im Tumor bzw. im dysplastischen Epithel stärker ausgeprägt.

Auf fünf Schnittpräparaten fand sich in den Randgebieten des invasiven Karzinoms ein hochgradig dysplastisches Plattenepithel (CIN III). Hier konnte die *PAX9*-Expression im Karzinom mit der Expression in der Dysplasie verglichen werden. In vier der fünf Fälle fand sich im Karzinom ein geringerer Anteil positiver Zellen als im dysplastischen Epithel, in einem Fall war die Expression in der CIN III stärker ausgeprägt (vgl. Abb. 3.52).

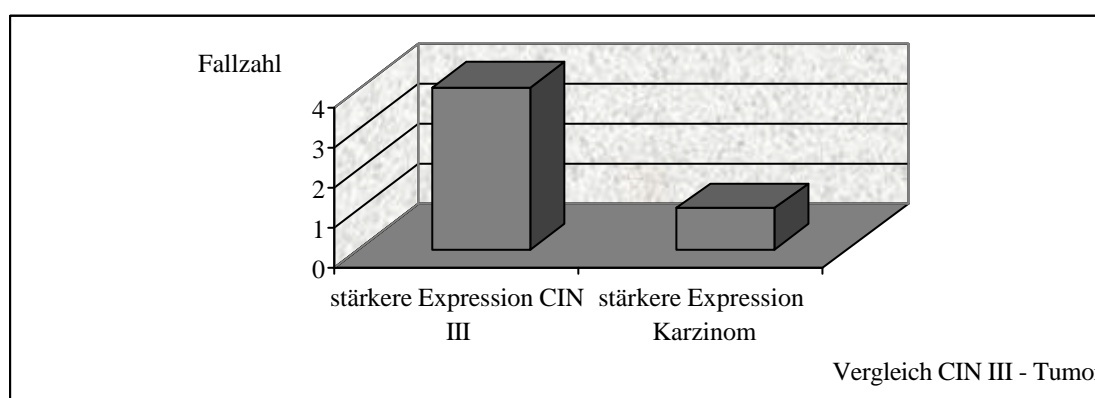


Abb. 3.52: Vergleich der PAX9-Expression im hochgradig dysplastischen Epithel der Cervix uteri (CIN III) und im Karzinom

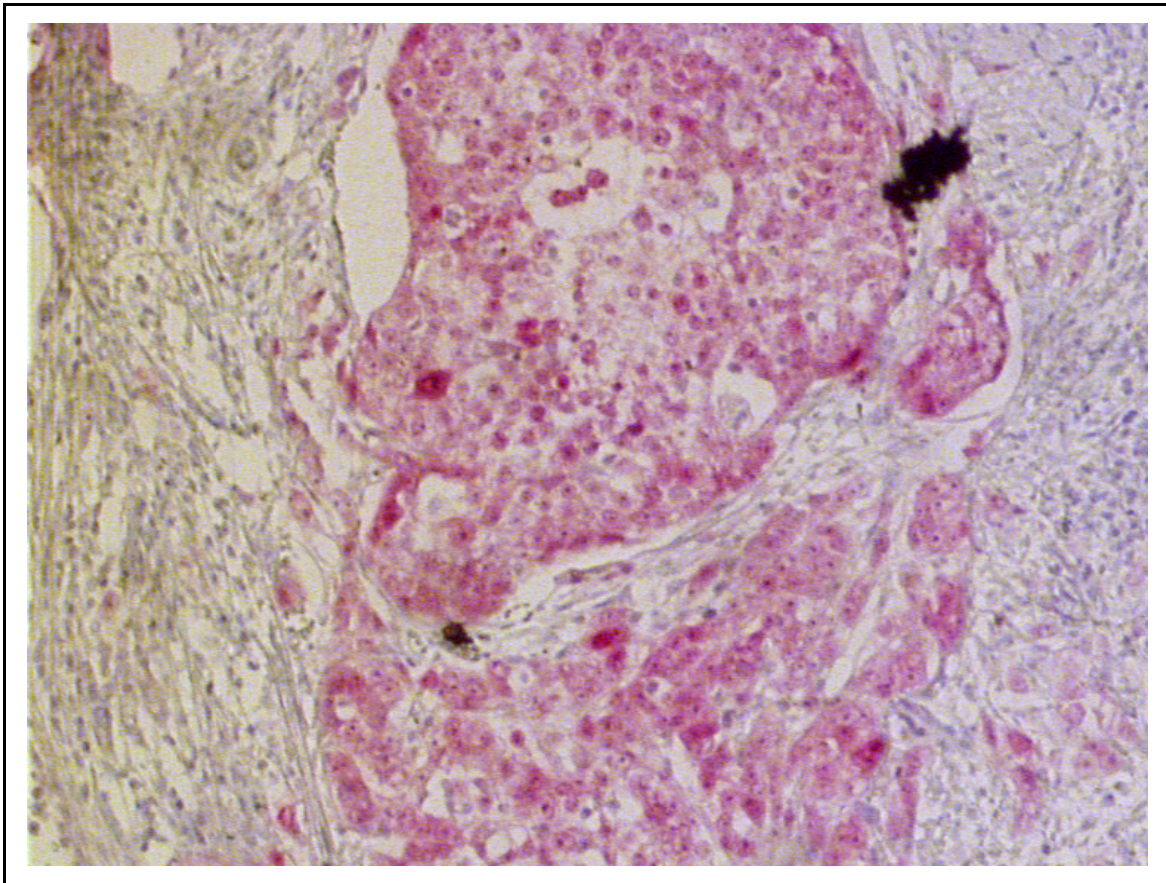


Abb. 3.53: Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im Plattenepithelkarzinom der Cervix uteri

3.2.3.2 Die PAX9-Expression in Cervixkarzinomen bezogen auf den Differenzierungsgrad

Drei der untersuchten Cervixkarzinome waren mäßiggradig differenziert (G2), acht wiesen einen schlechten Differenzierungsgrad auf (G3). Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Anteil *PAX9*-exprimierender Tumorzellen und dem Malignitätsgrad der Karzinome, entsprechend dem histopathologischen Grading, ermittelt werden (vgl. Abb. 3.54).

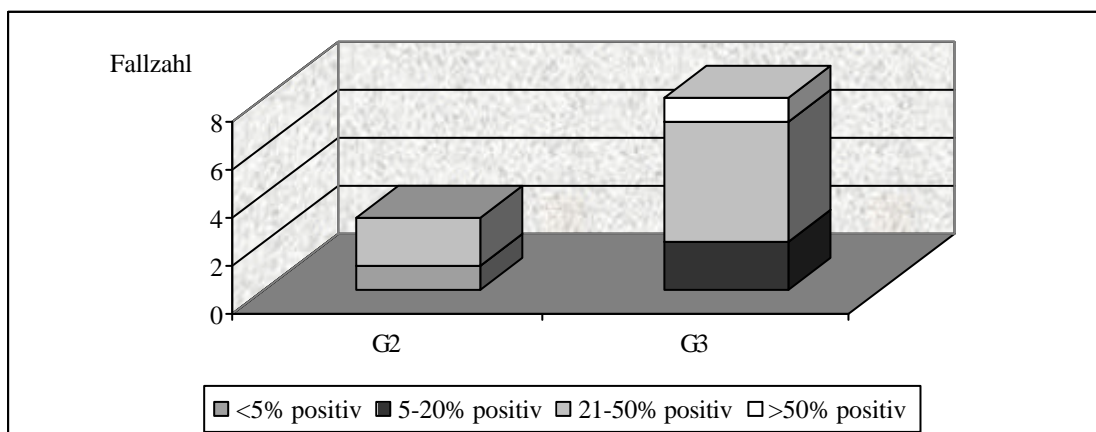


Abb. 3.54: Anteil PAX9-positiver Tumorzellen in Cervixkarzinomen bezogen auf den Malignitätsgrad

3.2.3.3 Die PAX9-Expression in Cervixkarzinomen bezogen auf das T-Stadium

Zwei der untersuchten Cervixkarzinome wurden als Stadium T1a klassifiziert, acht Karzinome als T1b, ein Fall als T2b. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Tumor-Stadium der TNM-Klassifikation und der *PAX9*-Expression im Karzinom nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.55).

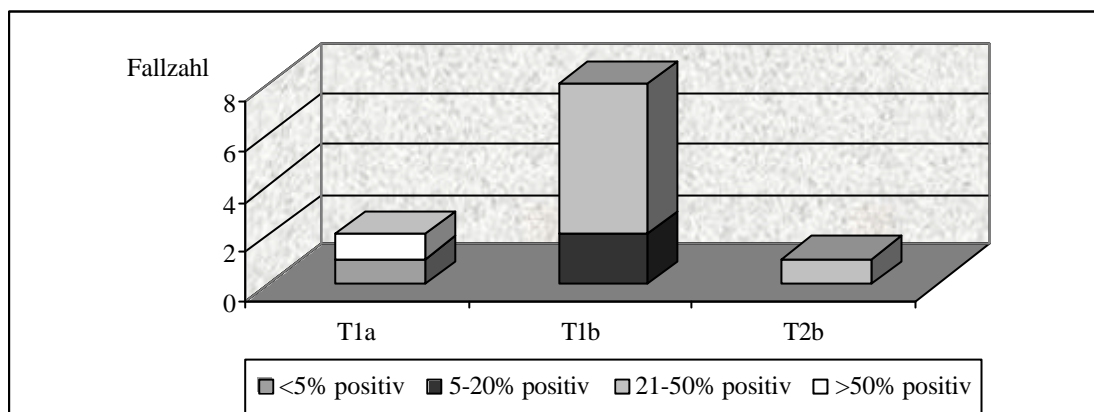


Abb. 3.55: PAX9-Expression und Tumor-Stadium bei Cervixkarzinomen

3.2.4 Zusammenfassung: Die PAX9-Expression im gesunden und dysplastischen Epithel und in Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri

Anhand der immunhistochemischen Methode wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von *PAX9* und dem Dysplasiegrad des Plattenepithels der Cervix uteri besteht. Weiter wurde die *PAX9*-Expression in invasiven Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri analysiert. Das gesunde Plattenepithel der Cervix uteri diente auch hier als Vergleichsparameter für eine Unter- oder Überexpression in den prämaligen und malignen Läsionen.

