



**Technische Universität München
Fakultät für Medizin
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II**

**„Analyse der epidemiologischen und molekularen
Früherkennung zur Prognosebestimmung bei Patienten mit
Barrett-Ösophagus“**

Martina Eva Schernhammer

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Roland M. Schmid
2. apl. Prof. Dr. Marcus Feith

Die Dissertation wurde am 28.06.2019 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.11.2019
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungen.....	4
1 Einleitung	7
1.1 Steigende Inzidenz des Barrett-Karzinoms.....	7
1.2 Ursprungszellen des BE/EAC.....	10
1.3 Mausmodell.....	11
1.4 Pathogenese des EAC	13
1.4.1 Geschichte des Barrett-Ösophagus	13
1.4.2 Gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD)	14
1.4.2.1 Histologie GERD.....	15
1.4.3 Barrett-Ösophagus (BE)	16
1.4.3.1 Histologie Barrett-Ösophagus	18
1.4.4 Indefinite for dysplasia (IND)	18
1.4.4.1 Histologie indefinite for dysplasia	19
1.4.5 Geringgradige intraepitheliale Neoplasie (IglEN)	19
1.4.5.1 Histologie IglEN	19
1.4.6 Hochgradige intraepitheliale Neoplasie (hgIEN)	20
1.4.6.1 Histologie hgIEN	21
1.4.7 Adenokarzinom des Ösophagus (EAC)	21
1.4.7.1 Histologie EAC.....	24
1.5 Surveillance des Barrett-Ösophagus	25
1.5.1 Problematik der Surveillance.....	27
1.6 Therapie	28
1.6.1 Therapie GERD	28
1.6.2 Therapie Barrett-Ösophagus ohne / mit Dysplasie.....	28
1.6.3 Therapie EAC	29
1.7 Biomarker zur Risikobestimmung.....	32
1.7.1 Bisherige Biomarker-Konzepte.....	32
1.7.2 Mögliche neue Biomarker-Konzepte	32
1.7.2.1 HE/PAS-Färbung	33
1.7.2.2 Notch1	33
1.7.2.3 Lgr5	36
1.7.2.4 Dclk1	37
1.7.2.5 TFF2.....	38
1.8 Ziele der Arbeit.....	40

2	Material und Methoden	41
2.1	Material und Patientenkollektiv	41
2.2	Färbeprotokolle	43
2.2.1	Färbeprotokoll HE/PAS	43
2.2.2	Färbeprotokoll Notch1	43
2.2.3	Färbeprotokoll Lgr5.....	44
2.2.4	Färbeprotokoll Dclk1	45
2.2.5	Färbeprotokoll TFF2	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Statistische Methoden	47
3.2	Statistische Auswertung	48
3.2.1	Epidemiologische Ergebnisse	48
3.2.2	Ergebnisse HE/PAS- und immunhistochemische Färbungen	50
3.2.2.1	HE/PAS-Färbung	50
3.2.2.2	Notch1.....	52
3.2.2.3	Lgr5.....	54
3.2.2.4	Dclk1	56
3.2.2.5	TFF2.....	58
3.2.3	Kombinierte logistische Regressionsmodelle	60
4	Diskussion.....	63
4.1	Rolle der einzelnen Färbungen/Biomarker.....	63
4.1.1	Rolle von HE/PAS bei Patienten mit BE/EAC.....	63
4.1.2	Rolle von Notch1 bei Patienten mit BE/EAC.....	66
4.1.3	Rolle von Lgr5 bei Patienten mit BE/EAC	67
4.1.4	Rolle von Dclk1 bei Patienten mit BE/EAC	71
4.1.5	Rolle von TFF2 bei Patienten mit BE/EAC.....	73
4.2	Diskussion der Ursprungszelle des BE/EAC.....	76
5	Zusammenfassung	81
6	Abbildungsverzeichnis	83
7	Tabellenverzeichnis	85
8	Literaturverzeichnis.....	86
9	Publikation	95
	Anhang.....	96
	Danksagung	101

Abkürzungen

ABC	avidin-biotin-complex
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
AGA	American Gastroenterological Association
APC	adenomatous polyposis coli
AUC	area under the curve
BE	Barrett-Ösophagus, Barrett's esophagus
CBC	crypt base columnar cell
CLE	hochprismatisches Zylinderepithel, columnar lined epithelium
CSC	Tumorstammzelle, cancer stem cell
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPT	N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)- L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester
Dclk1	doublecortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like 1
EAC	Adenokarzinom des Ösophagus, esophageal adenocarcinoma
EGJ	esophagogastric junction (Grenze zw. Ösophagus und Magen)
EMR	endoskopische Mukosaresektion
ERD	erosive Refluxkrankheit, erosive reflux disease
ESD	endoskopische Submukosadissektion
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HE	Hämatoxylin-Eosin
GC	Becherzelle, goblet cell
GERD	gastroösophageale Refluxkrankheit, gastroesophageal reflux disease
hgIEN	hochgradige intraepitheliale Neoplasie, high grade intraepithelial neoplasia
HP	Helicobacter pylori

IL	Interleukin
IM	intraepitheliale Metaplasie
IMC	immature myeloid cells
IND	indefinite for dysplasia
IgIEN	niedriggradige intraepitheliale Neoplasie, low grade intraepithelial neoplasia
Lgr5	Leucine rich repeat containing G-protein coupled receptor 5
NERD	non erosive reflux disease
NICD	Notch Intracellular Domain
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
NTC	Notch Transcriptional Complex
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
PAS	Periodic Acid Schiff (Färbung)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, phosphat buffered saline
PPI	Protonenpumpeninhibitor
RFA	Radiofrequenzablation
ROC-Kurve	Receiver-Operating-Characteristic-Kurve
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RCTx	Radiochemotherapie
RTx	Radio-Therapie, Bestrahlung
SCC	Plattenepithelkarzinom, squamous cell carcinoma
SCJ	sqamocolumnar junction (Grenze zwischen Plattenepithel und Zylinderepithel, \cong Z-Linie)
SP	spasmolytic polypeptide
SPEM	spasmolytic polypeptide (=TFF2) expressing metaplasia
TA	transit amplifying

TACE	TNF α -converting-enzyme
TBST	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TFF	trefoil factor family
Tis	Tumor in situ (= Carcinoma in situ)
TTE	TFF2 mRNA transcript-expressing cells
UACL	ulcer associated cell lineage

1 Einleitung

1.1 Steigende Inzidenz des Barrett-Karzinoms

Die Inzidenz des Adenokarzinoms des Ösophagus (esophageal adenocarcinoma, EAC) ist in der westlichen Welt seit den 1970er Jahren sprunghaft um ca. 500% angestiegen.(26) Dies entspricht der größten Zahl an Neuerkrankungen unter allen Karzinomen. Dabei ist die genaue Ursache für diese Entwicklung bisher nicht eindeutig geklärt. Die Entstehung des EAC erfolgt nach bisherigen Erkenntnissen über mehrere Stufen, eine Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz.(69) Als wichtigster Risikofaktor gilt dabei der Reflux von saurem Mageninhalt in die Speiseröhre, wodurch dort eine Entzündungsreaktion hervorgerufen werden kann. Dadurch kommt es zu einer Umwandlung des originären Plattenepithels in eine spezialisierte intestinale Metaplasie, dem so genannten Barrett-Ösophagus (BE).(99) Dieser kann sich über eine low grade intraepitheliale Neoplasie (lgIEN) und high grade intraepitheliale Neoplasie (hgIEN) schließlich zu einem Barrett-Karzinom (EAC) entwickeln.(69) Trotz der immer besseren Behandlung des Refluxes durch säure-suppressive Medikamente wie z.B. Protonenpumpeninhibitoren oder H2-Rezeptor-Antagonisten steigt die Zahl der Betroffenen stetig an.(69) Der BE stellt mit seiner Rolle als Vorläuferläsion den bisher wichtigsten Risikofaktor für die Entwicklung eines EAC dar. Als weitere Risikofaktoren gelten u. a. weiße Rasse, höheres Lebensalter, männliches Geschlecht sowie Adipositas.(146) Bisher ist für die Diagnosestellung des Barrett-Ösophagus in Deutschland und vielen weiteren Ländern die endoskopische Verifizierung einer Barrett-Metaplasie sowie der histologische Nachweis einer spezialisierten intestinalen Metaplasie mit Becherzellen erforderlich.(140) Die Verlaufskontrolle des BE erfolgt aktuell leitliniengemäß anhand so genannter Surveillance-Endoskopien, denen sich die Patienten in regelmäßigen Abständen unterziehen müssen. Allerdings ist die Progressionsrate vom BE zum EAC mit ca. 0,12% pro Jahr sehr gering.(61) Trotz der großen Anzahl an Patienten, die an den Surveillance-Endoskopien teilnimmt, kann jedoch nur eine geringe Anzahl an Karzinomen diagnostiziert werden. Zudem ist diese Art der Surveillance sehr aufwendig und kostspielig. Um die genauen pathogenetischen Mechanismen der Karzinogenese vom BE zum EAC näher untersuchen und dadurch eine geeignetere Surveillance ermöglichen zu können, wurde ein entsprechendes Mausmodell entwickelt (s.u.).(98) Anhand dieses Mausmodells konnten vier immunhistochemische Marker (Dclk1, TFF2, Lgr5, Notch1) identifiziert werden, welche im Verlauf der

Progression des BE zum EAC eine verminderte bzw. gesteigerte Expression zeigen. Durch diese Erkenntnisse entstand die Idee, dass die Biomarker als mögliche Prognosefaktoren bei Patienten mit BE dienen könnten. Aufgrund der unterschiedlichen anatomischen Gegebenheiten konnten die Ergebnisse des Mausmodells allerdings nicht unmittelbar auf den Menschen übertragen werden. Folglich wurden die immunhistochemischen Marker in einer Studie an humanen Proben analysiert. Die Ergebnisse dieser Studie mündeten in eine Publikation, wobei ein Teil der Daten auch in dieser Arbeit verwendet werden.(114) Bei Beendigung des experimentellen Teils der Doktorarbeit standen jedoch noch nicht alle Fälle zur Verfügung, sodass diese Arbeit nur einen Teil des Datensatzes beinhaltet und der Schwerpunkt vor allem in der Entwicklung der Methodik liegt.

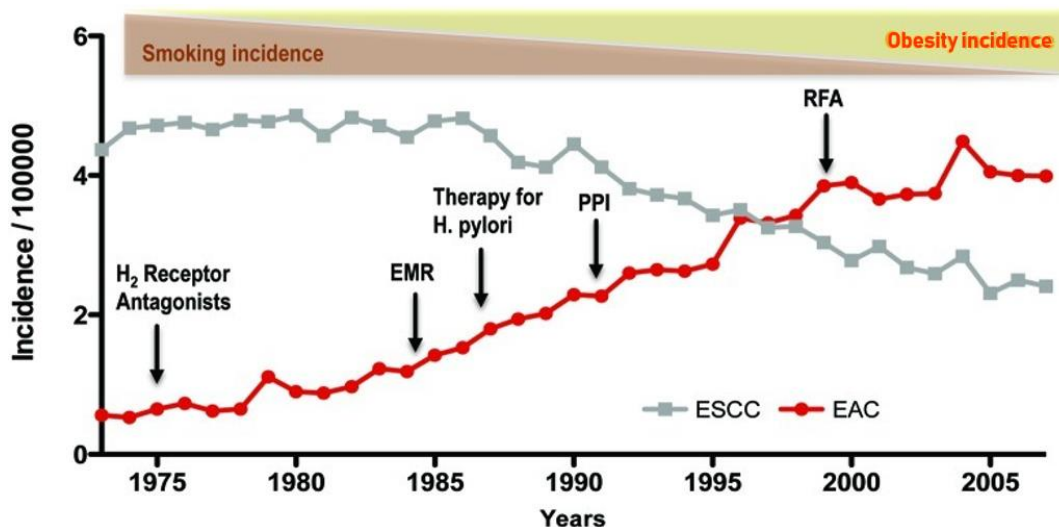


Abbildung 1: Steigende Inzidenz des Adenokarzinoms des Ösophagus (EAC) im Vergleich zum Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (ESCC). Die Inzidenz des EAC steigt dabei ebenso wie die der Adipositas. Die verbesserten Therapiemöglichkeiten z.B. mittels Einsatz von Protonenpumpenhemmern, H2-Rezeptor-Antagonisten oder Helicobacter-pylori-Eradikation sowie auch neue endoskopische oder ablative Verfahren können die steigende Zahl an Neuerkrankungen nicht entscheidend aufhalten.(97)

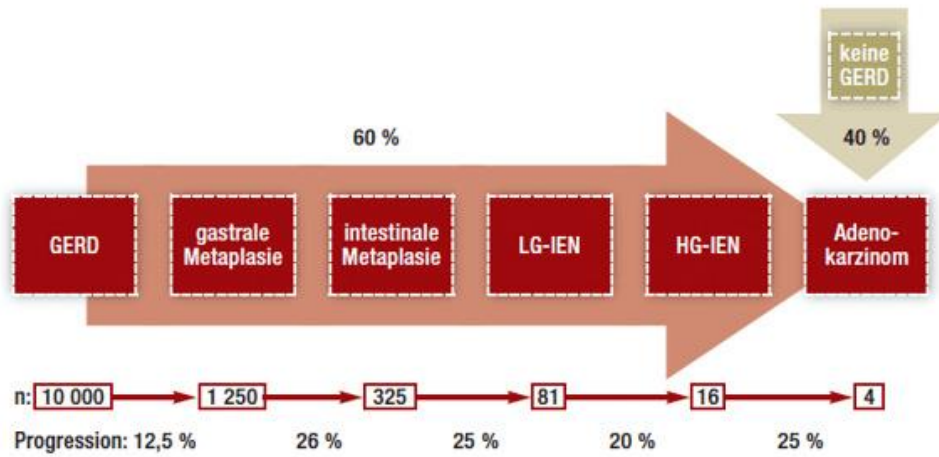


Abbildung 2: Epidemiologie des EAC (69)

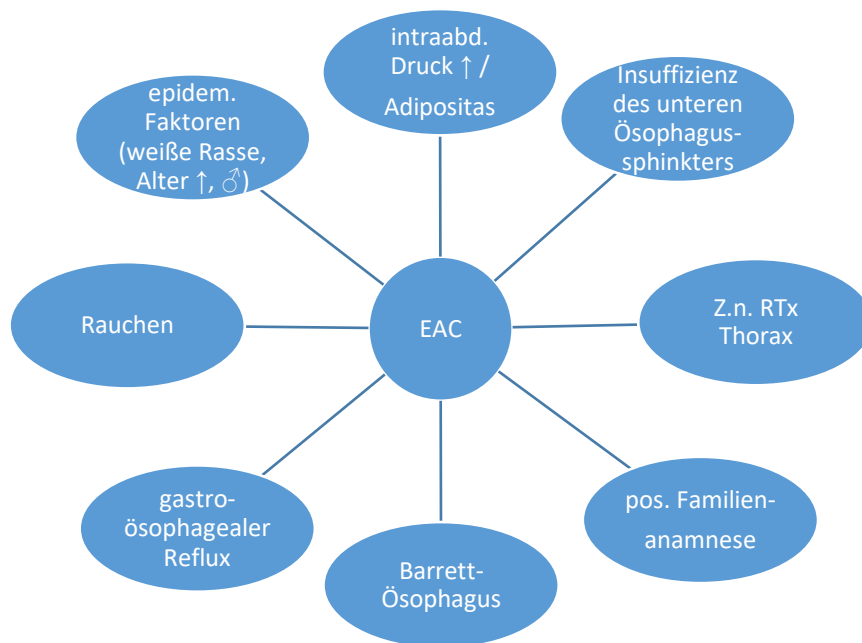


Abbildung 3: Auswahl an Risikofaktoren bei der Entwicklung des EAC (modifiziert nach Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Ösophaguskarzinom (Kurzversion), September 2015) (95)

1.2 Ursprungszellen des BE/EAC

Bisher existieren verschiedene Theorien über die Ursprungszelle des BE. Eine Theorie besteht darin, dass der BE durch die Reprogrammierung einer normalen plattenepithelialen Stammzelle in eine intestinale Stammzelle entsteht.(155) Andere Ergebnisse lassen hingegen vermuten, dass eine normalerweise in anderen Geweben ansässige Stammzelle in die Speiseröhre gelangt und dort als Ursprungszelle des BE bzw. EAC dient. Hierfür kommen zum einen submuköse ösophageale Stammzellen, die so genannten squamous gland duct cells,(71) oder zirkulierende Stammzellen, wie zum Beispiel bone marrow derived stem cells, in Frage.(110) In einer weiteren Forschungsarbeit wird die Rolle von residualen embryonalen Zellen aus dem Bereich des gastroösophagealen Übergangs als Ursprungszelle diskutiert.(149) Diese sollen die durch Reflux geschädigten, ursprünglich plattenepithelialen Areale im Sinne einer intestinalen Metaplasie rekolonialisieren. In oben bereits genanntem Mausmodell wird die Theorie befürwortet, dass diese rekolonialisierenden Zellen Lgr5-positive Stammzellen aus der Kardia darstellen, welche bei refluxassoziiertem Mukosaschaden in den Ösophagus einwandern.(98)