Wie bereits bei den Untersuchungen des Ösophagusepithels dargestellt, durchlaufen auch die Cervixepithelzellen einen Migrations- und Ausreifungsprozess von den basalen zu den luminal gelegenen Zellschichten. Die *PAX9*-Expression änderte sich synchron mit diesem Differenzierungsprozess. Nur in 21% der Fälle exprimierten die Basalzellen im Cervixepithel *PAX9*, dagegen war das Protein bei 55% der Präparate in den Suprabasalzellen nachweisbar. Im Stratum spinosum exprimierten alle untersuchten Präparate *PAX9*, das Stratum superficiale war in allen Fällen *PAX9*-negativ.

Am Übergang vom Plattenepithel der Ektocervix zum Zylinderepithel der Endocervix fand sich in 42% der Fälle eine geringe Anzahl PAX9-positiver Zylinderepithelzellen. Im Zylinderepithel der Endocervix findet keine PAX9-Expression statt.

Ähnlich wie bei den Dysplasien des Ösophagusepithels konnte bei den zervikalen intraepithelialen Neoplasien eine Abnahme der PAX9-Expression mit steigendem Schweregrad der Dysplasie festgestellt werden.

Bei den gering- und mäßiggradigen Epitheldysplasien (CIN I bzw. II) fand sich in den basalen Zellen eine leicht erhöhte PAX9-Expression im Vergleich zum gesunden Epithel (37% PAX9-positiv Präparate in der Dysplasie, 21% im gesunden Epithel) im Sinne einer dysregulierten Genexpression. Im Stratum spinosum dagegen war die PAX9-Expression vermindert, nur bei 45% der Präparate ließ sich das Protein in allen Keratinozyten nachweisen, 18% der Fälle waren vollständig PAX9-negativ. Beim Vergleich der Expression im gesunden Epithel und in der CIN I und II zeigte sich, dass PAX9 bei 50% der Dysplasien vermindert war, bei 37% fand sich kein Unterschied, und in einem Fall war die Expression im dysplastischen Epithel gesteigert. In den hochgradigen Dysplasien des Zervixepithels (CIN III) war die Expression von PAX9 weiter reduziert. Bei 75% der Präparate war die Expression in der CIN III deutlich geringer als im gesunden Epithel.

Die elf untersuchten invasiven Zervixkarzinome exprimierten alle PAX9, allerdings waren nur in einem Fall mehr als 50% der Karzinomzellen positiv. Die Expression im Karzinom war in 90% der Fälle gegenüber der Expression im gesunden Epithel vermindert. Verglichen mit dem Anteil PAX9-positiver Zellen im dysplastischen Epithel (CIN I, II und III) fand sich in 71% der Fälle eine verminderte Expression in den Karzinomzellen. Aufgrund der geringeren Fallzahl ließ sich hier, anders als bei den untersuchten Läsionen des Ösophagus, kein Unterschied zwischen der geringgradigen und der hochgradigen zervikalen Dysplasie herausarbeiten. Insgesamt war jedoch auch hier eine stetige Abnahme der PAX9-Expression vom gesunden zum dysplastischen Epithel und weiter zum invasiven Zervixkarzinom hin ersichtlich.

Ebenso wie bei den Ösophaguskarzinomen konnte keine Korrelation zwischen der Expression von PAX9 in den Zervixkarzinomen und der Tumorgröße (T-Stadium) oder dem Malignitätsgrad (Grading) gesichert werden.

3.3 Vergleich der Expression von PAX9 im Ösophagus und in der Cervix uteri

Das Expressionsmuster von *PAX9* im gesunden Plattenepithel des Ösophagus unterscheidet sich nicht wesentlich von der *PAX9*-Expression im Plattenepithel der Cervix uteri.

In beiden Epithelien nimmt der Anteil *PAX9*-positiver Zellen von den Basalzellen zu den Suprabasalzellen bis zum Stratum spinosum deutlich zu. In den Superficialzellen findet in der Mehrzahl der Fälle keine *PAX9*-Expression statt. Allerdings fanden sich im Cervixepithel weniger *PAX9*-positive Basalzellen als im Ösophagusepithel. Im dysplastischen Epithel beider Lokalisationen nahm die *PAX9*-Expression mit zunehmendem Dysplasiegrad ab. Sowohl in den untersuchten Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus als auch in den Cervixkarzinomen war der Anteil *PAX9*-positiver Zellen höher als im hochgradig dysplastischen Epithel, jedoch geringer als im gesunden Epithel.

4. Diskussion

4.1 Diskussion des Materials

Um auf die Funktion von Pax9 zu schliessen, wurden zunächst Untersuchungen an Mäuseembryonen und an adulten Mäusen durchgeführt (Stapleton, 1993; Neubüser, 1995). Bei erwachsenen Mäusen lässt sich das Pax9-Protein lediglich in den proximalen, von verhornendem Plattenepithel ausgekleideten Anteilen des Gastrointestinaltrakts detektieren (Neubüser, 1995; Peters, 1997). Die Expression im ösophagealen Plattenepithel der adulten Mäuse ist dabei auf differenzierte Zellen beschränkt, die mitotisch aktiven Basalzellen sind Pax9-negativ (Neubüser, 1995). Für den menschlichen Ösophagus wurde in der vorliegenden Arbeit ein ähnliches Expressionsmuster beschrieben. Hieraus kann gefolgert werden, dass Pax9 eine Rolle bei der Differenzierung mehrschichtigen Plattenepithels spielt (Peters, 1997). Bei Untersuchungen an Mäusen konnte eine Expression von *Pax9* in ösophagealen Speicheldrüsen festgestellt werden (Neubüser, 1995). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch die submukösen Drüsen im menschlichen Ösophagus PAX9-positiv sind.

Bei Northern blot-Untersuchungen konnte in der Cervix uteri der Maus allerdings kein Pax9 nachgewiesen werden (Peters, 1997). Auch im verhornenden Plattenepithel der menschlichen Haut, das ektodermaler Herkunft ist, findet keine *Pax9*-Expression statt (Peters, 1997).

Pax9 scheint damit an der Entstehung von Plattenepithelien entodermaler Herkunft mitzuwirken (Peters, 1997). Da Dysplasien und invasive Karzinome über eine Fehlregulation des Epithelwachstums und der Epithelregeneration entstehen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von *Pax9* in den genannten Läsionen untersucht.

4.2 Diskussion der Methodik

In diesem Abschnitt soll anhand mehrerer Beispiele aufgezeigt werden, wie maligne Erkrankungen mit Hilfe immunhistochemischer Methoden genauer charakterisiert werden können. Die Tumorpathologie ist neben der Diagnostik bei Infektionskrankheiten eines der Hauptanwendungsgebiete der Immunhistochemie (Wittekind, 1997b). Weiterhin werden die Voraussetzungen für den Erhalt exakter Ergebnisse sowie mögliche Vor- und Nachteile der Methode erläutert.

4.2.1 Das Spektrum der Untersuchungsmethoden zur Analyse genetischer Veränderungen und pathologischer Genexpression

Um den Ursprung einer malignen Erkrankung zu verstehen und um effiziente Therapieansätze zu finden, ist es erforderlich, die Fehlfunktionen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen aufzudecken. Dies kann beispielsweise anhand molekularbiologischer Methoden wie der Polymerase chain reaction (PCR), der DNA-Sequenzierung oder der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) erfolgen. Auf diese Weise ist es möglich, Mutationen, Genamplifikationen oder Deletionen nachzuweisen. Ein Nachteil dieser Methoden liegt in den meist hohen Kosten für Geräte und Materialien. Darüberhinaus ist zum Teil eine spezielle Gewebeaufbereitung erforderlich, eventuell können üblicherweise formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben nicht verwendet werden (Campbell, 2002).

Als alternative Untersuchungsmethoden stehen z. B. Immunhistochemie oder Western blot für den Proteinnachweis oder in situ-Hybridisierung zur Verfügung. Diese Methoden haben den Vorteil, dass sie relativ einfach und kostengünstig durchführbar sind. Mit Ausnahme des Western blots werden die detektierten Proteine oder Nukleinsäuren im Lichtmikroskop sichtbar, wodurch zusätzlich ihre Lokalisation in den einzelnen Zellen oder subzellulären Kompartimenten dargestellt werden kann. Mit diesen Methoden gelingt eine Verknüpfung von molekularbiologischen und histologischen Eigenschaften eines Tumors, hierfür wurde der Begriff der „molekularen Histologie“ geprägt (Campbell, 2002).

4.2.2 Beispiele für den Einsatz der Immunhistochemie in Forschung und Routinediagnostik von Malignomen

Die auch in dieser Arbeit eingesetzte Immunhistochemie ist eine etablierte Untersuchungsmethode in Forschung und klinischer Routinediagnostik.

Ein bekanntes Beispiel ist die Untersuchung von p53-Mutationen. Der immunhistochemische Nachweis von p53 beruht auf der kurzen Halbwertszeit des Wildtyp-p53-Genproduktes. Mutiertes p53-Protein besitzt dagegen eine längere Halbwertszeit und lässt sich somit immunhistochemisch detektieren (Battifora, 1994). Dennoch sind die Forschungsergebnisse derzeit uneinheitlich und schwer zu interpretieren. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist, dass eine physiologische Akkumulation von Wildtyp-p53 beispielsweise auftritt, um das Durchlaufen des Zellzyklus während der DNA-Reparatur im G1-Stadium zu verlangsamen (Battifora, 1994). Bei einer solchen Überexpression kann auch das kurzlebige Wildtyp-p53

immunhistochemisch erfasst werden (Gown, 1993). Ausserdem gibt es Hinweise darauf, dass die Detektionsgrenze für p53 durch manche Antigen-retrieval-Verfahren, wie z. B. durch eine Mikrowellenbehandlung, herabgesetzt wird (McKee, 1993).

Ein weiteres Beispiel für den experimentellen Einsatz immunhistochemischer Methoden stellt die Untersuchung auf die Zelladhäsionsmoleküle Catenine und Cadherine dar. Die Zelladhäsions-vermittelnden Eigenschaften von Cadherinen werden dabei über Catenine reguliert (Campbell, 2002). Hier fanden sich klare Verknüpfungen zwischen einer abnormalen Proteinfunktion, d. h. gestörter Zelladhäsion, und klinischen Parametern wie z. B. diffusem invasiven Wachstum bei Magenkarzinomen (Becker, 1994).

Immunhistochemische Methoden werden auch in der klinischen Routinediagnostik zur Untersuchung maligner Erkrankungen eingesetzt.

Ein aktuelles Beispiel ist die Bestimmung des HER2-Status (human epidermal growth factor receptor-2 oder c-erbB-2) in Mammakarzinomen. Unter den verschiedenen Untersuchungsmethoden werden derzeit mit Immunhistochemie oder Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) die besten Resultate erzielt (Hanna, 2001). Da ein monoklonaler Antikörper (Trastuzumab = Herceptin®) gegen das HER2-Protein zur Verfügung steht, hat diese Untersuchung auch therapeutische Konsequenzen (Vogel, 2002).

4.2.3 Voraussetzungen für geeignete Antikörper

Zur Anwendung in der Immunhistochemie stehen polyklonale und monoklonale Antikörper zur Verfügung, deren Einsatz jeweils verschiedene Vor- und Nachteile mit sich bringt.

Alle Antikörper können polyfunktional sein, d. h. durch räumlich getrennte Mikrodomänen in den variablen Regionen können eventuell verschiedene, nicht unbedingt verwandte Antigene erkannt werden (Richards, 1981). Der Vorteil der polyklonalen Antikörper besteht darin, dass die Wahrscheinlichkeit der Bindung eines zweiten Antigens durch mehrere Antikörper eher gering ist. Bei monoklonalen Antikörpern dagegen wäre die Bindung an das zweite Antigen viel stärker ausgeprägt und infolgedessen störend (Swanson, 1988).

Am besten geeignet für immunhistochemische Untersuchungen sind Antikörper mit hoher Spezifität und Affinität für das gesuchte Antigen. Solche Antikörper können stark verdünnt zur Anwendung kommen, wodurch falsch-positive Reaktionen reduziert werden (Mao, 1994).

Diese hohe Spezifität kann durch die Verwendung monoklonaler Antikörper gewährleistet werden (Wittekind, 1997b).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper eingesetzt, der sowohl das murine Pax9-Protein als auch das menschliche Protein erkennt. Dies wird durch die nahe Verwandtschaft der menschlichen und murinen Pax9-Proteine ermöglicht. Die Aminosäuresequenz der paired box beider Genprodukte ist völlig identisch. Auch ausserhalb der paired box ist die Struktur sehr ähnlich; die Nukleotidsequenzen von *Pax9* und *PAX9* stimmen zu 93% überein, die Aminosäuresequenzen zu 99% (Neubüser, 1995). Eine Kreuzreaktion mit Pax1, das eng mit Pax9 verwandt ist, konnte ausgeschlossen werden (Gerber, 2002).

4.2.4 Problematik und Vorteile der Immunhistochemie

Der wichtigste Vorteil der Immunhistochemie gegenüber anderen Nachweisverfahren besteht darin, dass nicht nur eine semiquantitative Aussage über das Vorhandensein eines bestimmten Proteins getroffen werden kann, sondern auch genau bestimmt werden kann, in welchen Zellen und subzellulären Strukturen dieses Protein anzutreffen ist. Somit besteht bei dieser Methode eine enge Beziehung zur Morphologie des untersuchten Gewebes. Ein weiterer Vorteil der Immunhistochemie ist die Anwendbarkeit auf routinemäßig bearbeitetes Gewebe (Wittekind, 1997b), d. h. Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebelöcher eignen sich für entsprechende Untersuchungen.

Bei der Darstellung der Antikörper-Antigen-Reaktion in Sandwich-Technik dient der Primär-Antikörper als Antigen für einen Brücken-Antikörper. Durch die antigene Wirkung der Fc-Domänen sind Immunglobuline selbst gute Immunogene (Richards, 1981). Durch Kopplung an ein Enzym erfolgt nach Substratzugabe die Farbreaktion.

Allerdings ist die Bindung des Antikörpers im Gewebe nur möglich, wenn das Antigen die Gewebeaufbereitung übersteht. Problematisch kann hier die Spaltung oder Quervernetzung von Proteinen durch die Einwirkung von Aldehyden sein (Swanson, 1988). Je länger z. B. Formalin bei der Fixierung einwirkt, desto geringer werden die antigenen Eigenschaften der Proteine (Miettinen, 1990). Ferner können die Proteine durch die Denaturierung ihre Konformation und dadurch ihre Struktur ändern (Swanson, 1988).

Um eine ausreichende Affinität des Antikörpers zu gewährleisten, ist eine Aufbereitung des zu untersuchenden Gewebes durch Antigen-Demaskierung erforderlich (Swanson, 1988).

Dies kann z. B. durch eine proteolytische Vorbehandlung erfolgen, wodurch entweder die Oberflächenantigene wieder freigelegt werden, oder die Zellpermeabilität für den Antikörper zunimmt (Battifora, 1986). Diese Proteasemethode führt allerdings nicht immer zum Erfolg, teilweise werden die Antigene durch die Andauung sogar zerstört (Ordonez, 1987). Eine Alternative zur Proteasemethode ist die Hitzebehandlung zur Antigen-Demaskierung, beispielsweise in der Mikrowelle oder im Dampfkochtopf (Gown, 1993).

Bei der immunhistochemischen Darstellung der PAX9-Expression im Rahmen der vorliegenden Arbeit erwiesen sich Protease- und Mikrowellen-Vorbehandlung als ineffizient, das beste Resultat lieferte das Kochen im Dampfkochtopf.

Falsch-negative Ergebnisse entstehen beim Einsatz ungeeigneter Antikörper, beim Verlust des untersuchten Antigens durch Autolyse oder Diffusion, oder bei einer Antigenkonzentration unterhalb der Detektionsgrenze. Falsch-positive Ergebnisse können bedingt sein durch eine Kreuzreaktivität des Antikörpers, durch unspezifische Antikörper-Bindung oder durch eine endogene Aktivität des zur Farbentwicklung eingesetzten Enzyms (Wittekind, 1997b).

Um unspezifische Antikörper-Bindungen zu reduzieren, wurde den Antikörperlösungen in der vorliegenden Arbeit Molkepulver zugesetzt. Zur Blockierung einer endogenen Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde Levamisole verwendet. Ein ungelöstes Problem stellt dagegen die nicht einheitliche Einwirkung des Fixationsagens in großen Gewebeproben dar. Infolgedessen entstehen nicht in allen Gewebearealen optimale Bedingungen für die Antikörper-Reaktion, was sich als fleckiges Muster bemerkbar macht. Bezüglich einer heterogenen Expression eines Tumorproteins lässt sich damit nur schwer eine Aussage treffen (Miettinen, 1990).

Aufgrund dieser möglichen technischen Schwierigkeiten ist es unerlässlich, bei immunhistochemischen Färbungen entsprechende Positiv- und Negativkontrollen mitzuführen.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Die Expression von PAX9 im gesunden und dysplastischem Plattenepithel und in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und der Cervix uteri

In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der *PAX9*-Expression und dem Differenzierungsgrad der Epithelzellen sowie dem Grad der malignen Veränderung nachgewiesen werden.