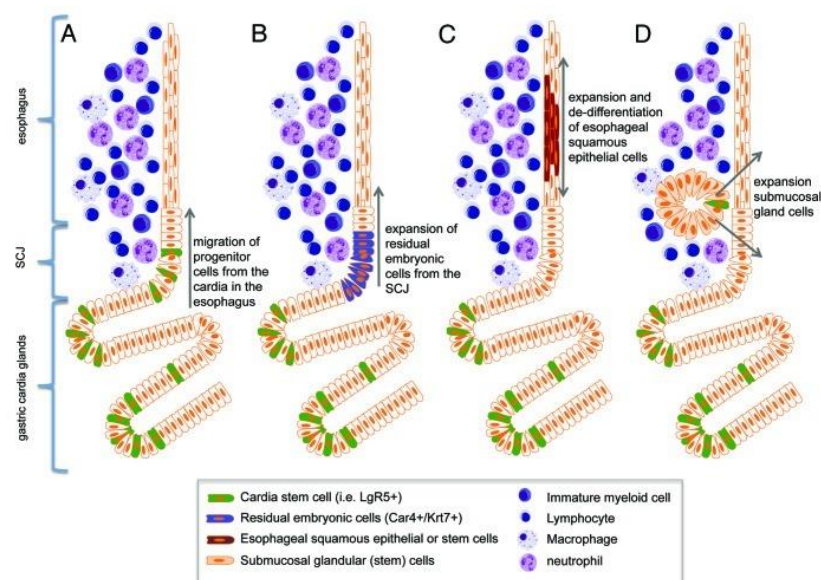


Abbildung 4: Schematische Darstellung der möglichen Ursprungszellen des Barrett-Ösophagus. (A) Lgr5-positive Stammzellen gelangen als Folge einer Entzündungsreaktion in den Ösophagus. (B) Embryogene Stammzellen wandern vom gastroösophagealen Übergang in den Ösophagus ein. (C) Dedifferenzierung ösophagealer Plattenepithelzellen mit Ausbildung einer plattenepithelialen Metaplasie. (D) Stammzellen von submukösen Drüsen als Ursprungszellen des BE.(97)

1.3 Mausmodell

Durch den andauernden Kontakt der Speiseröhre mit saurem Refluat kann es zu einer chronischen Entzündung mit vermehrter Produktion von Zytokinen kommen. So steigt zum Beispiel in Folge dessen die Konzentration von IL-1 β , IL-6 und IL-8 deutlich an, was zur Entstehung und zum Progress des Barrett-Ösophagus beitragen kann.(39) Um die Pathogenese des Barrett-Ösophagus und EAC besser zu verstehen, wurde in dem bereits genannten Mausmodell von Quante et al. eine chronische Inflammation der Speiseröhre imitiert.(97) Dazu wurde eine IL-1 β -cDNA mit einem Epstein-Barr-Virus-Promotor (EB-L2) kombiniert und die Ergebnisse anschließend anhand von gentechnischen, mikroskopischen und endoskopischen Analysen eingehend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass im Mausmodell bereits eine alleinige Erhöhung der Konzentration von IL-1 β zur Entwicklung eines Barrett-Ösophagus und in dessen Folge auch einer Dysplasie im Bereich des distalen Ösophagus führen konnte. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde auch schon in Studien mit humanem Gewebe gezeigt.(39) Des Weiteren zeigte sich, dass es durch die Säureexposition zur Ausbildung eines Zylinderepithels (columnar lined epithelium, CLE) kam. Dieses präsentierte sich jedoch ohne Becherzellen, also nicht im Sinne der klassischen intestinalen Metaplasie, auf deren Nachweis bisher in Deutschland die Diagnosestellung des Barrett-Ösophagus beruht. Allerdings ist dieser erforderliche Nachweis sehr umstritten, ergaben doch zahlreiche Studien ein gleiches Entartungsrisiko für Patienten mit CLE ohne Becherzellen im Vergleich zu Patienten mit einer spezialisierten intestinalen Metaplasie mit Becherzellen.(43; 130) Die im Mausmodell erzielte Überexpression von IL-1 β löste durch Rekrutierung von unreifen myeloiden Zellen (IMC) die Bildung einer Metaplasie bzw. Dysplasie im Bereich des gastroösophagealen Übergangs bzw. der Z-Linie (squamocolumnar junction, SCJ) aus.(97) Diese unreifen myeloiden Zellen tragen durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie z. B. IL-6 und TNF α , zur Entzündung in der Speiseröhre bei. Wurde diese Entzündungsreaktion durch die Zugabe von Gallensäuren noch verstärkt, kam es schneller zur Entwicklung einer Dysplasie und vermehrt zu einer Granulozytendifferenzierung.(97) Es bestätigten sich somit Hinweise aus älteren Studien, dass unkonjugierte Gallensäuren zu Demethylierung von Promotoren und damit zur Aktivierung der Genexpression von IL-6, Cdx2 und Notch1 im Ösophagus führen können.(62) Auch die Frage nach der Herkunft der Ursprungszelle des Barrett-Ösophagus wurde in dem L2-IL-1 β -Mausmodell genauer hinterfragt.(97) Es zeigte sich durch die Untersuchung in verschiedenen Entwicklungsstadien des BE,

dass Vorläuferzellen dafür aller Wahrscheinlichkeit nach aus der Kardialia des Magens stammen und es im Verlauf zu einer Migration der Zellen Richtung Speiseröhre kommt. Hier könnte der kardiale Stammzellmarker Lgr5 in Zukunft eine wichtige Rolle spielen. Neben Lgr5 wurden u.a. auch TFF2, ein Protein, welches eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Mukosaschäden einnimmt, und Dcl1, ein gastrointestinaler Stammzellmarker, in der Speiseröhre in erhöhter Konzentration nachgewiesen.(97) Physiologischerweise kommen beide jedoch nur im Bereich der kardialen Magennukosa und nicht im ösophagealen Plattenepithel vor. Des Weiteren wurde in dem Mausmodell von Quante et al. die Rolle von Notch untersucht.(97) Notch ist essentiell für die Regulation der Differenzierung in absorptive (Enterozyten) bzw. sekretorische Zellen (Becherzellen, enteroendokrine Zellen, Paneth-Zellen). Dabei dient DLL1 als Ligand am Notch-Rezeptor. In der Kardialia fanden sich Zellen mit DLL1-Expression in unmittelbarer Nachbarschaft zu Lgr5-positiven Zellen. Dabei scheint es so zu sein, dass sich die intestinale Metaplasie vor allem bei geringer Notch-Aktivität bildet, CLE und Progress zur Dysplasie jedoch vor allem bei hoher Notch-Aktivität vorkommen. Es zeigte sich außerdem, dass der Barrett-Ösophagus örtlich immer in nahem Bezug zur SCJ entsteht. Durch diese Erkenntnisse sollten daher auch pathologische Konditionen wie die Carditis in Zukunft als möglicher Faktor in die Pathogenese des BE mit einbezogen und intensiv kontrolliert werden. Es muss dennoch erwähnt werden, dass diesem L2-IL-1 β -Mausmodell durch die anatomischen Unterschiede zum Menschen deutliche Grenzen gesetzt sind und die erwähnten Ergebnisse trotz alledem kritisch zu hinterfragen sind. Insgesamt lässt sich jedoch sagen, dass nach aktuellem Forschungsstand viele verschiedene Signalwege an der Entstehung eines BE beteiligt sind.(32) Wie diese genau zusammenhängen, ist allerdings noch nicht vollständig geklärt und es bleibt die große Herausforderung, die Entstehung des BE auf molekulargenetischer Ebene vollständig zu entschlüsseln.

1.4 Pathogenese des EAC

Die Entstehung Barrett-Karzinoms folgt wie oben beschrieben nach bisherigen Erkenntnissen einer Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz. Die Geschichte des Barrett-Ösophagus und die einzelnen Stufen der Progression zum EAC werden im Folgenden näher erläutert.

1.4.1 Geschichte des Barrett-Ösophagus

Der BE ist benannt nach dem australischen Chirurgen Norman Rupert Barrett (*1903 in Adelaide, †1979 in London). Er gilt bis heute als Pionier der Thoraxchirurgie sowie renommierter Autor und Lehrer.(72) 1950 beschrieb er den Ösophagus als den Teil der Speiseröhre, der sich distal des Ringknorpels befindet und von Plattenepithel ausgekleidet ist.(11) Distal in der Speiseröhre gelegene, von Zylinderepithel umgebene Ulzerationen ordnete er daher auch dem Magen zu, bei einem seiner Ansicht nach angeboren zu kurzem Ösophagus.(11) Dabei erkannte der Pathologe Tileston bereits 1906 in einer Abhandlung über Ulzerationen im Bereich der Speiseröhre, dass dieser mit Zylinderepithel ausgekleidete Teil dem Ösophagus, und nicht dem Magen zuzuordnen war. Er stellte damals bereits ebenso die Theorie auf, dass eine Insuffizienz der Kardia einen gastroösophagealen Reflux zur Folge hat.(135) 1953 widersprachen Allison und Johnstone ebenfalls der Annahme Barretts, dass es sich bei dem intrathorakal gelegenen, mit Zylinderepithel ausgekleideten Organabschnitt um Magen handelt.(4) Als Begründung führten sie u. a. das Fehlen eines peritonealen Überzuges an, was für den Magen, nicht aber die Speiseröhre typisch ist.(4) Zu dieser Zeit kam auch erstmals der Begriff „Barrett’s ulcer“ auf, heute „Barrett’s esophagus“. Barrett erkannte die Theorie, dass es sich bei den Läsionen um metaplastische Ösophagusschleimhaut und nicht um Magen handelt, 1957 schließlich an.(72) Auf diesem Gebiet kam es im Verlauf durch stetige Forschung zu immer neuen Erkenntnissen. Bereits Anfang der 1950er Jahre wurde man erstmals auf Becherzellen in dem betroffenen Areal aufmerksam.(18) 1976 brachte Paull mit der Beschreibung verschiedener Epitheltypen etwas Klarheit in die Situation.(93) Er beschrieb damals drei verschiedene Epithelien: Zunächst das direkt dem Plattenepithel des Ösophagus angrenzende intestinale Epithel im Sinne einer spezialisierten intestinalen Metaplasie mit Becherzellen. Daran anschließend beschrieb er das Kardia-typische, so genannte junktionale Epithel mit schleimproduzierenden Zellen. Distal davon schließt sich laut Paull die Corpus-typische

Mukosa (gastric fundic-type) mit Parietal- und Hauptzellen an. Diese Klassifikation der Epithelien hat bis heute Bestand. In den folgenden Jahren wurde der BE mit dem Vorhandensein einer Hiatushernie in Verbindung gebracht(20; 85) und auch das maligne Potential im Sinne einer Entartung zum EAC erkannt.(53; 49) Dennoch dauerte es sehr lange, bis man sich nach zahlreichen diagnostischen Schwierigkeiten schließlich auf die aktuell gültigen, dennoch nicht unumstrittenen Diagnosekriterien des BE einigte.(140) Dafür müssen in Deutschland bis heute die histologischen Kriterien der spezialisierten intestinalen Metaplasie mit Becherzellen erfüllt sein, unabhängig von der Länge des BE und der Symptomausprägung des Patienten.(33; 140) Allerdings bleibt es aufgrund neuer Forschungsergebnisse und Studien abzuwarten, ob es langfristig bei dieser Definition des Barrett-Ösophagus bleiben wird. Näheres hierzu wird auch weiter unten im Text (vgl. Diskussion) behandelt.

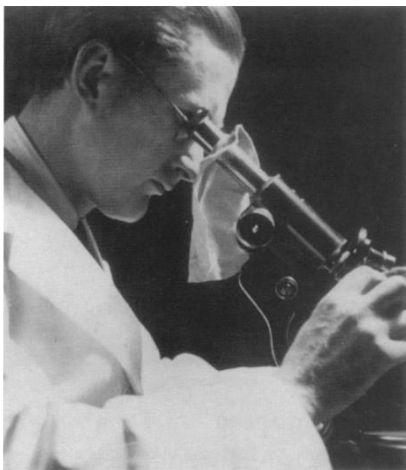


Abbildung 5/6: Norman Rupert Barrett (1903–1979) (72)

1.4.2 Gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD)

Die gastroösophageale Refluxkrankheit (gastroesophageal reflux disease, GERD) ist eine Folge von Rückfluss von saurem Duodenal- bzw. Mageninhalt in die Speiseröhre. Dieser Reflux geht definitionsgemäß mit Symptomen einher und beeinträchtigt den Patienten in seiner Lebensqualität.(64) Endoskopisch sind jedoch nur in 30% der Fälle entsprechende Erosionen zu sehen.(113) Dies wird auch als erosive reflux disease (ERD) bezeichnet. Die häufigere Manifestationsform ist hingegen die nicht erosive Refluxkrankheit (NERD) ohne endoskopisch sichtbare Läsionen.(16) Als

Hauptursache des Reflux gilt vor allem eine Insuffizienz des unteren Ösophagussphinkters mit Rückfluss von aggressivem Refluat in die Speiseröhre, aber zum Beispiel auch hormonelle Veränderungen, ein erhöhter intraabdomineller Druck (z.B. im Rahmen einer Adipositas oder Schwangerschaft) sowie eine verzögerte Magenentleerung.(56) Daraus ergeben sich unter anderem Symptome wie Sodbrennen (vor allem im Liegen sowie nach Mahlzeiten), Schluckbeschwerden, Druckgefühl hinter dem Sternum, Luftaufstoßen sowie Regurgitation von Speisen. Zu den extraösophagealen Manifestationen zählen des Weiteren auch Husten, Heiserkeit und nichtkardialer Thoraxschmerz.(16) Bei Vorliegen einer gastroösophagealen Refluxkrankheit kann es im Verlauf zur Ausbildung eines Barrett-Ösophagus kommen, wobei hier die Zahlen zur Prävalenz mit 1,5-13,2% deutlich variieren.(45) Die Diagnosesicherung erfolgt mittels Endoskopie (z.B. anhand der Los-Angeles-Klassifikation) und histologischer Analyse von Biopsien.(56)

1.4.2.1 Histologie GERD

Durch den chronischen Reflux ergibt sich eine Entzündungsreaktion. Typischerweise stellt sich diese im Sinne einer erhöhten Regenerationsaktivität durch Verbreiterung der Basalzellagen, verlängerte Stromapapillen sowie erweiterte Interzellularräume dar. Zudem kommt es zur Infiltration von Entzündungszellen. Metaplastische oder dysplastische Areale kommen nicht zur Darstellung.