Im gesunden Epithel findet ein Differenzierungsprozess von den Basalzellen zu den Stachelzellen und den Superfizialzellen statt. Die *PAX9*-Expression ändert sich dabei in Abhängigkeit von der Zellmigration nach luminal. In der Basalzellschicht fand in 35% der Präparate keine *PAX9*-Expression statt, in 33% waren alle Zellen der Basalzellschicht *PAX9*-positiv. Diese uneinheitliche *PAX9*-Expression beruht eventuell auf dem unterschiedlichen Schicksal der Basalzellen: als Folge der differentiellen Zellteilung verbleibt ein Teil als undifferenzierte Zellen im Reservezellpool, während der andere Teil ausdifferenziert und die Migration nach luminal antritt. In der Schicht der Suprabasalzellen war die Fraktion *PAX9*-positiver Zellkerne höher als in der Basalzellschicht. Dies könnte ein Hinweis auf den größeren Anteil ausdifferenzierender Zellen sein. Die stärkste Expression findet sich im Bereich des Stratum spinosum. Die Keratinozyten in diesem Bereich stehen durch Desmosomen in Verbindung und tragen zur mechanischen Belastbarkeit des Epithels bei (Karam 1999), sie sind somit als hochdifferenziert anzusehen. Es erfolgt zwar noch eine Ausreifung zu abgeflachten Superfizialzellen, diese unterliegen jedoch bereits zum Großteil dem Zelltod durch Apoptose. Der abrupte Verlust von *PAX9* in den Superfizialzellen könnte auch mit der Beendigung dieser Ausreifungsprozesse zusammenhängen.

Bei der Untersuchung von Arealen mit Basalzellhyperplasie fiel auf, dass die hyperplastischen Basalzellen stärker *PAX9* exprimierten als die Basalzellen im unauffälligen Epithel. Diese gesteigerte *PAX9*-Expression kann als Hinweis auf verstärkte Ausreifungstendenzen bereits in den basalen und suprabasalen Zellschichten aufgefasst werden.

Im dysplastischen Epithel nimmt die *PAX9*-Expression mit dem Schweregrad der Dysplasie ab. Der Anteil atypischer und undifferenzierter Epithelzellen ist im hochgradig dysplastischen

Epithel höher als im geringgradig dysplastischen Epithel (Dawsey, 1994). Die Annahme, dass PAX9 vorwiegend von differenzierten Zellen exprimiert wird, stimmt somit überein mit der Beobachtung, dass die PAX9-Expression mit zunehmendem Dysplasiegrad abnimmt.

Der postulierte Zusammenhang zwischen Differenzierung und PAX9-Expression deutet hier darauf hin, dass eine Ausreifungstendenz im gesunden Epithel und auch im gering- und mäßiggradig dysplastischen Epithel besteht, während sie im hochgradig dysplastischen Epithel nicht mehr sicher gewährleistet ist.

In den untersuchten Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und der Cervix uteri fand sich überwiegend ein höherer Anteil PAX9-positiver Zellen als im hochgradig dysplastischen Epithel. Dies könnte auf einer Redifferenzierungstendenz im Karzinom beruhen.

Ähnliche Redifferenzierungsvorgänge wurden beispielsweise in Zellkulturen von Leberzellkarzinomen beobachtet. Nach Erreichen einer größeren Zellpopulation durch Proliferation der Tumorzellen in vitro wiesen die Tumorzellen allmählich morphologische Charakteristika reifer Hepatozyten auf und begannen, Glykogen, Harnstoff und Albumin zu synthetisieren (Gomez-Lechon, 2001).

Bei Untersuchungen an dysplastischem Plattenepithel im menschlichen Ösophagus und auch in der Cervix uteri korrelierte der Schweregrad der Dysplasie mit dem abnormen DNA-Gehalt. Der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen wurde hierbei zytophotometrisch gemessen. 33% der geringgradigen, 78% der mäßiggradigen und 100% der hochgradigen Dysplasien erwiesen sich als aneuploid. Dagegen konnte in den invasiven Plattenepithelkarzinomen kein einheitlicher Aneuploidiegrad festgestellt werden (Crissman, 1993).

In dieser Arbeit wurden ähnliche Beobachtungen für die PAX9-Expression im dysplastischen Epithel und im Karzinom gemacht. Die Diskrepanz zwischen der Abnahme der PAX9-Expression im Epithel mit zunehmendem Dysplasiegrad und der uneinheitlichen Expression im invasiven Karzinom könnte somit auch durch einen unterschiedlichen Gehalt aneuploider Zellen bedingt sein.

Bei neun Karzinomen mit epithelnahen invasiven Anteilen konnte beobachtet werden, dass die näher am Oberflächenepithel lokalisierten Tumorabschnitte eine stärkere PAX9-Expression aufwiesen als die epithelfernen Anteile. Dieser Zusammenhang zwischen PAX9-Positivität und Invasionstiefe könnte auf einem Verlust an Differenzierungsmerkmalen mit fortschreitender Invasivität hindeuten. Bei einem weiteren Karzinom fand sich in den Randbereichen der invasiven Malignominseln eine stärkere PAX9-Expression als im Zentrum

der Tumorinseln. Dies könnte wiederum auf einen Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen zurückzuführen sein: Beim Wachstum der Tumorinseln, das mit der Proliferation der Karzinomzellen einhergeht, könnten Ausreifungstendenzen eine stärkere *PAX9*-Expression in der Peripherie der Tumorinseln bewirken. Weiter wäre auch eine Wechselwirkung zwischen Epithel und Mesenchym denkbar; eine solche Epithel-Mesenchym-Interaktion wurde für *PAX9* beispielsweise bei der Zahnentwicklung beschrieben (Peters 1999b).

Ein anderes Präparat wies vereinzelte Hornperlen auf; die den verhornenden Arealen benachbarten Tumorzellen zeigten eine verstärkte *PAX9*-Expression. Auch hier ist von einem höheren Differenzierungsgrad der verhornenden Tumorzellareale auszugehen, eventuell besteht ein Zusammenhang mit der hier beobachteten Zunahme der *PAX9*-Expression. Zwei weitere Karzinome wurden aufgrund einer spindelzelligen Tumorkomponente als gering differenziert eingestuft. Während die entdifferenzierten Spindelzellanteile kein *PAX9* enthielten, konnte in den anderen Tumorarealen *PAX9* detektiert werden. Auch hier war die Expression von *PAX9* somit auf besser differenzierte Tumoranteile beschränkt.

4.3.2 *PAX9* eignet sich nicht als plattenepithelialer Marker

Im adulten Organismus wurde *PAX9* bislang im menschlichen Ösophagus sowie bei Mäusen im Epithel der Zunge, des Oropharynx und des Ösophagus detektiert (Peters, 1997).

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Expression im Plattenepithel der Cervix uteri und des Ösophagus berechtigt zu der Annahme, dass *PAX9* eine wesentliche Rolle bei Differenzierungsprozessen des Plattenepithels spielt. Allerdings ist die *PAX9*-Expression nicht auf plattenepitheliale Lokalisationen beschränkt. Vor allem in submukösen Drüsen des Ösophagus, aber auch im metaplastischen Zylinderepithel des Ösophagus konnte *PAX9* nachgewiesen werden. Die starke Expression von *PAX9* in den Ösophagusdrüsen könnte in Zusammenhang mit der hohen Differenzierung der Drüsenepithelien stehen.

Ferner exprimierte ein Teil der Zylinderepithelzellen der cervikalen Junctionszone *PAX9*. Vermutlich findet in diesen Nachbarregionen noch teilweise eine Expression von *PAX9* statt, die dann in weiter vom Epithelübergang lokalisierten Zellen beendet wird.

Weiterhin wird *PAX9* im verhornenden Plattenepithel der menschlichen Haut, das allerdings ektodermaler Herkunft ist, nicht exprimiert (Peters, 1997).

Somit eignet sich PAX9 nicht als spezifischer Marker für gesundes oder neoplastisches Gewebe plattenepithelialer Herkunft.

4.4 Diskussion der Funktion von PAX9

Die Struktur von *Pax9* stimmt weitgehend mit der von *Pax1* überein. Sowohl das *Pax1*-Gen als auch das *Pax9*-Gen, weisen neben der paired domain auch das Oktapeptid-Motiv auf, besitzen jedoch keine Homeobox. Ihre Aminosäuresequenzen sind zu 66% identisch. Vermutlich stammen *Pax1* und *Pax9* von einem gemeinsamen Vorläufergen ab. Die Aminosäuresequenzen der beiden Genprodukte weichen im Bereich des C-Terminus am stärksten voneinander ab (Neubüser, 1995).

Um eine eventuelle Abhängigkeit der *Pax9*-Expression von der *Pax1*-Expression zu erkennen, wurden Mäuseembryonen mit einer Deletion des *Pax1*-Gens untersucht. Bei diesen *Pax1*-knock out-Mäusen fand sich eine ungestörte und somit von der *Pax1*-Expression unabhängige Expression von *Pax9* (Neubüser, 1995).

Die verschiedenen *Pax*-Gene werden in der Mäuseembryogenese in einem zeitlich und örtlich streng festgelegten Expressionsmuster aktiviert. Die Expression beginnt ab dem 8. bis 9. Tag post conceptionem. *Pax9* wird dabei zunächst im Epithel des Vorderdarms, anschließend auch in den Schlundtaschen, den Sklerotomen, den Extremitätenknospen und im Kopf exprimiert (Neubüser, 1995). Weiterhin ist *Pax9* an der Entwicklung der Zahnanlagen, des Thymus und der Epithelkörperchen beteiligt (Peters, 1998). Sowohl *Pax1* als auch *Pax9* lassen sich in der Anlage der Wirbelsäule nachweisen, besitzen hier jedoch unterschiedliche Expressionsmuster (Peters, 1999). In der adulten Maus ist die Expression von *Pax9* beschränkt auf das Epithel der Zunge, des Oropharynx und des Ösophagus (Peters, 1997).

Um die Funktion von *Pax9* genauer zu untersuchen, wurden *Pax9*-knock-out-Mäuse gezüchtet. Diese *Pax9*-defizienten Mäuse besitzen zwar einen Ösophagus, sterben jedoch kurz nach der Geburt, so dass weitere Analysen bei adulten Tieren nicht möglich sind (Peters, 1998). Bei den *Pax9*-knock-out-Mäusen findet sich ektopes Thymusgewebe im Larynxbereich. Als Folge eines Migrationsdefektes bleibt die Abfaltung vom Pharynxepithel in das darunter gelegene Mesenchym aus (Hetzer-Egger, 2002). Dies ist auf eine

Fehlregulation epithelial-mesenchymaler Interaktionen zurückzuführen; Untersuchungen der Funktion von *Pax9* bei der Zahnentwicklung lieferten vergleichbare Resultate (Peters, 1999b). Weiterhin zeigte sich, dass die Apoptoserate in der Thymusanlage der *Pax9*-defizienten Mäuse gesteigert war. Ab dem 16.Tag p.c. wiesen die Vorläufer-Thymozyten einen erhöhten Apoptoseindex auf (Hetzer-Egger, 2002). Auch in *Pax1*-knock-out-Mäusen unterliegen die Thymozyten einer erhöhten Apoptoserate, wodurch die Zahl ausreifender Thymozyten stark reduziert ist (Wallin, 1996).

Bei Untersuchungen am Vorderdarmepithel konnte gezeigt werden, dass die Stärke der *Pax9*-Expression mit der Proliferationsaktivität der Epithelzellen korreliert. Dies führte zu der Vorstellung, dass *Pax*-Gene den proliferativ aktiven Zustand undifferenzierter Zellen aufrechterhalten können (Müller, 1996).

In Mäusen, bei denen sowohl das *Pax1*- als auch das *Pax9*- Gen ausgeschaltet wurde, war die Apoptoserate in den Sklerotomen deutlich gesteigert. Während der Sklerotomentwicklung nahm der Anteil proliferierender Zellen stark ab (Peters, 1999). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass *Pax1* und *Pax9* die Einleitung der Apoptose verhindern und die Zellproliferation aufrechterhalten können.

Ein ähnlicher Mechanismus wurde für *Pax5* beschrieben: *Pax5* ist erforderlich, um die B-Zell-Proliferation *in vitro* zu stimulieren (Wakatsuki 1994). Die Überexpression von *Pax*-Genen führt zur Entstehung einer Reihe verschiedener Tumoren in Nacktmäusen (Maulbecker, 1993). Weiterhin wurde gezeigt, dass das PAX3-FKHR-Fusionsprotein in alveolären Rhabdomyosarkomen eine Apoptosehemmung bewirkt (Barr, 2001).

Umgekehrt könnte eine Inhibierung der *PAX*-Genaktivität in Tumorzellen eine gesteigerte Apoptose induzieren oder den malignen Phänotyp zumindest teilweise zurückdrängen. Diese Hypothese wurde durch einen Versuch belegt, in dem Rhabdomyosarkom- und Melanomzellen mit Antisense-Oligonukleotiden gegen *PAX3*-mRNA behandelt wurden. Ein Teil der malignen Zellen starb hierbei ab, teils durch Apoptoseinduktion (Scholl, 2001).

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass *PAX1*, allerdings wesentlich geringer als *PAX2*, *PAX5* und *PAX8*, die Fähigkeit besitzt, direkt an das *p53*-Tumorsuppressorgen zu binden und dadurch die *p53*-Expression zu unterdrücken. Hierfür besitzt der *p53*-Promotor (im ersten Exon von *p53*) eine spezifische *PAX*-Protein-Bindungsstelle (Stuart, 1995). *P53* wird benötigt, um nach Eintreten einer DNA-Schädigung einen Wachstumsstopp einzuleiten (Lin, 1992). Da *PAX1* und *PAX9* (keine Homeobox vorhanden) ebenso wie *PAX2*, 5 und 8 (Homeobox partiell vorhanden) innerhalb der *PAX*-Genfamilie eine eigene Untergruppe bilden, könnte auch *PAX9* imstande sein, an *p53* zu binden und seine Expression zu hemmen.

Die Inaktivierung von p53 ist bei der Entstehung der Cervixkarzinome durch Infektion mit den high risk-HPV-Typen 16 und 18 ein entscheidender Schritt. Das HPV-Protein E6 führt zu einem beschleunigten proteasomalen Abbau von p53 (Scheffner, 1990). Durch die Bindung des E7-Onkoproteins an das pRB-Protein wird der Transkriptionsfaktor E2F von den pRB-Komplexen losgelöst und aktiviert die Transkription von Genen zur Regulation der Zellproliferation. HPV 16 und 18 lassen sich bei mehr als 90% der Cervixkarzinome nachweisen (zur Hausen, 1996).

Allerdings wird *PAX9* im ösophagealen und zervikalen Plattenepithel eher von differenzierten Keratinozyten exprimiert. Die mitotisch aktiven Basalzellen und die maligne transformierten Zellen enthielten das Protein nur zu einem wesentlich geringeren Anteil. In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass die *PAX9*-Expression in dysplastischen Läsionen des Plattenepithels mit zunehmendem Dysplasiegrad abnimmt.

Auch im Ösophagus von adulten Mäusen ist die *Pax9*-Expression auf differenzierte Keratinozyten beschränkt, während die proliferierenden Basalzellen *Pax9*-negativ sind (Peters, 1997).

Möglicherweise ist dieser Widerspruch durch unterschiedliche Funktionen von *PAX9* während der Embryogenese und im adulten Organismus zu erklären.

Ein plausibles Modell beschreibt, dass *Pax*-Gene für die schnelle Proliferation einer organspezifischen Stammzellpopulation verantwortlich sind. Bei Erreichen einer kritischen Masse der Stammzellpopulation wird die Expression der *Pax*-Gene anschließend herunterreguliert, um weitere Differenzierungsprozesse einzuleiten (Dahl, 1997).

Auch andere Transkriptionsfaktoren zeigen unterschiedliche Wirkungsmechanismen, je nachdem ob sie während der embryonalen Entwicklungsphase exprimiert werden oder ob sie ihre Funktion im adulten Gewebe ausüben, da sie der Regulation durch andere Gene unterliegen (Berry, 2002). Ein Beispiel hierfür sind *FGFR1* und *FGFR3*. Beide steigern bei in vitro-Untersuchungen die mitotische Aktivität in Chondrozyten-Zellkulturen, *FGFR1* hierbei stärker als *FGFR3*. In vivo dagegen inhibiert *FGFR3* die Chondrozytenproliferation. Das Krankheitsbild der Achondroplasie wird unter anderem durch Gen-aktivierende Mutationen von *FGFR3* verursacht (Wang, Q. 2001).

In der Mehrzahl der in der vorliegenden Arbeit untersuchten invasiven Karzinome ließ sich *PAX9* nachweisen. Das maligne Potential von Tumorzellen geht zwar oft mit einem

Differenzierungsverlust der Zellen einher, der Verlust epithelialer Differenzierungsmarker ist aber dennoch keine Voraussetzung für malignes Wachstum (Fusenig, 1995). Es muss auch berücksichtigt werden, dass die Beurteilung der Funktion eines Transkriptionsfaktors in (prä-) maligne verändertem Gewebe nur im Kontext der Expression der anderen beteiligten Gene möglich ist (Berry, 2002).

Die *PAX9*-Expression in den untersuchten Karzinomen könnte auch auf einer Reaktivierung des embryonalen Expressionsmusters beruhen. Eine Überexpression von mutiertem *PAX9* wäre ebenfalls denkbar; eventuell wird das mutierte Genprodukt vom hier verwendeten Antikörper nicht detektiert.

Insgesamt scheint eine entscheidende Rolle von *PAX9* bei der Entstehung von Karzinomen jedoch eher unwahrscheinlich zu sein, nicht zuletzt weil *PAX9* keine Homeodomain aufweist. Das onkogene Potential von beispielsweise *PAX3* nimmt seinen Ursprung von der Homeodomain, nicht von der Paired domain (Lam, 1999). Da *PAX9* keine Homeodomain besitzt, ist sein onkogenes Potential vermutlich geringer ausgeprägt als bei *PAX*-Genen mit vollständiger (*PAX3*, *PAX4*, *PAX6* und *PAX7*) oder rudimentärer Homeodomain (*PAX 2*, *PAX5* und *PAX8*) (Gerber, 2002).

5. Zusammenfassung

Die neun *Pax*-Gene kodieren für eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die als gemeinsames Kennzeichen eine sog. paired domain als DNA-Bindungsmotiv besitzen.

Sie steuern eine Reihe von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen während der Embryogenese; bei Deletionen resultieren charakteristische Fehlbildungssyndrome und Organrudimente bzw. – hypoplasien. Weiterhin wurden verschiedene Mutationen beschrieben, die mit bestimmten Tumorentitäten assoziiert sind. Beispielsweise ist das *PAX3*- bzw. *PAX7-FKHR*-Fusionsgen für die Entstehung alveolärer Rhabdomyosarkome verantwortlich. Als möglicher Auslöser der malignen Transformation wurde gezeigt, dass *PAX2*, *PAX5* und *PAX8* in der Lage sind, an eine spezifische PAX-Bindungsstelle des Tumorsuppressorgens *p53* zu binden und dadurch seine Expression zu unterdrücken.