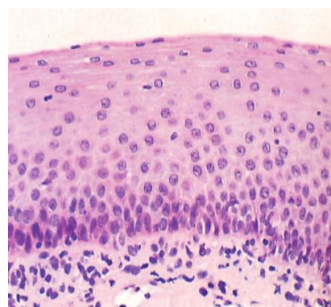


Abbildung 7: histologisches Bild einer GERD (mit freundlicher Genehmigung Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar)

1.4.3 Barrett-Ösophagus (BE)

Der Barrett-Ösophagus (Barrett's esophagus, BE) ist in Deutschland und weiten Teilen Amerikas definiert als endoskopisch sichtbare, metaplastische Umwandlung von Plattenepithel der Speiseröhre in hochprismatisches Zylinderepithel. Zusätzlich dazu ist der mikroskopische Nachweis von spezialisierter intestinaler Metaplasie mit Becherzellen notwendig.(140) In anderen Ländern wie z. B. Großbritannien und Japan ist der makroskopisch sichtbare Befund einer Zylinderepithelmetaplasie (CLE, columnar lined epithelium) ausreichend.(132) Die Vermutung dabei ist, dass auch ein metaplastisch verändertes Zylinderepithel (CLE) als EAC maligne entarten kann und die Becherzellmetaplasie dementsprechend nicht als alleinige Vorläuferläsion des EAC anzusehen ist. Aufgrund der aktuell noch unzureichenden Datenlage zur Progression bei anderen Epitheltypen wurde die bisherige Definition in Deutschland und Amerika jedoch bislang beibehalten und nur bei Vorliegen einer spezialisierten intestinalen Metaplasie mit Becherzellen eine endoskopische Überwachung empfohlen.(127) Reflux von Magen- und Gallensäuren birgt insgesamt das größte Risiko für die Entwicklung eines Barrett-Ösophagus. Als weitere Risikofaktoren sind u.a. männliches Geschlecht, erhöhtes Lebensalter (> 50 Jahre), weiße Rasse, Adipositas, das Vorliegen einer Hiatushernie sowie auch Rauchen zu nennen.(126; 119) Als protektive Faktoren gilt die Einnahme von ASS/NSAIDs, zudem existiert eine inverse Beziehung zwischen dem Vorliegen einer Helicobacter-pylori-Infektion und dem Vorliegen eines dysplastischen BE.(45) Symptome können sich z.B. im Sinne einer gastroösophagealen Refluxkrankheit mit ggf. Ulzerationen und Strikturen darstellen. Eine genaue Aussage zur Prävalenz des BE ist jedoch schwierig, da viele Patienten asymptomatisch sind und zudem eine Endoskopie mit Probeentnahme für die Diagnosestellung erforderlich ist. Nach verschiedenen Studien werden unterschiedliche Angaben zur Prävalenz des BE gemacht. Dabei liegen die Zahlen in der Gesamtbevölkerung bei 1,6-6,8% sowie 2,3-13,2% bei Patienten mit gastroösophagealer Refluxkrankheit.(45) Der BE wiederum ist der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung eines EAC im Sinne einer Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz. Mit der Diagnose eines BE steigt das Risiko für die Entwicklung eines EAC um das 30-60fache an.(45) Allerdings liegt das jährliche Entartungsrisiko trotzdem nur zwischen 0,5 und 1,3%.(45) Dementsprechend entwickeln nur wenige der Patienten mit BE wirklich ein EAC, wobei die Prognose des EAC jedoch sehr schlecht ist. Man unterscheidet einen Short-Segment-BE mit <3 cm Länge von einem Long-Segment-BE mit einer Länge von >3 cm. Laut Studien steigt die Gefahr der malignen Progression mit der Längenausdehnung des BE,(142) wobei auch dies kontrovers

diskutiert wird. Da beim BE insgesamt ein erhöhtes Karzinomrisiko besteht, sind regelmäßige Kontrollendoskopien indiziert. Die endoskopische Einteilung des BE erfolgt hierbei nach der Prag-Klassifikation mit Beurteilung der maximalen zirkumferentiellen Ausdehnung (C) sowie der maximalen Längenausdehnung (M).(56)

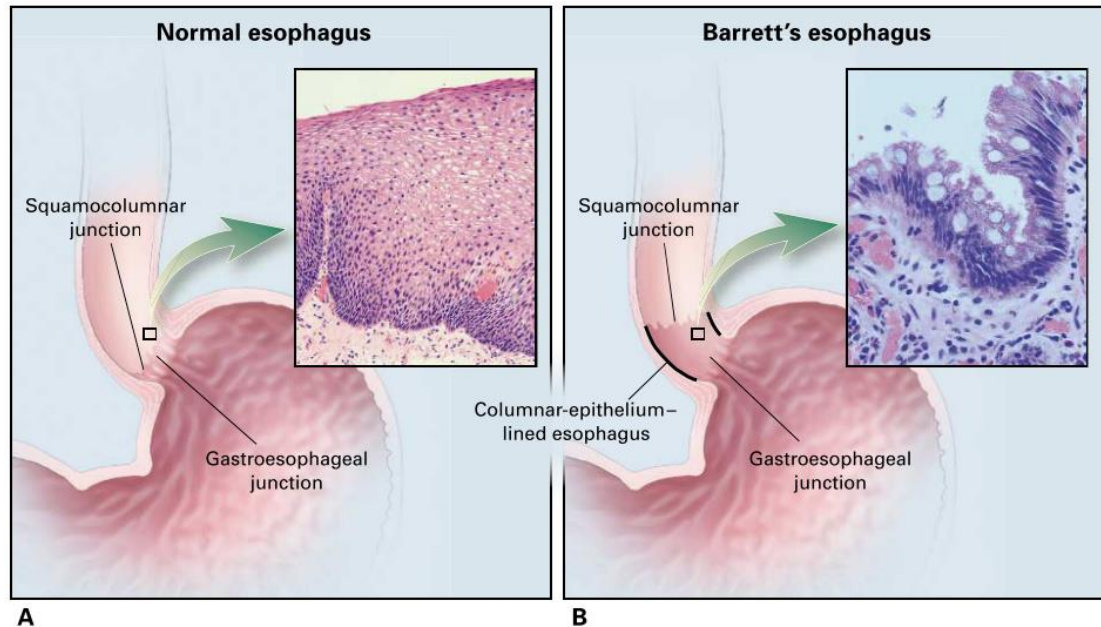


Abbildung 8: Orientierung anhand endoskopischer Leitstrukturen zur Unterscheidung zwischen dem originären Ösophagus (A) und einem Barrett-Ösophagus (B). Dabei markiert die Z-Linie (squamocolumnar junction, SCJ) den Übergang zwischen plattenepitheliales Epithel (A) und Zylinderepithel bzw. Barrett-Metaplasie (B). Der gastroösophageale Übergang hingegen ist nur eine imaginäre Linie, welche den Übergang zwischen Ösophagus und Magen darstellt (endoskopisch dargestellt als proximale Grenze der typischen Magenfalten). Im normalen Ösophagus stimmen Z-Linie und gastroösophagealer Übergang oft überein (A), beim Barrett-Ösophagus befindet sich die Z-Linie proximal des gastroösophagealen Übergangs (B).(125)

1.4.3.1 Histologie Barrett-Ösophagus

Für die Diagnose eines Barrett-Ösophagus ist das Vorhandensein einer intestinalen Metaplasie mit Becherzellen obligat. Zur Darstellung kommt eine flach aufgebaute Schleimhaut mit metaplastischem Zylinderepithel und reichlich Becherzellen. Die Ausreifung zur Oberfläche ist dabei erhalten. Angrenzend können sich intakte plattenepitheliale Anteile darstellen.(145)

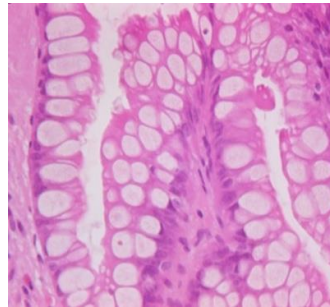


Abbildung 9: histologisches Bild eines BE (mit freundlicher Genehmigung Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar)

1.4.4 Indefinite for dysplasia (IND)

Indefinite for dysplasia (IND) bezeichnet ein histologisches Bild, das weder eindeutig als BE, noch als IgIEN gewertet werden kann. Dies trifft zum Beispiel zu, wenn das Gewebe dysplastisch aussieht, allerdings eine starke begleitende Inflammation, ein Granulationsgewebe oder eine benachbarte Ulzeration vorliegt, wodurch die sichere Diagnosestellung deutlich erschwert wird.(123) In einer Studie aus dem Jahre 2011 zufolge wurde der Begriff IND hingegen für Fälle verwendet, in denen die Krypten zwar Zeichen einer Dysplasie zeigen, aber kein zugehöriges Oberflächenepithel vorhanden oder dieses anderweitig nicht beurteilbar war.(153) Dabei zeigte sich, dass Patienten ohne Dysplasie und Patienten mit der Diagnose einer IND ein gleichwertiges Progressionsrisiko zu einer hgIEN oder einem EAC hatten. Trat die IND allerdings multifokal auf, entsprach das Risiko etwa dem einer IgIEN, welches gegenüber dem des normalen BE bzw. IND signifikant erhöht ist.(153) Zudem können technische Mängel ursächlich für die Einstufung als IND sein. Bisher existieren jedoch keine gültigen Leitlinien für die exakte Diagnose und das weitere klinische Vorgehen

bei Vorliegen einer IND, obwohl dies wegen des erhöhten Risikos vor allem bei multiplen Läsionen von dringender Notwendigkeit wäre. Empfohlen wird lediglich die Ausschöpfung der antiinflammatorischen Therapie sowie Durchführung einer Kontroll-Endoskopie mit erneuter Probeentnahme in 3-6 Monaten.(86)

1.4.4.1 Histologie indefinite for dysplasia

Typischerweise zeigen sich Zellveränderungen, welche für die Einstufung als negativer Befund zu ausgeprägt sind, jedoch werden die Diagnosekriterien einer Dysplasie nicht ausreichend erfüllt. Oftmals zeigt sich eine ausgeprägte begleitende Entzündungsreaktion oder Artefakte.

1.4.5 Geringgradige intraepitheliale Neoplasie (IglEN)

Das Vorhandensein einer IglEN birgt die Gefahr einer Progression zu einer hglEN oder einem EAC. Die Zahlen hierzu variieren aber deutlich. So ergaben Studien jährliche Inzidenzen zwischen 1% bis 13,4%.(27; 28) Bei Patienten mit IglEN kann es allerdings deutlich schneller (2,75 Jahre) zur Bildung einer hglEN bzw. eines EAC kommen als bei Patienten ohne IglEN (9,88 Jahre).(31) Doch die Diagnose „IglEN“ bringt viel diagnostische Unsicherheit mit sich. So wurde in einer Studie gezeigt, dass nach der Zweitbegutachtung der Proben durch einen auf diesem Gebiet spezialisierten Pathologen 85% der Fälle auf einen nicht dysplastischen BE bzw. Indefinite for dysplasia zurückgestuft wurden und bei nur 15% der Patienten die initiale Diagnose einer IglEN beibehalten wurde.(27; 97; 126) Insgesamt lässt sich also sagen, dass das Stadium der IglEN generell eher überdiagnostiziert wird. Die Zweitmeinung durch einen erfahrenen Pathologen könnte die hohe Fehlerquote drastisch senken.(27)

1.4.5.1 Histologie IglEN

Mikroskopisch zeigt sich eine verschobene Kern-Plasma-Relation sowie stäbchenförmige, hyperchromatische Zellkerne. Dabei sind Kryptenarchitektur und Zellpolarität weitgehend erhalten. Die Abgrenzung gegenüber entzündlichen Veränderungen

gelingt meist durch die fehlende Epithelausreifung nach luminal. Zudem zeigt sich im Gegensatz zum Regenerationsgewebe bei neoplastischen Veränderungen in der Regel ein abrupter Übergang zum nicht-neoplastischen Epithel.(145)

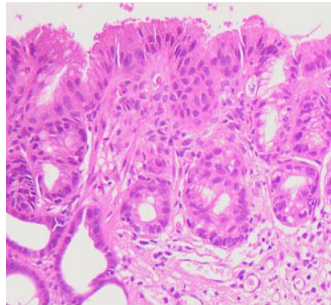


Abbildung 10: histologisches Bild einer IgIEN (mit freundlicher Genehmigung Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar)

1.4.6 Hochgradige intraepitheliale Neoplasie (hgIEN)

Die hgIEN kann sich aus einer IgIEN entwickeln und stellt die unmittelbare Vorstufe des Adenokarzinoms dar. In einer groß angelegten dänischen Studie wurde die Diagnose einer hgIEN bei 0,7% der BE-Patienten innerhalb des ersten Jahres nach der Indexendoskopie gestellt. In den darauffolgenden neun Jahren war dies bei 1,1% der Fälle.(61) Die Progressionsrate vom BE zur hgIEN ist dementsprechend relativ gering. Das jährliche Risiko der Progression der hgIEN zum EAC liegt hingegen bei etwa 6%.(127) Die Diagnose der hgIEN ist allerdings kritisch zu hinterfragen, da eine hgIEN primär oft nur schwer von einem Adenokarzinom abzugrenzen ist. Bei der Resektion einer hgIEN findet sich bei der histologischen Aufarbeitung in bis zu 40% der Fälle bereits ein unterdiagnostiziertes Adenokarzinom.(54) Nach Meinung einiger Experten handelt es sich bei den meisten Diagnosen der hgIEN schon um gut differenzierte tubuläre Adenokarzinome.(131) Der Befund der hgIEN sollte immer von einem weiteren, auf diesem Gebiet sehr erfahrenen Pathologen bestätigt werden. Anhand des pathologischen Konsensus kann dann das weitere therapeutische Vorgehen festgelegt werden.

1.4.6.1 Histologie hgIEN

Mit Fortschreiten des Dysplasiegrades zeigt sich auch eine zunehmende Architektur- störung der Krypten mit vermehrten Ausknospungen und Verzweigungen. Die hgIEN geht meist mit vermehrten Mitosen und Verlust der Zellpolarität einher. Zudem zeigt sich eine verschobene Kern-Plasma-Relation sowie eine ausgeprägte Hyperchromasie der Zellkerne. Becherzellen lassen sich in der Regel nicht mehr nachweisen.(145)

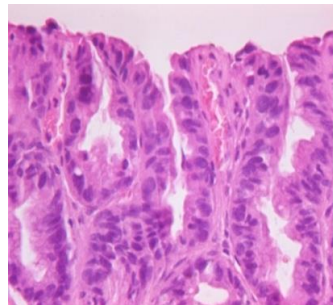


Abbildung 11: histologisches Bild einer hgIEN (mit freundlicher Genehmigung Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar)

1.4.7 Adenokarzinom des Ösophagus (EAC)

Die Einteilung der Adenokarzinome des ösophagogastralen Übergangs (AEG) erfolgt nach der Siewert-Klassifikation.(37) Als AEG I gilt das Adenokarzinom des distalen Ösophagus (5-1cm oberhalb der Z-Linie). Synonym dafür wird der Begriff Barrett-Karzinom oder EAC (esophageal adenocarcinoma) verwendet. Das AEG II oder Kardial-Karzinom liegt bei 1cm oberhalb bis 2cm unterhalb der Z-Linie und das AEG III wird bereits dem Magen zugeordnet (2-5cm unterhalb der Z-Linie). In dieser Arbeit wird ausschließlich Bezug auf das AEG I genommen. Als wichtigster Risikofaktor dafür gilt wie oben bereits erwähnt der Barrett-Ösophagus. Die Angaben zur Progression vom BE zum EAC variieren jedoch deutlich von 0,5 bis 1,3% pro Jahr.(154) Einer Studie aus dem Jahr 2011 nach liegt das absolute jährliche Risiko sogar nur bei 0,12%.(61) Insgesamt ist das Risiko der Progression also relativ gering. Allerdings steigt die Zahl der Neuerkrankungen seit den 1970er Jahren drastisch an. In der westlichen Welt liegt die Inzidenz des EAC seit einigen Jahren deutlich über

denen des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus (SCC, squamous cell carcinoma), und das trotz immer besserer medikamentöser und endoskopischer Therapien.(40) Die genauen Mechanismen und Ursachen hierfür sind jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Auffällig ist hierbei, dass das EAC parallel zur Adipositas zugenommen hat, welche auch zu den Risikofaktoren für die Entwicklung eines EAC zählt.(40) Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Vorliegen eines EAC ist mit 18% sehr schlecht.(74) Grund dafür ist unter anderem, dass Patienten mit EAC in der Regel erst in fortgeschrittenem Tumorstadium Symptome zeigen. Hierzu gehören u.a. Dysphagie und seltener auch Tumoranämie oder Anämie durch Blutungen bei Ulzerationen sowie Verlust von Gewicht oder Appetit. Die Diagnose des EAC wird dabei mittels Endoskopie und histologischer Sicherung des Befundes gestellt. Ein weiteres Staging erfolgt dann mittels Computertomographie und Endosonographie im Sinne der TNM-Klassifikation. Anhand des vorliegenden Tumorstadiums kann dann das entsprechende weitere Therapieprocedere eingeleitet werden.