Bei *Pax9* handelt es sich um das jüngste Mitglied dieser Genfamilie. Immunhistochemische Untersuchungen an Mäuseembryonen zeigten, dass die *Pax9*-Expression im Vorderdarmepithel beginnt. Weitere wesentliche Expressionsorte sind die Zahnanlagen, der Thymus und die spätere Wirbelsäule. *Pax9* scheint hier eine wichtige Rolle bei der epithelial-mesenchymalen Interaktion zu spielen, entsprechend weisen *Pax9*-knock-out-Mäuse Fehlbildungen der genannten Organe auf. Im Ösophagus der adulten Maus ist die Expression von *Pax9* auf differenzierte Keratinozyten beschränkt; auch im menschlichen Ösophagus lässt sich *PAX9* vor allem im Stratum spinosum nachweisen.

Vor dem Hintergrund des onkogenen Potentials bestimmter *PAX*-Gene wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob im dysplastischen Epithel und in invasiven Karzinomen des menschlichen Ösophagus und der Cervix uteri eine Über- oder Unterexpression von *PAX9* vorliegt. Als gemeinsames Kennzeichen sind diese Hohlorgane von mehrschichtigem Plattenepithel ausgekleidet, und die Expression von *PAX9* ist hauptsächlich auf differenzierte Keratinozyten des Stratum spinosum beschränkt. Die proliferativ aktiven Basalzellen und die ausdifferenzierten absterbenden Zellen des Stratum superficiale sind überwiegend *PAX9*-negativ.

Während die *PAX9*-Expression im geringgradig dysplastischen Epithel des Ösophagus und der Cervix uteri keine Unterschiede zur Expression im gesunden Epithel aufweist, nimmt der Anteil *PAX9*-positiver Keratinozyten im mäßiggradig und hochgradig dysplastischen Epithel stark ab. In Arealen mit hochgradiger Dysplasie ist gleichzeitig mit dem Verlust der morphologischen Differenzierung der einzelnen Epithelschichten auch das charakteristische Expressionsmuster von *PAX9* aufgehoben. *PAX9* kann somit im adulten Organismus als

platteneithelialer Differenzierungsmarker aufgefasst werden. Hierfür spricht der zunehmende Verlust der *PAX9*-Expression mit steigendem Dysplasiegrad des Epithels.

Auch in invasiven Plattenepithelkarzinomen von Ösophagus und Cervix uteri fand sich eine im Vergleich zum gesunden Epithel verringerte *PAX9*-Expression. Der vollständige Verlust eines Differenzierungsmarkers stellt jedoch keine Voraussetzung für malignes invasives Wachstum dar, *PAX9* lässt sich in der Mehrzahl der Ösophagus- und Cervixkarzinome nachweisen. Als mögliche Ursache hierfür kommt eine Redifferenzierungstendenz im Karzinom in Frage. Eine Korrelation zwischen *PAX9*-Expression und Malignitätsgrad, Tumorstadium oder Lymphknotenbefall konnte nicht festgestellt werden.

Somit scheint ein vollständiger Verlust oder auch eine Überexpression von *PAX9* nicht an der Ätiologie invasiver Plattenepithelkarzinome beteiligt zu sein. Eine interessante noch offene Frage ist, ob das *PAX9*-Gen in diesen Plattenepithelkarzinomen mutiert ist und das Genprodukt deshalb eine geringere Affinität zu dem verwendeten Detektions-Antikörper aufweist.

Weiterhin wurde gezeigt, dass *PAX9* keinen spezifischen Marker für eine platteneitheliale Differenzierung darstellt. Auch in submukösen Drüsenepithelien und im metaplastischen Zylinderepithel des Ösophagus sowie im Zylinderepithel des Übergangs von Platten- zu Zylinderepithel der Cervix uteri konnte eine *PAX9*-Expression nachgewiesen werden.

6.Literaturverzeichnis

1. Anderson, J., Gordon, A., Pritchard-Jones, K., Shipley, J.: Genes, chromosomes and rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 26 (1999) 26, 275-285
2. Barr, F.G: Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 20 (2001) 5736-5746
3. Barr, F.G., Galili, N., Holick, J., Biegel, J.A., Rovera, G., Emanuel, B.S.: Rearrangement of the *PAX3* paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature gen.* 3 (1993) 113-117
4. Battifora, H., Kopinski, M.: The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 34 (1986) 1095-1100
5. Battifora. H.: p53 immunohistochemistry: a word of caution. *Human pathology* 25 (1994) 435-437
6. Becker, K.F., Atkinson, M.J., Reich, U.: E-Cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res.* 54 (1994) 3845-3852
7. Berry, C.: Development and pathology: the *Pax* genes. Editorial. *J. Pathol.* 1997 (2002) 279-280
8. Broders, A.C.: Practical points on the microscopic grading of carcinoma. *N.Y. State J. Med.* 32 (1932) 667-671
9. Busslinger, M., Klix, N., Pfeffer, P., Graninger, P.G., Kozmik, Z.: Deregulation of PAX-5 by translocation of the Emu enhancer of the IgH locus adjacent to two alternative PAX-5 promoters in a diffuse large-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 93 (1996) 6129-6134
10. Campbell, R.J., Pignatelli, M.: Molecular histology in the study of solid tumours. *J. Clin. Pathol.* 55 (2002) 80-82
11. Chalepakis, G., Fritsch, R., Fickenscher, H., Deutsch, U., Goulding, M., Gruss, P.: The molecular basis of the *undulated pax-1* mutation. *Cell* 66 (1991) 873-884
12. Coggi, G., Dell'Orto, P., Viale, G.: Avidin-Biotin methods. In: Polak, J., Van Noorden, S.: Immunocytochemistry - Modern methods and applications. Wright, Bristol, 2nd edition 1986, 54-70
13. Crissman, J., Visscher, D., Sarkar, F.: Premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: biomarkers of genetic alterations, proliferation and differentiation. *J. cell. Biochem. Suppl.* 17F (1993) 192-198
14. Dahl, E., Koseki, H., Balling, R.: *Pax* genes and organogenesis. *BioEssays* 19 (1997) 1-10

15. Dawsey, S., Lewin, K., Liu, F.S., Wang, G.Q., Shen, Q.: Esophageal morphology from Linxian, China. *Cancer* 73 (1994) 2027-37
16. Duboule, D.: Guidebook to the Homeobox Genes, Oxford Univ. Press, Oxford, 1994
17. Epstein, J.A., Song, B., Lakkis, M., Wang, C.: Tumorspecific Pax3-FKHR transcription factor, but not Pax3, activates the platelet-derived growth factor alpha receptor. *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 4118-4130
18. Fusenig, N.E., Breitkreutz, D., Boukamp, P., Tomakidi, P.: Differentiation and tumor progression. *Recent results in cancer research* 139 (1995) 1-19
19. Gerber, J.K., Gogel, E., Berger, C., Wallisch, M., Muller, F., Grummt, I., Grummt, F.: Termination of mammalian rDNA replication: polar arrest of replication fork movement by transcription termination factor TTF-I. *Cell* 90 (1997) 559-567
20. Gerber, J.K., Richter, T., Kremmer, E., Adamski, J., Höfler, H., Balling, R., Peters, H.: Progressive loss of PAX9 expression correlates with increasing malignancy of dysplastic and cancerous epithelium of the human esophagus. *J. Pathol.* 197 (2002) 293-7
21. Gomez-Lechon, M., Donato, T., Jover, R., Rodriguez, C., Ponsoda, X., Glaise, D., Castell, J., Guguen-Guillouzo, C.: Expression and induction of a large set of drug-metabolizing enzymes by the highly differentiated human hepatoma cell line BC2. *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 1448-1459
22. Goulding, M., Sterrer, S., Fleming, J., Balling, R., Nadeau, J., Moore, K.J., Brown, S.D.M., Steel, K.P., Gruss, P.: Analysis of the pax-3 gene in the mouse mutant *plotch*. *Genomics* 17 (1993) 355-363
23. Gown, A., deWeber, N., Battifora, H.: Microwave-based antigenic unmasking. A revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem.* 1 (1993) 256-266
24. Green, N.M.: Avidin. In: Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards, F.M.: Advances in protein chemistry, vol. 29. Academic Press, New York, 1975, 85-133
25. Hamilton, S., Aaltonen, L.: World health organization classification of tumours: Pathology and Genetics of tumours of the digestive system. IARC Press, Lyon, 2000, 15-16
26. Hanna, W.: Testing for HER2 status. *Oncology* 61, suppl.2 (2001) 22-30
27. Herber, R., Liem, A., Pitot, H., Lambert, P.: Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus Type 16 E7 oncogene. *J. Virology* 70 (1996) 1873-1881

28. Hetzer-Egger, C., Schorpp, M., Haas-Assenbaum, A., Balling, R., Peters, H., Boehm, T.: Thymopoiesis requires *Pax9*-function in thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* 32 (2002) 1175-1181
29. Hollstein, M.C., Peri, L., Mandard, A.M., Welsh, J.A., Montesano, R., Metcalf, R.A., Bak, M., Harris, C.C.: Genetic analysis of human esophageal tumor from two high incidence geographic areas: frequent p53 base substitutions and absence of ras mutations. *Cancer Res.* 51 (1991) 4102-4106
30. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29 (1981) 577-580
31. Ismail-Beigi, F., Horton, P.F., Pope, C.E.: Histological consequences of gastroesophageal reflux in men. *Gastroenterology* 58 (1970) 163-174
32. Jiang, W., Zhang, Y.J., Kahn, S.M., Hollstein, M.C., Santella, R.M., Lu, S.H., Harris, C.C., Montesano, R., Weinstein, I.B.: Altered expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 (1993) 9026-9030
33. Jordan, T., Hanson, I., Zaletayev, D., Hodgson S., Prosser, J., Seawright, A., Hastie, N., Van Heyningen, V.: The human *PAX6* gene is mutated in two patients with aniridia. *Nature Genet.* 1 (1992) 328-332
34. Karam, S.: Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Frontiers in Bioscience* 4 (1999) d286-298
35. Kozmik, Z., Wang, S., Dörfler, P., Adams, B., Busslinger, M.: The promotor of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Molec. cell. Biol.* 12 (1992) 2662-2672
36. Kozmik, Z., Sure, U., Ruedi, D., Busslinger, M., Aguzzi, A.: Deregulated expression of PAX5 in medulloblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (1995) 5709-5713
37. Kremmer, E., Kranz, B.R., Hille, A., Klein, K., Eulitz, M., Hoffmann-Fezer, G., Feiden, W., Herrmann, K., Delecluse, H.J., Delsol, G., Bornkamm, G.W., Mueller-Lantsch, N., Grässer, F.A.: Rat monoclonal antibodies differentiating between the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2A (EBNA2A) and 2B (EBNA2B). *Virology* 208 (1995) 336-342
38. Lam, P.Y., Sublett, J.E., Hollenbach, A.D., Roussel, M.F.: The oncogenic potential of the Pax3-FKHR fusion protein requires the Pax3 homeodomain recognition helix but not the Pax3 paired box DNA binding domain. *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) 594-601
39. Lechner, M.S., Dressler, G.R.: Mapping of Pax-2 transcription activation domains. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 21088-21093

40. Lin, D., Shields, M.T., Ullrich, S.J., Appella, E., Mercer, W.E.: Growth arrest induced by wild-type p53 protein blocks cells prior to or near the restriction point in late G1 phasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 9210-4
41. Lu, S.H., Hsieh, L.L., Luo, F.C., Weinstein, I.B.: Amplification of the EGF receptor and c-myc genes in human esophageal cancers. *Int. J. Cancer* 42 (1988) 502-505
42. Mansouri, A., Chowdhury, K., Gruss, P.: Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat. Genet.* 19 (1998) 87-90
43. Mao, S.Y., Javois, L.C., Kent, U.: Overview of antibody use in immunocytochemistry. In: Javois, L.C.: *Methods in molecular biology*, Vol. 34, Immunocytochemical methods and protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1st edition 1994, 3-11
44. Maulbecker, C., Gruss, P.: The oncogenic potential of Pax genes. *EMBO Journal* 12 (1992) 2361-2367
45. McKee, P.H., Hobbs, C., Hall, P.A.: Antigen retrieval by microwave irradiation lowers immunohistological detection thresholds. *Histopathology* 23 (1993) 377-379
46. Miettinen, M.: Immunohistochemistry of solid tumors – brief review of selected problems. *APMIS* 98 (1990), 191-199
47. Müller, T., Ebensperger, C., Neubüser, A., Koseki, H., Balling, R., Christ, B., Wilting, J.: Expression of avian Pax1 and Pax9 is intrinsically regulated in the pharyngeal endoderm, but depends on environmental influences in the paraxial mesoderm. *Dev. Biol.* 178 (1996) 403-417
48. Neubüser, A., Koseki, H., Balling, R.: Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1. *Dev. Biol.* 170 (1995) 701-716
49. Ordonez, N.G., Manning, J.T., Brooks, T.E.: Effect of trypsinization on the immunostaining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Am. J. Surg. Pathol.* 12 (1987) 121-129
50. Pattin, A., Goridis, C., Brunet, J.F.: Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b. *Mol. Cell. Neurosci.* 15 (2000) 235-243
51. Peters, H., Schuster, G., Neubüser, A., Richter, T., Höfler, H., Balling, R.: Isolation of the PAX 9 cDNA from adult human esophagus. *Mammalian genome* 8 (1997) 62 - 64
52. Peters, H., Neubüser, A., Kratochwil, K., Balling, R.: Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev.* 12 (1998) 2735-2747
53. Peters, H., Wilm, B., Sakai, N., Imai, K., Maas, R., Balling, R.: Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. *Development* 126 (1999) 5399-5408

54. Peters, H., Balling, R.: Teeth – where and how to make them. *Trends in genetics* 15 (1999b) 59-65
55. Poleev, A., Fickenscher, H., Mundlos, S., Winterpacht, A., Zabel, B., Fidler, A., Gruss, P., Plachov, D.: PAX8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney, and Wilm's tumors. *Development* 116 (1992) 611-623
56. Richards, F.F., Varga, J.M., Rosenstein, R.W., Konigsberg, W.H.: Antigen-combining region of immunoglobulins. In: Glynn, L.E., Steward, M.W.: Structure and function of antibodies. John Wiley and Sons, New York, 1981, 59-88
57. Haggit, R.C.: Histopathology of reflux-induced esophageal and supraesophageal injuries. *Am. J. Med.* 108 (2000) 109S-111S
58. Salem, C.E., Markl, I.D., Bender, C.M., Gonzales, F.A., Jones, P.A., Liang, G.: PAX6 methylation and ectopic expression in human tumor cells. *Int. J. Cancer* 87 (2000) 179-185
59. Sanyanusin, P., Schimmenti, L.A., McNoe, L.A., Ward, T.A., Pierpont, M.E., Sullivan, M.J., Dobyns, W.B., Eccles, M.R.: Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet* 9 (1995) 358-64
60. Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A., Howley, P.M.: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63 (1990) 1129-1136
61. Schmahl, W., Knoedlseder, M., Favor, J., Davidson, D.: Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations are associated with *small eye (sey)* in the mouse, a point mutation at the *pax-6* locus. *Acta neuropathol* 86 (1993) 126-135
62. Scholl, F.A., Kamarashev, J., Murmann, O.V., Geertsens, R., Dummer, R., Schafer, B.W.: PAX3 is expressed in melanomas and contributes to tumor cell survival. *Cancer Res.* 61 (2001) 823-826
63. Schuffenhauer, S., Leifheit, H.J., Lichtner, P., Peters, H., Murken, J., Emmerich, P.: De novo deletion (14) (q11.2q13) including PAX9: clinical and molecular findings. *J. Med. Genet.* 36 (1999) 233-236
64. Singh, S., Stellrecht, C.M., Tang, H.K., Saunders, G.F.: Modulation of PAX6 homeodomain function by the paired domain. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 17306-17313
65. Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G., Gruss, P.: The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386 (1997) 399-402
66. Stapleton, P., Weith, A., Urbanek, P., Kozmik, Z., Busslinger, M.: Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nature genetics* 3 (1993) 292-298

67. Sternberger, L.A.: Immunocytochemistry. John Wiley and Sons, New York, 3rd edition 1986
68. Stockton, D., Das, P., Goldenberg, M., D'Souza, R., Patel, P.: Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nature genetics* 24 (2000) 18-19.
69. St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A., Gruss, P.: Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha cells in the mouse pancreas. *Nature* 387 (1997) 406-409
70. Strachan, T., Read, A.: PAX genes. *Current opinion in Genetics and Development* 4 (1994) 427-438
71. Swanson, P.: Foundations of immunohistochemistry. *Am. J. Clin. Pathol.* 90 (1988) 333-339
72. Tassabehji, M., Read, A.P., Newton, V.E., Harris, R., Balling, R., Gruss, P., Strachan, T.: Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature* 355 (1992) 635-636
73. Tavassoli, F.A., Stratton, M.R.: World health organization classification of tumours: Pathology and Genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC Press, Lyon, 2002
74. Thesleff, I., Vaahtokari, A., Partanen, A.M.: Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Dev. Biol.* 39 (1995) 35-50
75. Treisman, J., Harris, E., Desplan, C.: The paired box encodes a second DNA-binding domain in the Paired homeo domain protein. *Genes Dev.* 5 (1991) 594-604
76. Underhill, D.A.: Genetic and biochemical diversity in the Pax gene family. *Biochem. Cell. Biol.* 78 (2000) 629-638
77. Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., Gutheil, J.C., Harris, L.N., Fehrenbacher, L., Slamon, D.J., Murphy, M., Novotny, W.F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S.J., Press, M.: Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 719-26.
78. Wakatsuki, Y., Neurath, M., Max, E., Strober, W.: The B cell-specific transcription factor BSAP regulates B cell proliferation. *J. Exp. Medicine* 179 (1994) 1099-1108
79. Wallin, J., Eibel, H., Neubüser, A., Wilting, J., Koseki, H., Balling, R.: Pax1 is expressed during development of the thymus epithelium and is required for normal T-cell maturation. *Development* 122 (1996) 23-30
80. Walther, C., Guenet, J.L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M.D., Plachov, D., Balling, R., Gruss, P.: Pax – a Murine Multigene Family of Paired Box – Containing Genes. *Genomics* 11 (1991) 424-434