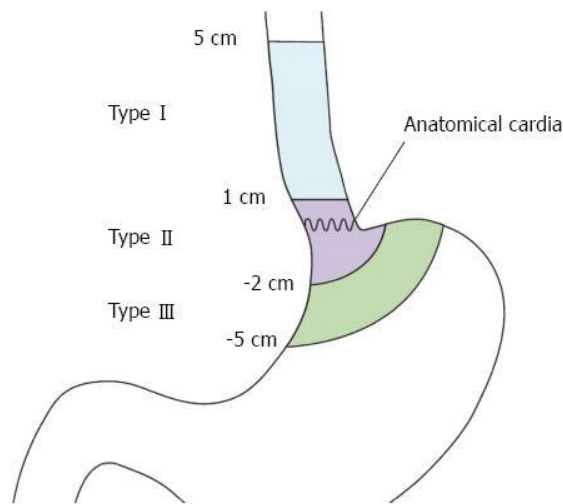


Abbildung 12: Klassifikation der Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs nach Siewert (AEG I-III) (75)

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Lamina propria, Muscularis mucosae oder Submukosa
T1a	Tumor infiltriert Lamina propria, Muscularis mucosae
T1b	Tumor infiltriert Submukos
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Adventitia
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen
T4a	Tumor infiltriert Pleura, Perikard, Zwerchfell
T4b	Tumor infiltriert andere Nachbarstrukturen wie Aorta, Wirbelkörper oder Trachea
N – Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-2 Lymphknoten
N2	Metastasen in 3-6 Lymphknoten
N3	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
M – Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
pTNM: pathologische Klassifikation (Die pT- und pN-Kategorien entsprechen den T- und N-Kategorien)	
pM1	Fernmetastasen
pN0	Regionäre Lymphadenektomie und histologische Untersuchung üblicherweise von 7 oder mehr Lymphknoten
Anmerkung: pM0 und pMX sind keine anwendbaren Kategorien	

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Ösophagus-Karzinoms (modifiziert nach Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Ösophaguskarzinom (Kurzversion), September 2015) (95)

1.4.7.1 Histologie EAC

Beim EAC ist die Kryptenarchitektur kaum noch erhalten. Es zeigen sich vielfältige Verzweigungen mit vermehrten Kalibersprüngen. Zudem kommen dissoziierende neoplastische Zellen zur Darstellung. Beweisend für das Vorliegen eines EAC ist die Infiltration des Tumors in die Muscularis mucosae sowie Einbrechen in Lymph- bzw. Blutgefäße.(145)

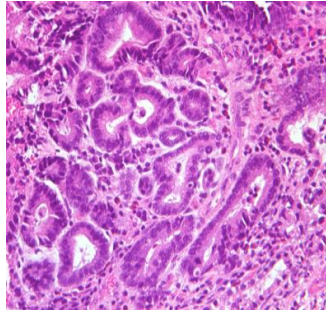


Abbildung 13: histologisches Bild eines EAC (mit freundlicher Genehmigung Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar)

1.5 Surveillance des Barrett-Ösophagus

Der Barrett-Ösophagus ist wie bereits beschrieben eine sehr häufige Erkrankung in der westlichen Welt mit steigender Inzidenz. Der BE gilt als Präkanzerose, auch wenn es nur sehr selten zur Entwicklung eines EAC kommt. Da das EAC meist jedoch erst spät symptomatisch wird und dementsprechend mit einer schlechten Prognose einhergeht, ist eine frühe Detektion essentiell. Die aktuell einzige klinisch etablierte Methode hierfür ist die der regelmäßigen Endoskopien von Patienten mit BE, die sogenannten Surveillance-Endoskopien.⁽¹⁴⁰⁾ Hier werden jeweils mehrere Biopsien aus suspekten Arealen entnommen, histologisch evaluiert und anhand der Diagnose ein Therapiekonzept entwickelt. Die zeitliche Abfolge dieser Endoskopien sollte einem definierten Schema folgen, z. B. anhand der Guidelines 2008 for the Diagnosis, Surveillance and Therapy of Barrett's Esophagus des American College of Gastroenterology.⁽¹⁴⁰⁾ Demnach sollen Patienten mit Symptomen oder Verdacht auf BE zunächst eine Indexendoskopie mit Probeentnahmen erhalten. Nach einer weiteren Kontrolle innerhalb eines Jahres ohne Dysplasie-Nachweis sollen weitere Endoskopien alle drei Jahre erfolgen. Findet sich jedoch eine IgIEN, wird eine Re-Evaluation in sechs Monaten und anschließend so lange jährliche Kontroll-Endoskopien empfohlen, bis zwei negativen Untersuchungen, d. h. ohne Dysplasie-Nachweis, vorliegen. Wurde der Befund einer IgIEN von einem anderen Pathologen, der Experte auf diesem Gebiet ist, bestätigt, kann nach Abwägung der Befunde bereits eine endoskopische Ablation oder Resektion erfolgen. Bei Detektion einer hgIEN sollte zunächst eine Kontrollendoskopie nach 3 Monaten erfolgen. Wird die Diagnose dabei bestätigt und durch einen zweiten erfahrenen Pathologen unterstützt, sollte möglichst zeitnah eine endoskopische oder chirurgische Therapie eingeleitet werden. Auch nach therapeutischen Maßnahmen sind weiterhin regelmäßige Endoskopien empfohlen, da sich erneut eine Barrett-Mukosa bilden kann. Genauere Angaben hierzu liegen allerdings aufgrund mangelnder Datenlage nicht vor. Empfehlungen anderer Organisationen zur Surveillance des Barrett-Ösophagus folgen einem ähnlichen zeitlichen Ablauf wie bei dem oben genannten Schema. Die Probeentnahme sollte grundsätzlich in allen vier Quadranten im Abstand von 2 cm erfolgen. Liegt jedoch eine Dysplasie vor, sollte der Abstand nur 1 cm betragen, wobei zusätzliche Biopsien aus verdächtigen Arealen die Diagnosesicherheit deutlich erhöhen.⁽¹⁰⁴⁾ Es sollten mindestens 8 Biopsien entnommen werden, um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen.⁽⁵²⁾ Vor allem bei Verdacht auf Dysplasie sollten die Proben getrennt zur histologischen Untersuchung eingeschickt werden,

um eine genauere Lokalisation der Dysplasie zu ermöglichen. Die Detektion neoplastischer Areale wird heutzutage durch moderne Techniken unterstützt, die ein besseres „Sichtbarmachen“ dieser Bereiche erlauben.(43) Dies kann zum Beispiel durch Einsatz der Chromoendoskopie in Kombination mit Vergrößerungsendoskopie erreicht werden. Dazu gehören Färbetechniken, z. B. mit Methylenblau oder Essigsäure. Eine weitere Möglichkeit bietet das Narrow Band Imaging, wobei hier gefiltertes Licht auf die Schleimhaut trifft und je nach deren Beschaffenheit resorbiert wird. Mittels der Lugolschen Lösung werden glykogenreiche Areale in intakter Mukosa im Gegensatz zu verändertem Gewebe braun dargestellt. Die Auto-fluoreszenzdiagnostik wird in der klinischen Diagnostik derzeit noch nicht eingesetzt, könnte aber in Zukunft an Relevanz gewinnen.(43)

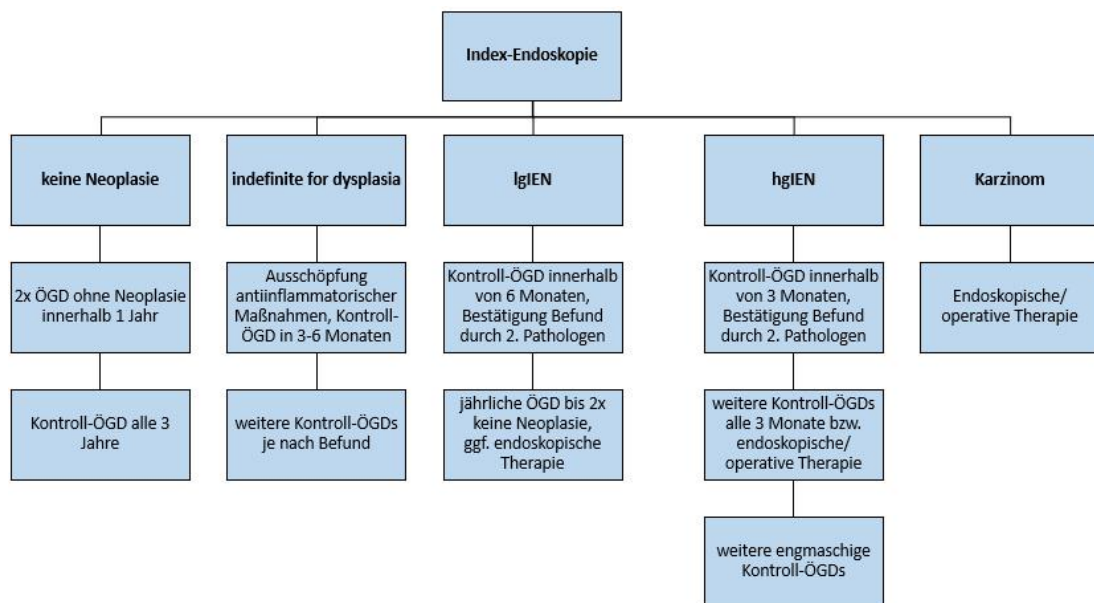


Abbildung 14: Modell der Surveillance-Endoskopien (modifiziert nach „Updated guidelines 2008 for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus”)(140)

1.5.1 Problematik der Surveillance

Die Methode der Surveillance-Endoskopien ist jedoch nur bedingt zufriedenstellend. Zum einen ist das Diagnoseverfahren mittels Endoskopie und Histologie sehr fehleranfällig. Bei der Endoskopie muss zunächst das suspektere Areal als solches erkannt werden, was maßgeblich von der Expertise des Untersuchers abhängig ist. Die Entnahme repräsentativer Proben aus diesem Bereich wird zudem durch die Beweglichkeit der Speiseröhre deutlich erschwert. Auch die genaue Identifizierung des gastroösophagealen Übergangs stellt durch länderabhängig unterschiedliche Definitionen, bei Vorhandensein einer Entzündung in der Speiseröhre oder Verschiebung durch Luftinsufflation oftmals ein Problem dar. Gelangen die Proben zur histologischen Untersuchung, werden diese nach erfolgreicher Bearbeitung von einem erfahrenen Pathologen untersucht. Dieses Verfahren ist allerdings nur schwer objektivierbar und die Intra- sowie Interobserver-Varianz liegt hierbei sehr hoch. Dieser Effekt kann jedoch durch die Zweitmeinung eines erfahrenen Pathologen deutlich reduziert werden.(124; 27) Die Surveillance-Endoskopien sind insgesamt sehr aufwendig und kostspielig, ganz abgesehen von der physischen und psychischen Belastung des Patienten. Der BE hat allerdings eine nur sehr geringe Progressrate zum EAC, welche vor einigen Jahren noch als deutlich höher eingeschätzt wurde. Nach einer großen Studie über die Jahre 1992 bis 2009 liegt das absolute jährliche Risiko dafür bei nur rund 0,12%(61) (im Vergleich zu vorher geschätzten 0,5%),(118) was etwa einem Fall in 860 Patientenjahren entspricht. Die Zahl der Patienten mit Sodbrennen oder Barrett-Ösophagus steigt zwar stetig an, trotz dieser hohen Zahlen können jedoch nur sehr wenige Fälle mit EAC mittels Endoskopie detektiert werden. Es gilt außerdem als erwiesen, dass etwa 40% der Patienten mit EAC bei Diagnosestellung gar keine Symptome von Sodbrennen zeigen.(70) Die Identifikation von Risikopatienten stellt also insgesamt eine große Herausforderung dar. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund essentiell, dass das EAC u. a. aufgrund erst spät einsetzender Symptome bei Erstdiagnose oft schon weit fortgeschritten ist und die 5-Jahre-Überlebensrate mit 18% sehr gering ist.(74) Zudem gibt es in Bezug auf die Surveillance-Endoskopien bislang noch keine verlässlichen Studien bezüglich der Aussage zur Kosteneffektivität oder Senkung der Mortalität. Angesichts dieser Schwierigkeiten bei der Diagnose und Verlaufskontrolle durch alleinige Endoskopie und Histologiegewinnung müssen in Zukunft weitere diagnostische Verfahren entwickelt werden.

1.6 Therapie

1.6.1 Therapie GERD

Therapie der Wahl bei Patienten mit GERD ist die Gabe von Säureblockern wie z.B. Protonenpumpeninhibitoren (PPI).(45) So können über die Verminderung der Säureproduktion der Reflux und damit auch die subjektiven Beschwerden reduziert werden. Zudem kann durch Änderung der Essensgewohnheiten sowie des Lebensstils eine Verbesserung der Beschwerden erzielt werden. Die operative Therapie mittels z.B. Fundoplicatio nach Nissen stellt bei Nichtansprechen der medikamentösen Therapie eine weitere Option dar.(45)

1.6.2 Therapie Barrett-Ösophagus ohne / mit Dysplasie

Die Behandlung des BE erfolgt wie bei der GERD bei mehr als 90% der Patienten symptomatisch durch Säuresuppressoren wie z.B. Protonenpumpeninhibitoren.(90) Allerdings wird die Wirkung der PPI insgesamt kontrovers diskutiert, ein eindeutiger Überlebensvorteil konnte bislang nicht gezeigt werden.(74) Eine endoskopische Therapie ist beim alleinigen BE meist nicht erforderlich. Wurde jedoch die Diagnose einer Neoplasie gestellt und durch einen zweiten Pathologen bestätigt, sollten endoskopische bzw. chirurgische Maßnahmen eingeleitet werden. Bei der endoskopischen Therapie unterscheidet man zunächst zwischen Resektion und Ablation. Erstere beinhaltet die endoskopische Mukosaresektion sowie die Dissektion der Submukosa. Die ablativen Verfahren kann man unterteilen in hitzebedingte Ablation (Radiofrequenzablation RFA), multipolare Elektrokoagulation, Argon-Plasma-Koagulation, photodynamische Ablation sowie Kryotherapie.(45) Dabei ist es üblich, multimodal im Sinne einer Resektion und nachfolgenden Ablation zu therapieren. Handelt es sich um weiter fortgeschrittene Befunde, kommt zudem eine offen chirurgische Therapie in Frage. Das Therapiekonzept sollte dabei stets unter Einbeziehung des Patienten festgelegt werden. Liegt das bestätigte Bild einer IgIEN vor, können weiterhin Kontrollendoskopien im Abstand von 6 Monaten empfohlen werden. Kommt es zu keiner Befundänderung, können ablativ Verfahren angewandt werden. Handelt es sich jedoch um eine hgIEN, sollte dieser Befund zunächst durch erneute Endoskopie nach 3 Monaten verifiziert werden und dann die endoskopische

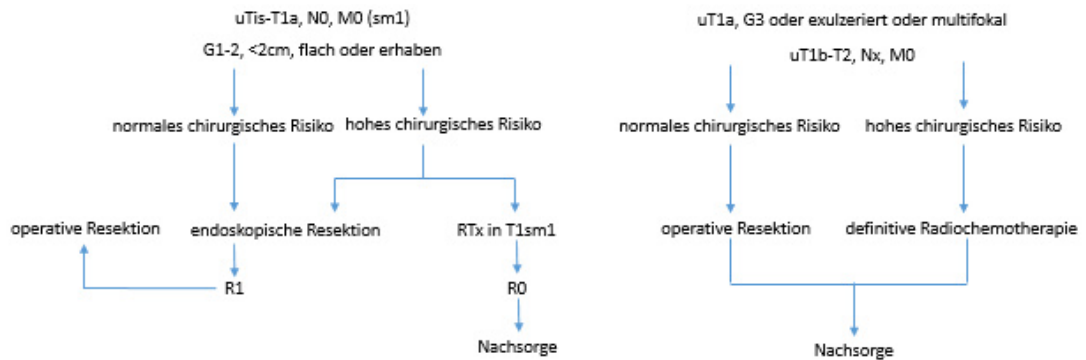
Resektion sichtbarer Läsionen erfolgen. Entscheidend für die weitere Wahl der Therapie ist die Invasionsstiefe der Läsion.(131) Ist der Tumor auf die Mukosa beschränkt, beträgt das Risiko eines Lymphknotenbefalls 1 bis 2%. In diesem Fall ist also die endoskopische Therapie in der Regel ausreichend. Infiltriert der Tumor allerdings bis in die Submukosa, steigt das Risiko der Lymphknotenbeteiligung auf 10% an und ein chirurgisches Vorgehen mit Lymphknotenexstirpation und R0-Situation ist anzustreben.(126)

1.6.3 Therapie EAC

Da das EAC unbehandelt eine sehr schlechte Prognose hat, sollte möglichst zeitnah eine effektive Therapie erfolgen. Patienten in frühen Stadien (Tis, T1a) mit Tumorgröße <2cm und guter bzw. mittelgradiger Differenzierung können meist endoskopisch durch eine endoskopische Mukosaresektion (EMR) oder eine endoskopische Submukosadisektion (ESD) therapiert werden.(47) Bei Patienten mit einem T1b- bzw. T2-Tumor (lokal begrenzt) ohne Hinweis auf lokoregionäre Lymphknotenmetastasen ist in der Regel eine primäre Operation möglich, ohne den Tumor neoadjuvant vorzubehandeln.(47) Ist der Tumor jedoch bereits lokal fortgeschritten (T3/T4) oder besteht endosonographisch ein positiver Nodalstatus, sollte der Patient im Sinne eines multimodalen Ansatzes therapiert werden. Die neoadjuvante Behandlung erfolgt dabei durch eine kombinierte, meist Cisplatin-basierte (Radio-)Chemotherapie.(47) Es konnte gezeigt werden, dass das Gesamtüberleben durch die neoadjuvante Therapie signifikant besser ist.(47) Für die anschließende chirurgische Resektion, welche im Zeitraum von 4-6 Wochen nach Beendigung der neoadjuvanten Therapie erfolgen sollte, gibt es verschiedene Operationstechniken. Die abdominothorakale en-bloc-Resektion des Ösophagus ist dabei Therapie der Wahl.(120) Hierbei wird der distale Ösophagus inklusive der kleinen Kurvatur reseziert und die Passage mittels intrathorakalem Magenhochzug (Ösophagogastrostomie) wieder hergestellt. Bei diesem Zugangsweg ist durch den Zweihöhleneingriff eine ausgedehnte Lymphadenektomie möglich.(120) Dieses Verfahren eignet sich dadurch vor allem für lokal fortgeschrittene Tumorstadien. Eine weitere Möglichkeit stellt die transhiatal erweiterte Ösophagektomie dar. Diese Technik wird beispielsweise bei Kontraindikationen für eine Thorakotomie und kleineren Tumoren ohne Hinweis auf mediastinale Lymphknotenmetastasen angewandt. Bislang ergibt sich

aus Studien allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied auf das prognostische Outcome bezüglich Morbidität und Mortalität.(59) Abhängig von der postoperativen TNM-Klassifikation wird die Fortsetzung der perioperativen Chemotherapie empfohlen. Stellt sich der Tumor bei Diagnosestellung jedoch als lokal nicht resektabel dar oder liegt eine palliative Situation mit metastasiertem Tumorstadium vor, erfolgt die Therapie im Sinne einer definitiven bzw. palliativen Radiochemotherapie. Gleiches gilt für Patienten mit zu hohem operativem Risiko aufgrund von relevanten Nebendiagnosen oder schlechtem Allgemeinzustand. Bei gleichzeitig bestehender Dysphagie sollte grundsätzlich die enterale Ernährung durch z.B. Anlage eines Jejunocath / PEG oder ösophageale Stent-Applikation gesichert werden. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Prognose des EAC maßgeblich von Eindringtiefe des Karzinoms, der Anzahl betroffener Lymphknoten sowie vom Resektionsstatus nach operativer Therapie abhängig ist. Wenn der Tumor bei fortgeschrittenen Stadien aber einmal das zweite Drittel der Submukosa infiltriert hat (pT1sm2), steigt die Zahl befallener Lymphknoten sprunghaft an, wodurch sich die Prognose deutlich verschlechtert.(15) Daraus resultieren auch die schlechten 5-Jahres-Überlebensraten (overall survival rate) lokal fortgeschrittener Tumore von <40% bei multimodalem Therapieansatz und <25% bei alleiniger chirurgischer Therapie.(152) Bei Nachweis von Fernmetastasen bleibt bisher nur die palliative Therapie. Aufgrund der schlechten Prognose von fortgeschrittenen Stadien muss ein EAC möglichst früh entdeckt werden. Durch die etablierten Surveillance-Endoskopien machen T1-Stadien in diesem Patientenkollektiv in manchen Zentren mittlerweile bis zu 50% der Diagnosen aus.(15) Allerdings trifft das wie erwähnt nur für Patienten zu, die bereits durch einen symptomatischen BE aufgefallen und so in das endoskopische Kontrollprogramm aufgenommen worden sind.

A: lokal begrenztes Stadium



B: lokal fortgeschrittenes und metastasiertes Stadium

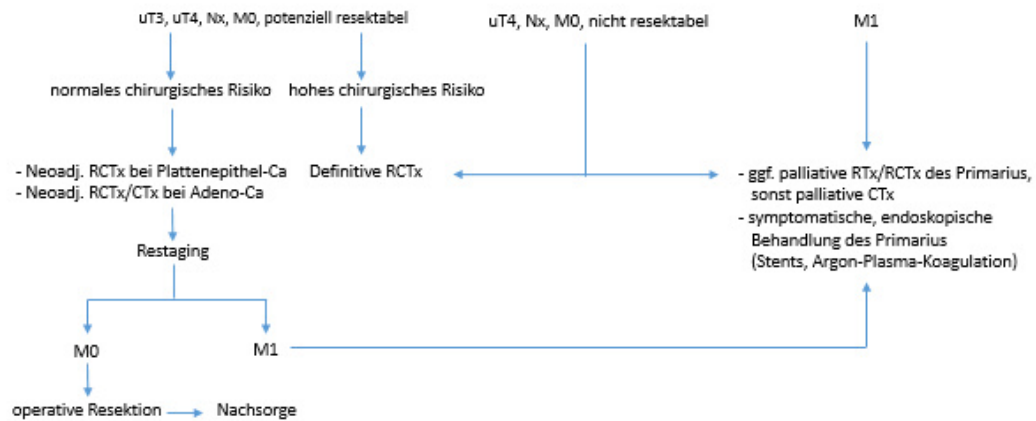


Abbildung 15: Therapie des Ösophaguskarzinoms A) in lokal begrenztem und B) in lokal fortgeschrittenem bzw. metastasiertem Stadium (sm = Submukosa, RCTx = Radiochemotherapie, RTx = Strahlentherapie) (modifiziert nach (47))

1.7 Biomarker zur Risikobestimmung

Die Surveillance-Endoskopien sind ein sehr aufwendiges, kostspieliges und invasives Konzept zur Diagnose und Verlaufskontrolle bei Patienten mit BE, zumal nur bei sehr wenigen Patienten tatsächlich ein Karzinom festgestellt wird. Hier wären Biomarker, über die man eine Aussage bezüglich einer möglichen malignen Progression eines BE machen kann, von großem klinischen Nutzen. Bisher wurden schon zahlreiche molekulare Veränderungen während der Entwicklung zum EAC identifiziert, allerdings sind diese Marker aufgrund mangelnder Studienlage oder großem technischen Aufwand bisher noch nicht im Klinikalltag einsetzbar. Das Ziel von Biomarkern ist, über diese den aktuellen Stand einer Erkrankung zu erfassen und deren Verlauf vorherzusagen. Vor allem die Unterteilung in Patienten mit niedrigem und hohem Krebsrisiko wäre äußerst erstrebenswert. Dabei sollten die Sensitivität sowie Spezifität der Marker möglichst hoch sein, die Marker günstig zu erwerben und technisch leicht anwendbar sein.

1.7.1 Bisherige Biomarker-Konzepte

Bisher wurden sowohl intraepitheliale Metaplasie (IM) als auch Dysplasie als Vorhersagemarker vorgeschlagen, allerdings hat sich bislang keiner der beiden als entsprechend zuverlässig erwiesen. Weitere potentielle Marker wie z.B. Cyclin D1, CDK-Inhibitoren, p16, TP53, NFκB, COX-2, β-Catenin und E-Cadherin oder die Aneuploidie waren im Gespräch, jedoch erlangte bislang keiner von ihnen Einzug in den klinischen Alltag.(140; 86)

1.7.2 Mögliche neue Biomarker-Konzepte

Anhand des o.g. L2-IL-1β-Mausmodells wurden bereits neben der HE/PAS-Färbung vier verschiedene immunhistochemische Marker (Notch-1, Dclk-1, Lgr5, TFF2) getestet.(97) Aufgrund anatomischer und struktureller Unterschiede sind diese Ergebnisse aus dem Mausmodell allerdings nicht direkt auf den Menschen übertragbar, sodass in dieser Arbeit die genannten Biomarker an humanen Biopsie-/EMR-Proben angewandt wurden. Im Folgenden werden die einzelnen Marker näher erläutert.

1.7.2.1 HE/PAS-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, kurz HE-Färbung, ist ein Routinevorgang in der Pathologie. In zwei Schritten wird das zu untersuchende Gewebe mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, wodurch sich eine gute Übersichtsfärbung ergibt. Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff, der alle sauren (basophilen) Strukturen, und damit vor allem die Zellkerne, blau färbt. Eosin hingegen ist ein saurer Farbstoff. Über ihn können alle basischen (eosinophilen) Strukturen besser sichtbar gemacht werden, wodurch hauptsächlich das Zytoplasma gefärbt wird. Die Abkürzung PAS steht für englisch Periodic Acid Schiff Reaction. Die Reaktion mittels Perjodsäure (HIO_4) und Schiff-reagens (fuchsin-schweflige Säure) resultiert in einer purpur-violetten Färbung entsprechender Gewebe. Über diese Färbetechnik werden vor allem Polysaccharide, Glykoproteine und Glykolipide dargestellt. So können glykogenhaltige Strukturen nachgewiesen und insbesondere Kollagene, Basalmembranen und Muzine, dementsprechend auch Becherzellen, dargestellt werden. Diese Färbung ist also essentiell für die Detektion von Becherzellen, worauf bislang in Deutschland die Diagnosestellung des BE beruht.(140)

1.7.2.2 Notch1

Das Gen für den Notch-Rezeptor wurde erstmals 1917 durch Thomas Hunt Morgan entdeckt.(83) Er beobachtete Einkerbungen (engl. „notch“) an den Flügeln von Fruchtfliegen, was er auf eine Mutation dieses Gens zurückführte. Heute ist bekannt, dass der Notch-Signalweg unter anderem die Zell-Zell-Kommunikation benachbarter Zellen ermöglicht, aber auch Einfluss auf Zellproliferation, Zelltod und Zelldifferenzierung hat.(68) Notch spielt also schon in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle, zum Beispiel im Sinne der Zelldifferenzierung bei der Gewebe- und Organentwicklung. Aber auch im Erwachsenenalter kommen ihm wichtige Funktionen zu. Hier ist ebenfalls die Zelldifferenzierung zu nennen (z.B. bei der Differenzierung zu absorptiven Zellen wie Becherzellen) oder die Aufrechterhaltung von Stammzellpopulationen.(136) Bei Fehlfunktion des Notch-Signalweges kann es zu Fehlbildungen (z. B. Fallotsche Tetralogie),(12) Krankheiten (Alzheimer-Krankheit,(17) Multiple Sklerose,(63) T-ALL (akute lymphatische Leukämie)(141)) und Krebsentstehung (u.a. embryonale Gehirntumoren,(34) Gliome,(35) Mamma-Karzinom,(36) Kolon-Karzinom,(121) Zervix-Karzinom(5)) kommen.

Der Notch-Rezeptor ist ein Transmembranprotein mit einer Transmembrandomäne und einem extrazellulären Bereich. Dabei setzt sich die Notch-Familie aus vier Untereinheiten zusammen (Notch1-4).(96) Zur Aktivierung des Signalweges bindet ein ebenfalls membranständiger Notch-Ligand einer Signal sendenden Zelle an den Notch-Rezeptor der Signal empfangenden Zelle. Man unterscheidet Liganden der Delta-/Delta-like- (Dll-1, -3 und -4) und der Serrate-/Jagged-Familie (J-1 und -2)(24). Durch die Bindung des Liganden an den Notch-Rezeptor kommt es zunächst zu einer weiteren Spaltung an der so genannten Heterodimerization Domain (HD). Diese Spaltung erfolgt durch ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease, auch bekannt als TACE (TNF α -converting-enzyme)), wodurch die Transmembrandomäne von der extrazellulären Domäne abgespalten wird und Letztere per Endozytose in die Signal sendende Zelle aufgenommen wird. Durch eine γ -Secretase wird dann das aktive Fragment, die sogenannte NICD (Notch Intracellular Domain) vom transmembranösen Teil abgespalten und kann so in den Zellkern gelangen. Dort bindet sie an den so genannten Transkriptionsfaktor CSL. Durch die weitere Bindung anderer Co-Faktoren entsteht der NTC (Notch Transcriptional Complex) und die Transkription Notch-abhängiger Gene kann beginnen.(24) Dazu gehören zum Beispiel basic-Helix-Loop-Helix-Proteine wie HES-1, welches eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung spielt, oder auch Mediatoren des Zellzyklus wie p21(103) und Cyclin D1(107) sowie Transkriptionsfaktoren der NF κ B-(23) und PPAR-Familie.(42) Der Notch-Signalweg kann auf vielen Ebenen reguliert werden, zum Beispiel durch Rezeptor-Glykosylierung, Ubiquitinylierung oder Einflussnahme auf Enzymaktivität und Transkription.(68) Durch eine konstitutive Aktivierung des Notch-Signalweges kann es also aufgrund der fehlgeleiteten Zelldifferenzierung und –proliferation zur Ausbildung von Neoplasien kommen.

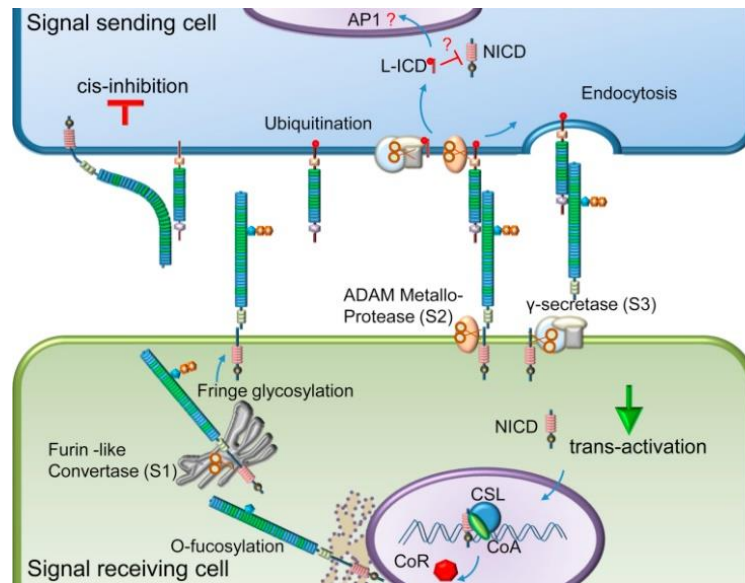


Abbildung 16: Der Notch-Signalweg (24)

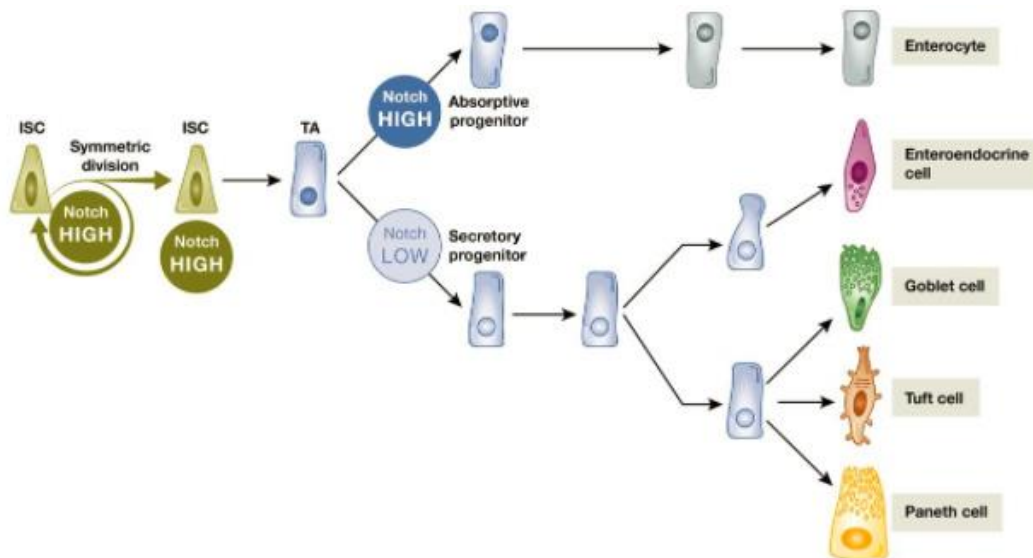


Abbildung 17: Der Notch-Signalweg hat großen Einfluss auf die Proliferation und Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation (ISC = intestinal stem cell). Des Weiteren spielt Notch eine wichtige Rolle bei der Differenzierung intestinaler Stammzellen sowie Progenitorzellen. Steht eine solche Transit amplifying cell (TA cell) unter dem Einfluss einer hohen Notch-Expression, kommt es zur vermehrten Expression der absorptiven Zelllinie (Enterozyten). Ist die Notch-Expression hingegen gering, kommt es zur Differenzierung der sekretorischen Zelllinie (Enteroendokrine Zellen, Becherzellen, Bürstenzellen, Paneth-Zellen).(108)

1.7.2.3 Lgr5

Lgr5 steht für Leucine rich repeat containing G-protein coupled receptor 5, auch bekannt unter dem Namen GPR49 (G-protein coupled receptor 49) bzw. GPR67 (P-protein coupled receptor 67). Lgr5-Proteine gehören zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese sind 7-Transmembran-Rezeptoren mit einer großen extrazellulären Domäne.⁽⁹⁾ In dem extrazellulären Anteil finden sich zahlreiche Wiederholungen der Aminosäure Leucin (leucin-rich-repeats, LRR), an welche Liganden binden können. Die Familie der 7-Transmembran-Rezeptoren kann in drei Gruppen untergliedert werden.⁽⁹⁾ Der Lgr-Rezeptor mit den Untertypen Lgr4, Lgr5 und Lgr6, für welche 18 bzw. 13 Leucin-Repeats typisch sind,⁽¹¹⁵⁾ gehört der Gruppe B an.⁽⁹⁾ Die anderen Gruppen werden gebildet durch LH-, FSH- und TSH-Rezeptoren. Lgr-Proteine sind fakultative Komponenten des Wnt/Frizzled-Rezeptor-Komplexes. Die Wnt-Agonisten vom Typ R-Spondin (Roof plate-specific spondin, RSpO) sind wichtige Liganden für den Lgr/Wnt-Rezeptortyp.⁽²¹⁾ Alle vier bekannten R-Spondine (RSpO1-4) können an Lgr4, Lgr5 und Lgr6 binden und somit die Wnt-Signalkaskade aktivieren.⁽¹¹⁵⁾ Zudem stellt Lgr5 selbst ein Zielgen dieses Signalweges dar. Der Wnt-Signalweg, und damit auch vor allem der Subtyp Lgr5, spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Epithelerneuerung, vor allem in Organen mit großer Teilungstendenz, und bei der Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation.⁽⁹¹⁾ Lgr5 wurde in zahlreichen Versuchen als Stammzellmarker etabliert.^(10; 13; 115) Lgr5-positive Zellen wurde bislang unter anderem im Magen, Dünndarm, Dickdarm und Haarfollikeln sowie auch in der Brustdrüse,⁽¹⁰⁾ und in der Leber nach Gewebeschaden gefunden.⁽⁵⁸⁾ Des Weiteren konnten Lgr5-positive Zellen im Kolon- und Ovarialkarzinom⁽⁷⁹⁾ sowie bei Vorliegen eines Leberkarzinoms nachgewiesen werden.⁽¹⁵¹⁾ Hier spielt vorrangig die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch Mutationen eine Rolle.^(151; 156) Isolierte Lgr5-positive Zellen wurden in entsprechendem Medium und Zusätzen wie R-Spondin1 kulturell angezchtet.⁽¹¹²⁾ Diese vermehrten sich und bildeten Gewebe mit einem zentralen Lumen und Ausknospungen, sodass diese auch als „organoids“ oder „miniguts“ bezeichnet wurden.⁽¹¹⁵⁾ Dieser Versuch zeigt, dass Lgr5-positive Zellen als Stammzellen fungieren können und ihnen im Sinne einer Anzüchtung ex vivo noch große Bedeutung in der regenerativen Medizin zukommen kann. Der Versuch beweist auch die Eignung von Lgr5 als Stammzellmarker, was für die Fragestellung der Ursprungszelle des Barrett-Ösophagus und damit des EAC von großer Bedeutung ist.

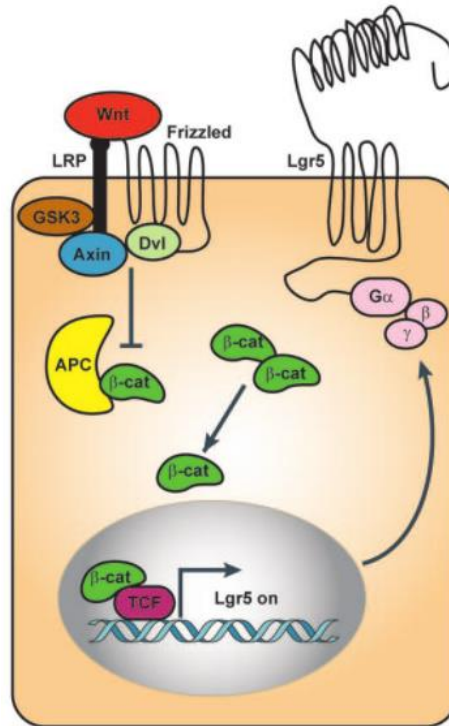


Abbildung 18: Der Wnt-Signalweg in Stammzellen. Liganden binden an den Frizzled/LRP-Rezeptorkomplex und aktivieren so die Signalkaskade. Durch mehrere Zwischenschritte kommt es schließlich zur Aktivierung des Wnt-Zielproteins Lgr5.(48)

1.7.2.4 Dclk1

Dclk1 (doublecortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like 1, Dcamk1) ist eines von 11 Genen der Doublecortin-Familie. Sie besitzen alle eine Tubulin-bindende Domäne und sind unter anderem an der neuronalen Entwicklung beteiligt.(30) Dclk1 hat betreffend des Mikrotubulin-bindenden N-terminalen Endes große Übereinstimmung mit Doublecortin. An der C-terminalen Domäne hingegen codiert Dclk1 für eine Serin-Threonin-Kinase, welche der Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II sehr ähnlich ist.(41) Dclk1 gleicht in seiner Funktion dem Doublecortin und ist bei der Regulation der Zell-Motilität, der axonalen Migration, der Zelldifferenzierung und Regulation des Zellzyklus beteiligt.(41) Dclk1 wurde bisher vor allem im fetalen Gehirn nachgewiesen.(92) In neueren Studien wurde die Funktion von Dclk1 anhand von Mausmodellen genauer untersucht. Verschiedene Forschergruppen kamen dabei zu unterschiedlichen Ergebnissen. So wurde zum einen diskutiert, dass Dclk1 als gastrointestinaler Stammzellmarker fungiert.(44)

Weitere Theorien bestehen darin, dass Dclk1 gastrointestinale Bürstenzellen detektieren kann(109) bzw. als Marker für enteroendokrine Zellen gilt.(117) Neuere Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, dass Dclk1 auch als Marker für Tumorstammzellen in Frage kommt.(89) So wurde Dclk1 bereits im Kolonkarzinom,(128) Pankreaskarzinom(129) und HCV-induziertem hepatozellulären Karzinom (HCC) nachgewiesen.(2) Aufgrund dieser Erkenntnisse könnte ihm in Zukunft eine wichtige therapeutische Rolle zukommen, was aber die zuvor weitere genaue Erforschung von Dclk1 notwendig macht.

1.7.2.5 TFF2

Der Familie der Trefoil-Peptide (TFF, trefoil factor family) gehören die drei Proteine TFF1, TFF2 und TFF3 an. Sie sind alle sehr resistent gegenüber Hitze, Säure und Enzymen.(147) Dies wird unter anderem durch ihre gemeinsame Struktur begünstigt. Durch die Verbindung über Disulphidbrücken entstehen dreibogige Strukturen, die so genannten Trefoil-Domänen, die einem Kleeblatt (= engl. trefoil) ähneln. TFF1 und TFF3 bilden dabei eine und TFF2 zwei solcher Domänen aus.(147) TFF-Proteine sind auf Chromosom 21 codiert und werden vor allem von Schleim-sezernierenden Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts gebildet. So besteht auch ein enger Zusammenhang zwischen der Expression von TFF1 und der MUC6, TFF2 und MUC5AC sowie TFF3 und MUC2.(147) TFF-Proteine wurden am Rand von gastrointestinalen Ulzerationen, so auch dem Barrett-Ösophagus,(51) gastroduodenalen Ulzera(3; 66) oder dem Morbus Crohn(106) nachgewiesen. In der auf einen Mukosa-schaden hin gebildeten so genannten „Ulcer associated cell lineage“ (UACL), konnten ebenfalls erhöhte Konzentrationen von TFF nachgewiesen werden.(148) Dies lässt vermuten, dass TFF-Proteine, unabhängig von der Ursache der Schädigung, an deren Reparatur beteiligt sind.

TFF2 oder auch SP (spasmolytic polypeptide) wird hauptsächlich von Nebenzellen des Magens und den Brunner-Drüsen des Duodenums gebildet.(66) Des Weiteren ist TFF2 charakteristisch für die so genannte SPEM (spasmolytic polypeptide (=TFF2) expressing metaplasia), wo TFF2 in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden konnte.(67) Die SPEM findet sich u.a. vermehrt in der Mukosa rund um Frühkarzinome des Magens(150) und ist somit als präneoplastische Läsion anzusehen. Somit könnte deren Nachweis und damit der Nachweis von TFF2 ein früher Marker des Magenkarzinoms sein. Außerdem spielt TFF2 eine wichtige Rolle in der

Regeneration geschädigter Mukosa. In Versuchen wurde gezeigt, dass nach Schädigung der Schleimhaut die TFF2-Konzentration innerhalb von Minuten ansteigt und so z. B. über Zellmigration die Heilung des Epithels begünstigt wird.(3) Einer anderen Studie zufolge ist TFF2 als Marker für Progenitorzellen des Magens zu werten.(100) Zudem wird vermutet, dass die Expression von TFF2 mit der Prognose einer Tumorerkrankung korrelieren kann.(29) Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen diffusen Differenzierungsgraden von Tumoren, großen Tumoren und Lymphknotenmetastasen hergestellt werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine starke Expression von TFF2 mit einer schlechteren Prognose einer Tumorerkrankung einhergehen könnte. Ein möglicher Erklärungsansatz besteht darin, dass es bei einem Mukosaschaden nicht nur zur Migration intestinaler Zellen, sondern auch zum Einwandern von Tumorzellen kommt bzw. es sich hierbei um ein und dasselbe handeln könnte. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch unklar. Da TFF2 wie oben genannt beim Magenkarzinom und bei Epithelschädigung eine wichtige Rolle einnimmt und zusätzlich als Marker für Progenitorzellen gehandelt wird, ist auch die nähere Funktion von TFF2 speziell beim BE bzw. EAC genauer zu klären.

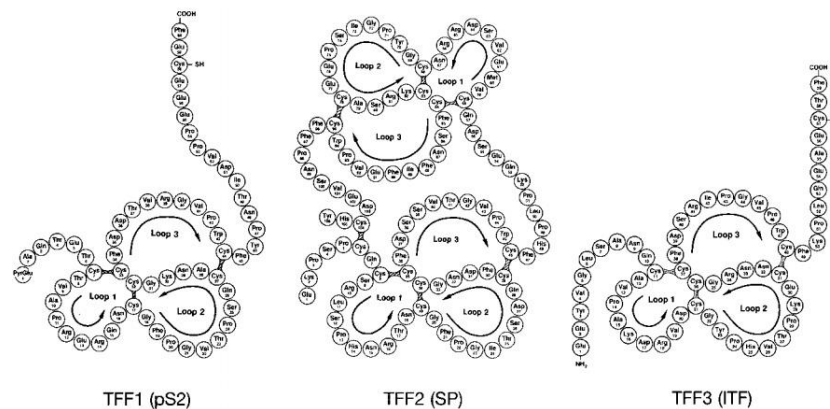


Abbildung 19: Familie der Trefoil-Peptide (134)

1.8 Ziele der Arbeit

Wie oben beschrieben ist der Barrett-Ösophagus eine weit verbreitete Krankheit. Schätzungen zufolge erreicht die Inzidenz in der Gesamtbevölkerung bis zu 6,8%.⁽⁴⁵⁾ Trotz alledem ist die Gefahr der Progression zu einem EAC mit einem jährlichen Risiko von 0,12% sehr gering.⁽⁶¹⁾ Das Problem ist jedoch das bei Erstdiagnose meist bereits fortgeschrittene Tumorstadium sowie die damit verbundene schlechte Prognose des EAC. Zudem findet sich bei mehr als einem Drittel aller Patienten mit EAC keine GERD oder BE in der Vorgeschichte,⁽⁷⁰⁾ was die Detektion gefährdeter Patienten deutlich erschwert. Bislang gibt es abgesehen von der Gabe von Säureblockern wie z.B. Protonenpumpenhemmern keine adäquate medikamentöse Therapiestrategie für den BE und damit auch keine effektive Präventionsmöglichkeit. Um einen Progress möglichst frühzeitig zu entdecken, sollten Patienten mit Reflux, BE oder assoziierten Erkrankungen in Screening-Programme aufgenommen werden. Diese so genannten Surveillance-Endoskopien sind allerdings aufgrund des fraglichen Nutzens und Effizienz sehr umstritten. Daher sind dringend weitere diagnostische Mittel notwendig, um Risikopatienten frühzeitig identifizieren zu können. Eine Möglichkeit hierfür ist der Einsatz von Biomarkern. Ziel dieser Arbeit ist es, die Eignung der im L2-IL-1 β -Mausmodell getesteten 4 Biomarker immunhistochemisch an humanem Probenmaterial zu untersuchen.⁽⁹⁷⁾ Hierdurch könnten Hochrisikogruppen frühzeitig identifiziert und unmittelbar einer entsprechenden Therapie zugeführt werden, ohne z.T. jahrelang aufwendige und belastende Surveillance-Endoskopien durchlaufen zu müssen. Langfristig wäre es wünschenswert, dass bei vorausgesetzter prognostischer Vorhersagekraft diese Marker Einzug in den klinischen Alltag halten. Es wäre so durch relativ einfache Verfahrenstechniken möglich, den weiteren Verlauf eines BE besser einzuschätzen und die notwendigen Therapiemaßnahmen einleiten zu können. Ein weiterer strittiger Punkt in der Definition des BE ist das Vorhandensein einer spezialisierten intestinalen Metaplasie mit Becherzellen. Dies ist bislang in Deutschland und weiten Teilen Amerikas Voraussetzung für die Diagnosestellung des BE. In einer Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass bei Vorliegen eines EAC in 100% ein CLE (columnar lined epithelium) nachweisbar war.⁽⁹⁷⁾ Bislang ist in Deutschland allerdings bei Patienten mit CLE kein Einschluss in ein Surveillance-Programm vorgesehen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist also, die Rolle der Becherzellen beim BE näher zu beleuchten. Insbesondere soll dabei auf die Notwendigkeit des Vorliegens einer spezialisierten intestinalen Metaplasie zur Diagnosestellung eingegangen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Patientenkollektiv

Um die Ergebnisse aus dem oben beschriebenen L2-IL-1 β -Mausmodell auch auf den Menschen übertragen zu können, waren Untersuchungen von humanen Proben erforderlich. Das Thema Barrett-Ösophagus ist einer der Forschungsschwerpunkte des Direktors der Pathologie des Klinikums Bayreuth, Herrn Prof. Dr. M. Vieth. Das Klinikum ist so zu einer wichtigen Institution bei der Beurteilung von Proben der Speiseröhre geworden. Dem Labor von Quante et al., über welches die Datenerhebung für diese Arbeit erfolgte, wurden zur weitergehenden histologischen Aufarbeitung freundlicherweise entsprechendes Material zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um endoskopisch entnommene, durch Paraffin fixierte Biopsien und Resektate des Ösophagus. Die Endoskopien waren im Jahr 2008 in internistischen Zentren und Praxen durchgeführt und zur externen histologischen Beurteilung an das Klinikum Bayreuth geschickt worden. Insgesamt wurden 50 zufällig ausgesuchte Proben untersucht, davon 19 mit BE und 31 mit EAC. Eine Altersgrenze bestand nicht. Die Studie folgte dem Design einer Fall-Kontroll-Studie. In der BE-Gruppe, welche der Kontroll-Gruppe entsprach, galt als Einschlusskriterium das Vorliegen einer spezialisierten intestinalen Metaplasie mit Becherzellen. Patienten, bei denen in der Vorgeschichte eine Dysplasie oder ein EAC diagnostiziert worden war, wurden von dem Datensatz ausgeschlossen. In die EAC-Gruppe, welche der Fall-Gruppe entsprach, wurden Patienten eingeschlossen, bei denen ein EAC im UICC-Stadium <pT2 vorlag mit ggf. begleitender hglEN oder Carcinoma in situ. Patienten mit lediglich Vorliegen einer IgIEN wurden nicht in die Gruppe eingeschlossen. Eine erweiterte Therapie im Sinne einer chirurgischen oder systemischen Vorbehandlung galt als Ausschlusskriterium. Bei den Proben der BE-Gruppe handelte es sich meist um Biopsien, in der EAC-Gruppe waren vorwiegend endoskopische Mukosaresektate vorliegend. Die Präparate wurden geschnitten und anhand der o.g. Ergebnissen aus dem L2-IL-1 β -Mausmodell entsprechend gefärbt (HE-/PAS-Färbung, immunhistochemische Färbung für Notch1, Lgr5, Dclk1 und TFF2) (vgl. Kapitel 2.2). Alle Proben wurden unabhängig voneinander von der Verfasserin dieser Arbeit und Dr. R. Schellnegger, ehemals II. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, untersucht. Dabei wurden nur Areale mit spezialisierter intestinaler Metaplasie und Areale mit vorliegendem EAC verglichen. Dysplastische Areale wurden nicht ausgewertet. Bezüglich der Becherzellen mikroskopierte jeder

Untersucher vier repräsentative Blickfelder. Jedes Lumen, welches von Zylinderepithel umgeben war, wurde dabei als einzelne Krypte gewertet. Beinhaltete diese Krypte Becherzellen, wurde sie als positiv gewertet, bei fehlendem Nachweis von Becherzellen galt sie als negativ. Anschließend wurde der Anteil der positiven Krypten zur Gesamtzahl der Krypten ins Verhältnis gesetzt (goblet cell ratio) und aus den vier Einzelwerten ein Mittelwert gebildet. Aus den jeweiligen Mittelwerten der beiden Untersucher wurde schließlich ein abschließender Mittelwert erzeugt, welcher in die Statistik einfließt. Ein ähnliches Vorgehen wurde bei den vier immunhistochemischen Färbungen verfolgt. Hier erfolgte durch die beiden Untersucher jeweils die Einteilung in verschiedene Gruppen, je nach Prozentzahl der positiv gefärbten Krypten an der Gesamtzahl der Krypten (vgl. Tabelle 2). Dabei wurden ebenfalls jeweils vier repräsentative Blickfelder pro Untersucher und Gruppe (BE/EAC) mikroskopiert. Eine Krypte mit Vorliegen von immunhistochemisch angefärbten Zellen wurde als positiv gewertet, bei ausbleibender immunhistochemischer Färbung galt sie als negativ. Aus den vier einzelnen Werten wurde pro Untersucher ein Mittelwert gebildet. Aus den jeweiligen Mittelwerten der beiden Untersucher wurde dann der abschließende Mittelwert errechnet. Als Mikroskop diente ein Zeiss Axio Mikroskop.

Score	0	1	2	3	4
Notch1	< 1%	1 – 25%	25 – 50%	50 – 75%	> 75%
Lgr5	<10%	10 – 30%	30 – 60%	> 60%	
Dclk1	<10%	10 – 30%	30 – 60%	> 60%	
TFF2	< 1%	1 – 25%	25 – 50%	50 – 75%	> 75%

Tabelle 2: Kategorisierung der immunhistochemischen Marker nach Anteil der positiv gefärbten Krypten an der Gesamtzahl der Krypten (Prozent)

2.2 Färbeprotokolle

2.2.1 Färbeprotokoll HE/PAS

Zunächst wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben in 3 µm Dicke geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte mittels Xylen deparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydratisiert. Für die HE-Färbung wurden die Schnitte daraufhin für eine Minute mit Mayer's Hämalaun behandelt. Diese wurden anschließend für 5 Minuten in lauwarmem Leitungswasser gebläut. Die Plasmafärbung erfolgte durch Eosinlösung, welche für eine Minute aufgebracht wurde. Die Schnitte wurden kurz in Leitungswasser gespült, bevor sie in aufsteigender Alkoholreihe wieder dehydratisiert wurden. Anschließend erfolgte noch das Klären mittels Xylol. Bei der PAS-Färbung wurde zu den entparaffinierten und rehydratisierten Schnitten zunächst für 5 Minuten Periodsäure hinzugegeben. Anschließend wurden diese für drei Minuten unter fließendem Leitungswasser sowie Aqua dest gespült und für 15 Minuten Schiff-Reagenz hinzugegeben. Es erfolgte das erneute dreiminütige Spülen unter fließendem Wasser sowie mit Aqua dest. Für zwei Minuten wurden die Schnitte dann mit der Hämatoxylin-Lösung nach Gill III behandelt und anschließend erneut für drei Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Dehydratation erfolgte mittels aufsteigender Alkoholreihe sowie anschließend das Klären mit Xylen.

2.2.2 Färbeprotokoll Notch1

Die Paraffinblöcke mit den enthaltenen Gewebeproben wurden in 3 µm Dicke geschnitten, mittels Xylen entparaffiniert und anschließend in absteigender Alkoholreihe und Aqua dest rehydriert. Die Antigen-Demaskierung erfolgte hitzeinduziert im Schnellkochtopf mittels Citratpuffer (pH=6). Anschließend wurden die Schnitte mit TBST (TRIS-gepufferte Kochsalzlösung, TRIS=Trishydroxymethylaminomethan, TBS + Tween100) gewaschen. Die Anwendung von H₂O₂ führte zur Blockade endogener Peroxidasen. Für zwei Stunden wurde der Universal Protein Block von Dako aufgebracht. Nach Abklopfen desselben wurden die Schnitte mit gespaltenem Notch1 (Cell Signaling, Cleaved Notch1, Verdünnung 1:50) über Nacht bei 4°C in der Feuchtkammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut mit TBST für zweimal fünf Minuten gewaschen. Dann wurde der biotinylierte sekundäre Antikörper (Vector, #BA-1000, goat anti-rabbit, Verdünnung 1:100) für zwei Stunden bei Raumtemperatur

aufgebracht. Anschließend erfolgte das Waschen mit TBST für fünf Minuten und mit PBS für ebenfalls fünf Minuten. Das Standard-ABC-Kit (Vector) wurde aufgebracht und für 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Daraufhin wurden die Schnitte für dreimal fünf Minuten mit PBS gespült. Als Chromogen diente DAB (SigmaDAB, Tabletten). Sobald die Färbung sichtbar wurde, wurden die Schnitte in PBS getaucht. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und die Dehydratation der Schnitte in aufsteigender Ethanolreihe. Trotz mehrmaliger Versuche und Varianz der Färbeprotokolle grenzten sich die Notch1-positiv gefärbten Zellen jedoch nur unzureichend vom umliegenden Gewebe ab, sodass dies bei der Bewertung der Untersuchungsergebnisse entsprechend berücksichtigt werden sollte.

2.2.3 Färbeprotokoll Lgr5

Bei der immunhistochemischen Lgr5-Färbung ergaben sich technische Schwierigkeiten, da nicht alle Schnitte mit dem gleichen Antikörper gefärbt werden konnten. Zunächst stand der Antikörper #LS-A1235 der Firma MBL (Medical and Biological Laboratories Co, Ltd) zur Verfügung. Dafür wurden die 3 µm dicken Paraffinschnitte mit dem zu untersuchenden Gewebe erst mit Xylen entparaffiniert und anschließend durch absteigende Ethanolreihe und Aqua dest rehydriert. Das hitzeinduzierte Antigen Retrieval erfolgte im Dampfdruckkochtopf in Citratpuffer (pH=6), woraufhin die Schnitte mit PBS gespült wurden. Das Blocken der endogenen Peroxidasen erfolgte in 3%-igem H₂O₂, woraufhin die Schnitte erneut in PBS gewaschen wurden. Nach Blocken unspezifischer Antigenbindungen für 30 Minuten mit 5%-igem Ziegen Serum wurde der Lgr5-Antikörper (MBL, #LS-A 1235, Verdünnung 1:500) für die Dauer von zwei Stunden bei Raumtemperatur dazugegeben (Feuchtkammer). Nach Abklopfen des Antikörpers wurden die Schnitte dreimal für fünf Minuten in Phosphatpuffer gewaschen. Zur Signalverstärkung wurde die ABC-Methode angewendet (ABC=Avidin-Biotin-Complex). Nach Zugabe sekundärer, biotinylierter Antikörper (Vector, #BA-1000, goat anti-rabbit, Verdünnung 1:100) in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Schnitte erneut in Phosphatpuffer gewaschen (dreimal für jeweils zwei Minuten). Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur mit einem ABC-Kit (Vectastain ABC-Kit, #PK-6100) in PBS für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für fünf Minuten wurde das Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin) (SigmaDAB, Tabletten) hinzugegeben. Nach Tauchen der Schnitte in PBS wurden diese mit Hämatoxylin gegengefärbt und in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert. Der bislang verwendete Antikörper

#LS-A1235 war aber bei versuchter Nachbestellung nicht mehr verfügbar. Anstelle dessen wurde von der gleichen Firma der Antikörper #LS-A1236 angeboten. Das Färbeprotokoll änderte sich nun hinsichtlich der Verwendung eines Dampfgeräts, einer geringeren Verdünnung des Lgr5-Antikörpers (jetzt 1:200) mit nur einer Stunde Inkubationszeit sowie stärkerer Verdünnung des sekundären Antikörpers (jetzt 1:200). Des Weiteren variierten die Waschzeiten in PBS leicht bei ansonsten gleicher Färbetechnik.

2.2.4 Färbeprotokoll Dclk1

Die formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Proben wurden 3 µm dünn geschnitten, mittels Xylen entparaffiniert und mit Alkohol in absteigender Reihenfolge sowie Aqua dest rehydriert. Das Antigen Retrieval erfolgte im Dampfdruckkochtopf mit Citratpuffer (pH=6). Anschließend wurden die Schnitte mit Phosphatpufferlösung (PBS) gespült. Die endogenen Peroxidasen wurden durch die Inkubation in 3%igem H₂O₂ inaktiviert. Nach Waschen mit PBS für dreimal fünf Minuten und Blocken unspezifischer Bindungen mit 5%-igem Ziegenerum wurde ein Streptavidin/Biotin-Kit dazu gegeben. Anschließend wurde ein polyklonaler anti-Dclk1-Antikörper (Abgent, #AP7219b, Verdünnung 1:200 in PBS) hinzugefügt, mit welchem die Proben bei 4°C über Nacht inkubiert wurden (Feuchtkammer). Die Schnitte wurden am nächsten Tag mit PBS (dreimal fünf Minuten) gewaschen, woraufhin ein sekundärer, biotinylierter Antikörper (Vector, #BA-1000, goat anti-rabbit, Verdünnung 1:100 in PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur dazu gegeben wurde. Nach erneutem Waschen mit PBS für dreimal zwei Minuten erfolgte die Inkubation mit dem ABC-Kit (Vectastain ABC Kit, #PK-6100) für 30 Minuten bei Raumtemperatur zur Signalverstärkung. Die Schnitte wurden wiederum dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen und danach DAB (SigmaDAB, #D4293-50 SET) hinzugefügt. Nach Sichtbarwerden der Färbung wurden die Schnitte in PBS getaucht. Es erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin sowie die Dehydrierung mittels aufsteigender Ethanolreihe.

2.2.5 Färbeprotokoll TFF2

Die Paraffinblöcke mit dem eingebetteten Gewebe wurden mithilfe eines Mikrotoms in 3 µm Dicke geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden zunächst mit Xylen entparaffiniert und anschließend mit Ethanol und Aqua dest

rehydriert. Die Antigendemaskierung (antigen retrieval) erfolgte mittels Citratpuffer (pH=6) im Dampfdruckkochtopf. Die Schnitte wurden anschließend mit PBS gespült. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde über die Zugabe von H₂O₂ (3%) für 10 Minuten blockiert und nach dreimaligem Waschen für fünf Minuten in PBS erfolgte die Blockade unspezifischer Antigen-Antikörper-Bindungen mittels 5%-igem Ziegen Serum (30 Minuten). Nach Zugabe eines Streptavidin-/Biotin-Kits wurde die Probe eine Stunde mit TFF2 (Acris, #13681-1-AP, Verdünnung 1:1.000 in PBS) bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Nach erneutem dreimaligen, fünfminütigen Waschen in PBS erfolgte das Hinzufügen des biotinylierten sekundären Antikörpers (Vector, #BA-1000, goat anti-rabbit, Verdünnung 1:200). Vor und nach Hinzufügen des Standard-ABC-Kits (Vectastain ABC-Kit, #PK-6100) erfolgte das Waschen in PBS (dreimal zwei Minuten bzw. dreimal fünf Minuten). Danach wurde DAB (SigmaDAB, #D4293-50 SET) als Chromogen für eine Minute dazu gegeben. Nach dem Tauchen in PBS erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und die Dehydrierung mittels Alkohol.

3 Ergebnisse

3.1 Statistische Methoden

Zur statistischen Analyse der Goblet cell ratio wurde ein t-Test verwendet. Mit Hilfe dieses Wertes wurde untersucht, ob sich die Goblet cell ratio im nicht dysplastischen BE im Vergleich zum EAC signifikant unterscheidet. Bei den immunhistochemischen Färbungen wurde dafür der χ^2 -Test verwendet. Ein p von $<0,05$ galt jeweils als statistisch signifikant. Anschließend wurde für jeden der insgesamt 5 Marker ein logistisches Regressionsmodell angewandt, um eine entsprechende Vorhersage der Wahrscheinlichkeit zu treffen, mit dem ein Ereignis (BE bzw. EAC) eintreten wird. Zur weiteren statistischen Analyse erfolgte die Darstellung mittels Receiver-Operating-Characteristic-Kurve (ROC-Kurve). ROC-Kurven geben einen Überblick über die diagnostische Güte eines Tests. Dabei wird für jeden Parameterwert die entsprechende Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) als y-Achse und die Falsch-Positiv-Rate als x-Achse aufgetragen. Der Test weist Trennschärfe auf, wenn sich die Kurve signifikant von der Diagonalen unterscheidet. Zudem kann die Fläche unter der ROC-Kurve (area under the curve, AUC) berechnet werden. Die Fläche kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen. Je höher der Wert, umso besser ist die Güte des Tests. Der AUC-Wert kann also als Wahrscheinlichkeit interpretiert werden, dass ein positiver Wert auch tatsächlich als richtig positiv klassifiziert wird. Normalerweise erfolgt bei der Berechnung der ROC-Kurven bzw. AUC-Werte eine Korrektur nach Alter und Geschlecht. Da die Frauen in der EAC-Gruppe mit nur 3 von insgesamt 28 Fällen jedoch deutlich unterrepräsentiert waren, ergaben sich daraus resultierend falsch hohe Werte. Somit erfolgte in dieser Arbeit lediglich eine altersadaptierte Berechnung der ROC-Kurven bzw. AUC-Werte ohne Berücksichtigung des Geschlechtes. In dem aus dieser Arbeit folgenden Paper wurde die Fallzahl erhöht, wodurch der statistische Algorithmus mit Einbeziehung der Korrektur nach Alter und Geschlecht wieder regelrecht angewandt werden konnte.(114) Für die statistische Auswertung wurde GraphPad Prism 5 sowie IBM SPSS Statistics 25 und Excel 2013 verwendet. Im Folgenden wird auf die statistische Auswertung sowie Ergebnisse eingegangen. Diese Doktorarbeit diente hauptsächlich zur Testung der Marker und Entwicklung der Methoden. Hierfür wurde eine Fallzahl von insgesamt 50 Patienten mit BE bzw. EAC verwendet. Dabei zeigten sich die p-Werte jeweils knapp im signifikanten Bereich. Für die aus der Doktorarbeit folgende Publikation wurde die Fallzahl jedoch auf 189 erhöht, wodurch auch die Signifikanz verbessert werden konnte.(114)

3.2 Statistische Auswertung

3.2.1 Epidemiologische Ergebnisse

Der Aufbau der Studie erfolgte im Sinne einer Fall-Kontroll-Studie. Insgesamt wurden 50 Patienten in die Studie eingeschlossen, welche sich im Jahr 2008 einer ÖGD unterzogen hatten und deren dabei gewonnenes Untersuchungsmaterial zur externen histologischen Begutachtung an das Institut für Pathologie des Klinikums Bayreuth gesandt wurde. Die Auswahl des Untersuchungsjahres sowie der Patienten erfolgte dabei nach dem Zufallsprinzip. Die Kontroll-Gruppe bestand aus 19 Patienten mit BE, die Fall-Gruppe setzte sich aus 31 Patienten mit EAC zusammen. Die Patienten gehörten sowohl in der BE-Gruppe (68%) als auch in der EAC-Gruppe (90%) vorwiegend dem männlichen Geschlecht an. Der Altersdurchschnitt lag in der BE-Gruppe bei 62,2 Jahren, was etwa dem der EAC-Gruppe entsprach (64,2 Jahre). Frauen erkrankten im Schnitt etwas früher (57,9 Jahre) an einem BE/EAC als Männer (64,7 Jahre).

	Anzahl Pat.	Alter (Durchschnitt) (Jahre)	Männer (%)
BE	19	62,2	68
EAC	31	64,2	90

Tabelle 3: Altersdurchschnitt und Geschlechterverteilung bei Patienten mit BE bzw. EAC

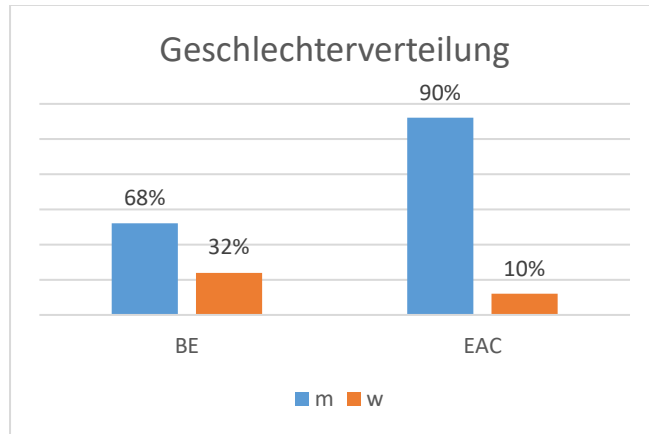


Abbildung 20: Geschlechterverteilung bei Patienten mit BE bzw. EAC

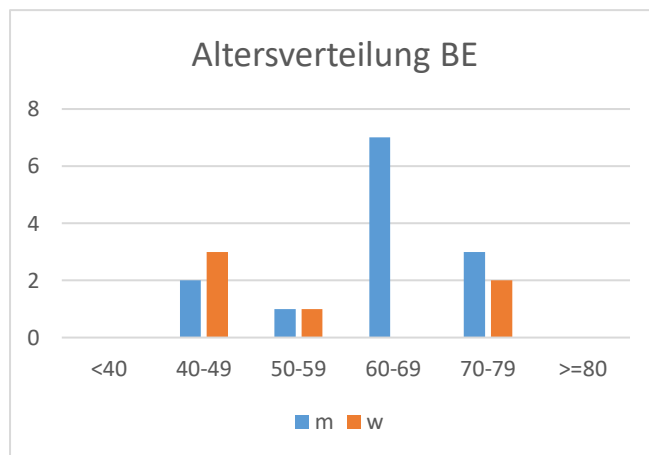


Abbildung 21: Altersverteilung bei Patienten mit BE

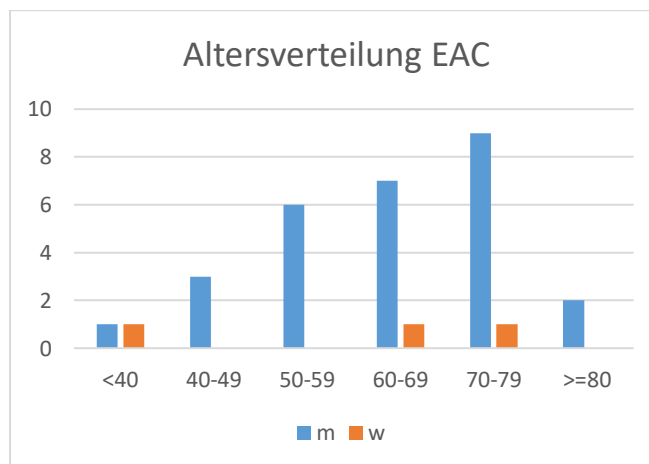


Abbildung 22: Altersverteilung bei Patienten mit EAC

3.2.2 Ergebnisse HE/PAS- und immunhistochemische Färbungen

3.2.2.1 HE/PAS-Färbung

Durch das Hämatoxylin werden alle basophilen Strukturen, also vor allem die Zellkerne blau angefärbt. Alle basischen Strukturen, inkl. Zytoplasma, werden mittels Eosin gefärbt. Die HE-Färbung wird üblicherweise mit der PAS-Färbung kombiniert, durch welche sich die muzinhaltigen Becherzellen klassischerweise purpurfarben darstellen lassen.

In dieser Arbeit wurde die Becherzellichte im BE mit der Becherzellichte bei Patienten mit EAC untersucht. Dysplastische Areale wurden nicht ausgewertet. Jedes Lumen, welches von Zylinderepithel umgeben war, wurde als einzelne Krypte gewertet. Bei Vorliegen von Becherzellen wurde diese als positiv gewertet. Die Anzahl der positiven Krypten an der Gesamtzahl der Krypten ergab die Becherzellichte, die sogenannte goblet cell ratio (GC-Ratio). Dabei zeigte sich bei den Patienten mit BE ein Mittelwert der Becherzellichte von 0,473, in der EAC-Gruppe lag der Wert bei 0,314. Die beiden Gruppen unterscheiden sich somit signifikant voneinander ($p=0,025$) (vgl. Abbildung 25). Der minimale Wert lag in der BE-Gruppe bei 0,108 (EAC-Gruppe 0,000), der maximale Wert bei 0,861 (EAC-Gruppe 0,776). Das 95%-Konfidenzintervall betrug 0,020 bis 0,298. In der logistischen Regression (altersadaptiert) ergab sich ein AUC-Wert von 0,694 (vgl. Abbildung 26).

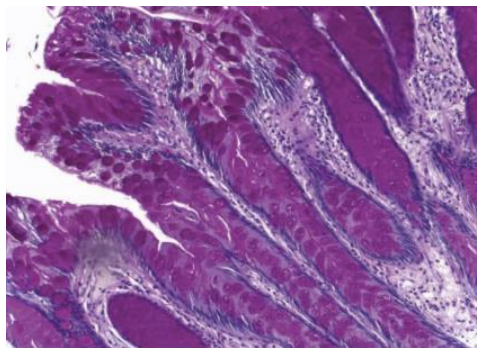


Abbildung 23: BE mit spezialisierter intestinaler Metaplasie mit Becherzellen (114)

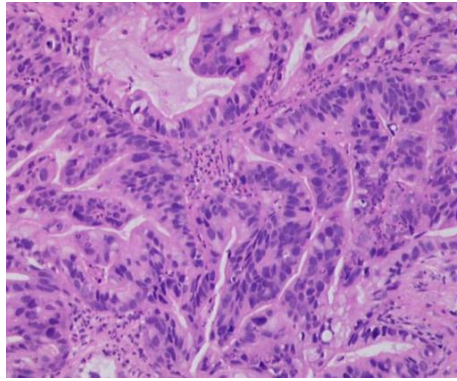


Abbildung 24: histologisches Bild eines EAC (114)

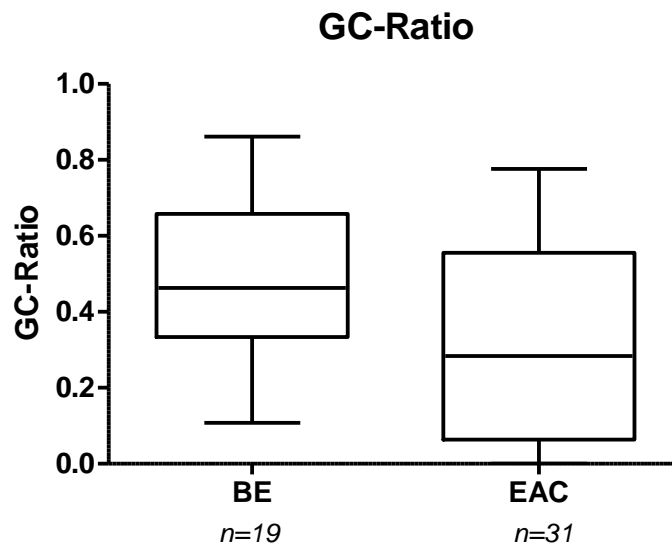


Abbildung 25: Graphische Boxplot-Darstellung der Becherzellichte (GC-Ratio) bei Patienten mit BE bzw. EAC. Mittels Whisker ist der minimale bzw. maximale Wert dargestellt (unpaired two-tailed t-Test $p=0,025$ (signifikant))

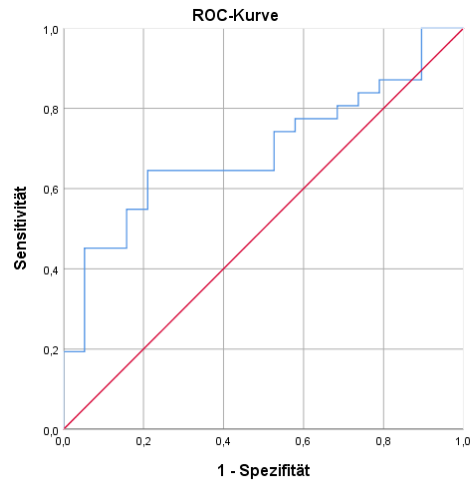


Abbildung 26: logistische Regressionsanalyse der GC-Ratio (altersadaptierte Darstellung) (AUC 0,694)

3.2.2.2 Notch1

Je nach prozentualem Anteil der positiv gefärbten Krypten an der Gesamtzahl der Krypten erfolgte bei der mikroskopischen Auswertung von Notch die Einteilung in fünf Gruppen (Gruppe 0-4) (vgl. Abbildung 29). In der BE-Gruppe wurden 63% der Patienten der Gruppe 4 zugeordnet (entspricht >75% der Krypten mit positiver immunhistochemische Färbung). Bei den Patienten mit EAC ließ sich kein eindeutiger Trend für eine der Gruppen nachweisen. Der Chi²-Test ergab einen signifikanten Wert zur Unterscheidung zwischen der BE- und der EAC-Gruppe ($p < 0,0001$). In der logistischen Regressionsanalyse (altersadaptiert) zeigte sich ein AUC-Wert von 0,728 (vgl. Abbildung 30).

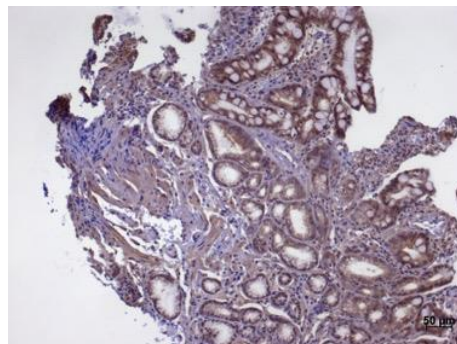


Abbildung 27: Notch-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines BE (114)

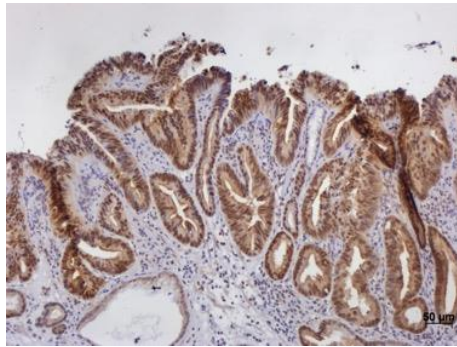


Abbildung 28: Notch-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines EAC (114)

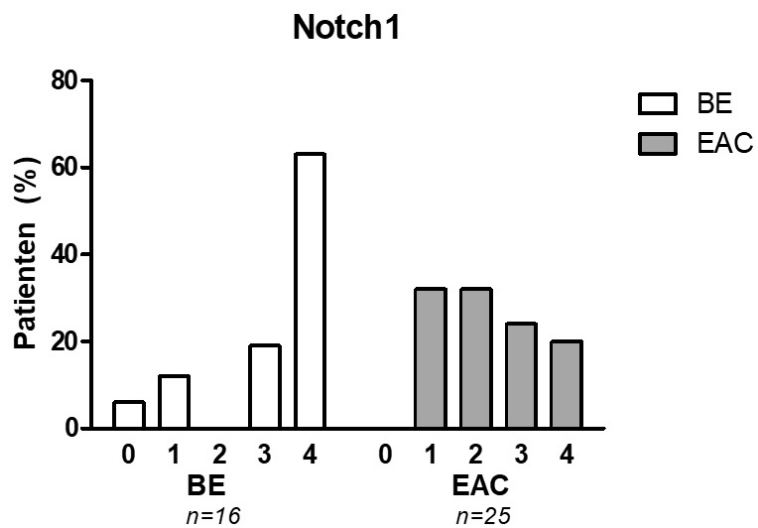


Abbildung 29: Einteilung nach Prozent der Notch1-positiv gefärbten Krypten (Gruppe 0: <1% pos. gefärbt, Gruppe 1: 1-25% pos. gefärbt, Gruppe 2: 25-50% pos. gefärbt, Gruppe 3: 50-75% pos. gefärbt, Gruppe 4: >75% pos. gefärbt) (Chi²-Test <0,0001 (signifikant))

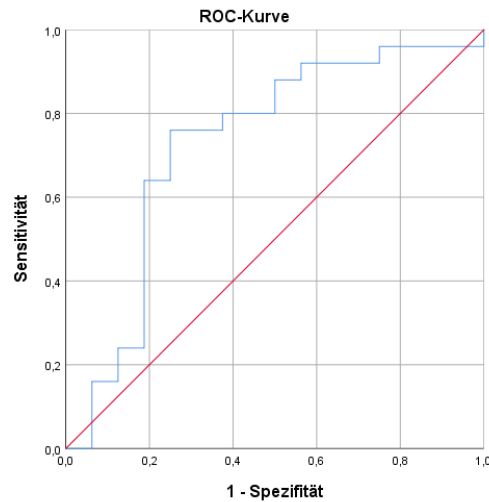


Abbildung 30: Logistische Regressionsanalyse von Notch1 (altersadaptierte Darstellung) (AUC 0,728)

3.2.2.3 Lgr5

Bei der immunhistochemischen Färbung mit Lgr5 konnten zwei Drittel der BE-Patienten der Gruppe 0 (<10% positiv gefärbte Krypten) bzw. der Gruppe 1 (10-30% positiv gefärbte Krypten) zugerechnet werden (vgl. Abbildung 33). Bei den Patienten mit EAC hingegen machte die Gruppe 2 (30-60% positiv gefärbte Krypten) mit 41% den größten Anteil aus. Der Chi²-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Patienten-Gruppe mit BE bzw. EAC ($p < 0,0001$). Die logistische Regressionsanalyse (altersadaptiert) ergab einen AUC-Wert von 0,618 (vgl. Abbildung 34).

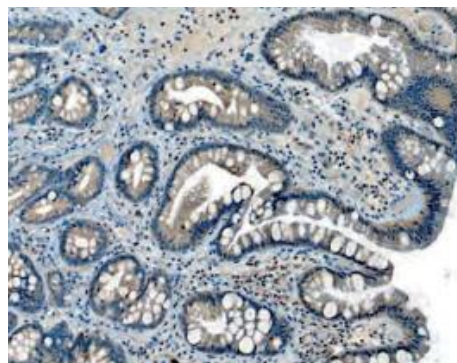


Abbildung 31: Lgr5-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines BE (114)

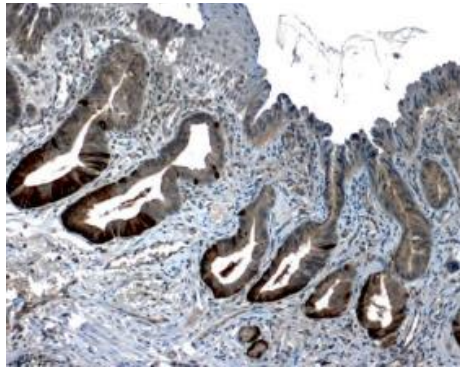


Abbildung 32: Lgr5-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines EAC (114)

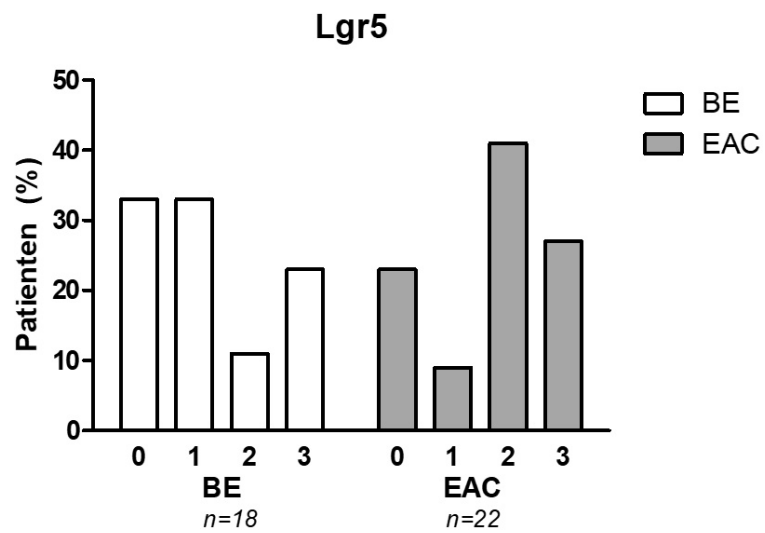


Abbildung 33: Einteilung nach Prozent der Lgr5-positiv gefärbten Krypten (Gruppe 0: <10% pos. gefärbt, Gruppe 1: 10-30% pos. gefärbt, Gruppe 2: 30-60% pos. gefärbt, Gruppe 3: >60% pos. gefärbt) (Chi²-Test p<0,0001 (signifikant)).

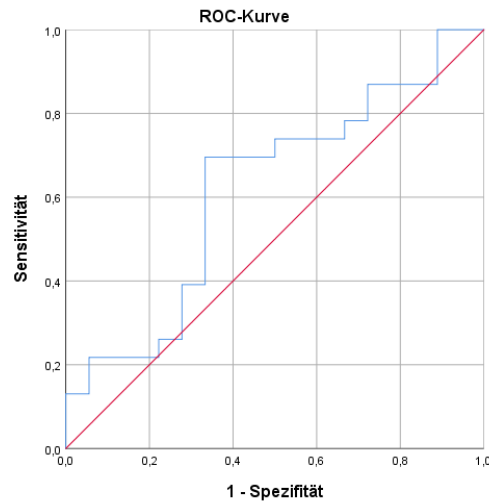


Abbildung 34: Logistische Regressionsanalyse von Lgr5 (altersadaptierte Darstellung) (AUC 0,618)

3.2.2.4 Dclk1

Bei der Analyse der immunhistochemischen Färbungen mit Dclk1 machten die Gruppe 0 (<10% positiv gefärbte Krypten) und Gruppe 1 (10-30% positiv gefärbte Krypten) mit zusammen 84% den größten Anteil bei Patienten mit BE aus. Bei der Untersuchung der Patienten mit EAC machte die Gruppe 1 mit 33% und die Gruppe 2 (30-60% positiv gefärbte Krypten) mit 50% den Hauptanteil aus. Keiner der Patienten mit EAC wurde der Gruppe 0 zugeordnet. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der BE- und der EAC-Gruppe ($p < 0,0001$). Die logistische Regressionsanalyse beschrieb einen AUC-Wert von 0,835 (vgl. Abbildung 38).

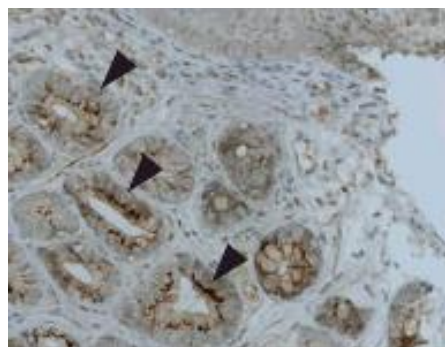


Abbildung 35: Dclk1-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines BE (Pfeilspitzen = zyttoplasmatische Lokalisation von Dclk1) (114)

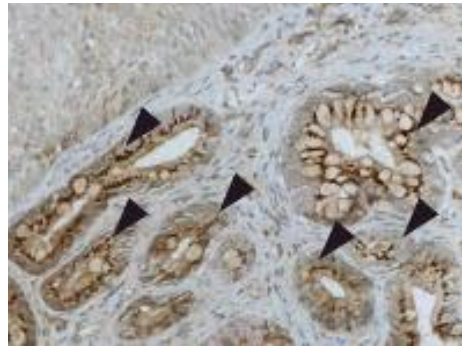


Abbildung 36: Dclk1-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines EAC (Pfeilspitzen = zytoplasmatische Lokalisation von Dclk1) (114)