81. Wang, H., Pevsner, J.: Detection of endogenous biotin in various tissues: novel functions in the hippocampus and implications for its use in avidin-biotin technology. *Cell Tissue Res* 296 (1999) 511-516
82. Wang, Q., Green, R. P., Ornitz D. M.: Differential regulation of enchondrial bone growth and joint development by FGFR1 and FGFR3 tyrosine kinase domains. *Development* 218 (2001) 3867-3876
83. Watanabe, H., Jass, J.R., Solin, L.: Histological typing of esophageal and gastric tumors. Springer-Verlag, Berlin, 2nd ed. 1990, 11-18
84. Wittekind, C., Bootz, F., Meyer, H.J.: TNM classification of malignant tumors. International union against cancer. 4th edition. Springer, Berlin, 1987, 40-42
85. Wittekind, C., Sobin, L.: TNM Klassifikation maligner Tumoren, Springer-Verlag, Berlin, 5. Auflage 1997a
86. Wittekind, C., Tannapfel, A.: Immunohistochemistry. *Digestion* 58, suppl.1 (1997b) 79-81
87. Xing, E.P., Nie, Y., Wang, L.D., Yang, G.Y., Yang, C.S.: Aberrant methylation of p16^{INK4} and deletion of p15^{INK5b} are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China. *Carcinogenesis* 20 (1999) 77-84
88. zur Hausen, H.: Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288 (1996) F55-F78

7. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1.1	Einteilung der Pax-Gene (nach Strachan 1994) 7
Abb. 2.1	Dysplasiegrad der untersuchten präneoplastischen Läsionen des Ösophagus 14
Abb. 2.2	Dysplasiegrad der untersuchten präneoplastischen Läsionen der Cervix uteri 16
Abb. 2.3	Darstellung der Streptavidin-Biotin-Methode 20
Abb. 3.1	Zelldifferenzierung des Ösophagusepithels 23
Abb. 3.2	Anteil PAX9-exprimierender Basalzellen im ösophagealen Plattenepithel 24
Abb. 3.3	Anteil PAX9-positiver Suprabasalzellen im ösophagealen Plattenepithel 25
Abb. 3.4	Anteil PAX9-exprimierender Zellen im Stratum spinosum des Ösophagusepithels 26
Abb. 3.5	Anteil PAX9-positiver Superfizialzellen im Plattenepithel des Ösophagus 26
Abb. 3.6	Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im Ösophagusepithel 28
Abb. 3.7	Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression in submukösen Drüsen des Ösophagus 29
Abb. 3.8	Anteil PAX9-exprimierender Basalzellen in Bereichen mit Basalzellhyperplasie des Ösophagusepithels 30
Abb. 3.9	Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression bei einem Fall von Basalzellhypertrophie des Ösophagusepithels 31
Abb. 3.10	Anteil PAX9-exprimierender Basalzellen im leichtgradig dysplastischen Ösophagusepithel 32
Abb. 3.11	Anteil PAX9-exprimierender Zellen im Stratum spinosum bei leichtgradiger Dysplasie des Ösophagusepithels 32
Abb. 3.12	Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im leichtgradig dysplastischen ösophagealen Plattenepithel 33
Abb. 3.13	PAX9-Expression in basalen Zellen bei mäßiggradiger Dysplasie des Ösophagusepithels 34
Abb. 3.14	PAX9-Expression in der Epithelmitte bei mäßiggradiger Dysplasie des Ösophagusepithels 34

Abb. 3.15	Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im mäßiggradig dysplastischen ösophagealen Plattenepithel	35
Abb. 3.16	Anteil PAX9-positiver Zellen im hochgradig dysplastischen Ösophagusepithel	36
Abb. 3.17	Expressionsmuster von PAX9 im hochgradig dysplastischen Ösophagusepithel	36
Abb. 3.18	Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im hochgradig dysplastischen Ösophagusepithel	37
Abb. 3.19	PAX9-Expression in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus	38
Abb. 3.20	Homogenität und Inhomogenität der PAX9-Expression in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus	39
Abb. 3.21	Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im invasiven Ösophaguskarzinom I	40
Abb. 3.22	Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im invasiven Ösophaguskarzinom II	40
Abb. 3.23	Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im invasiven Ösophaguskarzinom III	41
Abb. 3.24	PAX9-Expression in mäßig differenzierten Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus	42
Abb. 3.25	Vergleich der PAX9-Expression im gesunden Epithel, im gering- bis mäßiggradig dysplastischen Epithel und im hochgradig dysplastischen Epithel mit der Expression in invasiven Ösophaguskarzinomen (G1, G2)	43
Abb. 3.26	PAX9-Expression in schlecht differenzierten Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus	44
Abb. 3.27	Vergleich der PAX9-Expression im gesunden Epithel, im gering- bis mäßiggradig dysplastischen Epithel und im hochgradig dysplastischen Epithel mit der Expression in invasiven Ösophaguskarzinomen (G3)	45
Abb. 3.28	Anteil PAX9-positiver Tumorzellen in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus bezogen auf den Differenzierungsgrad	46
Abb. 3.29	PAX9-Expression und Tumorstadium in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus	46
Abb. 3.30	PAX9-Expression und Lymphknotenstatus in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus	47
Abb. 3.31	PAX9-Expression im metaplastischen Zylinderepithel des Ösophagus	48

Abb. 3.32	PAX9-Expression im leicht-bis mäßiggradig dysplastischen Zylinderepithel des Ösophagus	48
Abb. 3.33	PAX9-Expression im hochgradig dysplastischen Zylinderepithel des Ösophagus	49
Abb. 3.34	PAX9-Expression im invasiven Adenokarzinom des Ösophagus	49
Abb. 3.35	PAX9-Expression bei gut, mäßig und schlecht differenzierten Adenokarzinomen des Ösophagus	50
Abb. 3.36	Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im Barrettkarzinom	50
Abb. 3.37	Expression von PAX9 in den Basalzellen des Plattenepithels der Cervix uteri	54
Abb. 3.38	Expression von PAX9 in den suprabasalen Zellen des Plattenepithels der Cervix uteri	55
Abb. 3.39	Expression von PAX9 in Basalzellen und Suprabasalzellen des Plattenepithels der Cervix uteri	55
Abb. 3.40	Anteil PAX9-positiver Zellen im Stratum spinosum des Plattenepithels der Cervix uteri	56
Abb. 3.41	PAX9-Expression im Stratum superficiale des Cervixepithels	56
Abb. 3.42	Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im Plattenepithel der Cervix uteri	57
Abb. 3.43	PAX9-Expression im Zylinderepithel der zervikalen Junctionszone	58
Abb. 3.44	PAX9-Expression in Basalzellen des leicht- und mäßiggradig dysplastischen Plattenepithels der Cervix uteri	59
Abb. 3.45	PAX9-Expression in der Epithelmitte des leicht- und mäßiggradig dysplastischen Plattenepithels der Cervix uteri (CIN I und CIN II)	59
Abb. 3.46	PAX9-Expression in den Superfizialzellen des leicht- und mäßiggradig dysplastischen Plattenepithels der Cervix uteri (CIN I und CIN II)	60
Abb. 3.47	Expression von PAX9 im hochgradig dysplastischen Plattenepithel der Cervix uteri (CIN III)	61
Abb. 3.48	Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im hochgradig dysplastischen Plattenepithel der Cervix uteri	62
Abb. 3.49	PAX9-Expression in invasiven Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri	63
Abb. 3.50	Prozentualer Anteil PAX9-exprimierender Tumorzellen in Cervixkarzinomen	63

Abb. 3.51	Vergleich der PAX9-Expression im gesunden Epithel und im Karzinom	64
Abb. 3.52	Vergleich der PAX9-Expression im hochgradig dysplastischen Epithel der Cervix uteri (CIN III) und im Karzinom	64
Abb. 3.53	Immunhistochemische Darstellung der PAX9-Expression im Plattenepithelkarzinom der Cervix uteri	65
Abb. 3.54	Anteil PAX9-positiver Tumorzellen in Cervixkarzinomen bezogen auf den Malignitätsgrad	65
Abb. 3.55	PAX9-Expression und Tumorstadium bei Cervixkarzinomen	66

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	TNM-Stadium und Malignitätsgrad der untersuchten Plattenepithelkarzinome des Ösophagus	15
Tab. 2.2	TNM-Stadium und Malignitätsgrad der untersuchten Adenokarzinome des Ösophagus	15
Tab. 2.3	TNM-Stadium und Malignitätsgrad der untersuchten Cervixkarzinome	16

9. Anhang

9.1 Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. H. Höfler für die Überlassung des Themas sowie für die Durchsicht und Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. T. Richter für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die vorzügliche Betreuung und Ansprechbarkeit in allen Belangen der Arbeit.

Herrn Dr. R. Haseneder für die große Hilfe bei der Arbeit am Computer.

Frau B. Geist und Frau R. Hegenloh für die Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen.

9.2 Lebenslauf

Marion Sonja Brunhilde Schöffel

Geboren am 14. Mai 1976 in Weiden, Tochter von Soon Schöffel, geb. Park, Krankenschwester, und Alfred Schöffel, Beamter

Schulbildung:

1982-1986	Grundschule in Weiden
1986-1995	Kepler-Gymnasium Weiden Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

1995-1997	Medizinstudium, Vorklinischer Studienabschnitt, Universität Regensburg
1997-2002	Medizinstudium, Klinischer Studienabschnitt, Technische Universität München
Seit 1998	Erstellung der vorliegenden Dissertation an der TU München, Institut für Pathologie und pathologische Anatomie, Klinikum rechts der Isar
Seit 1. Juli 2002	Ärztin im Praktikum, 3. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar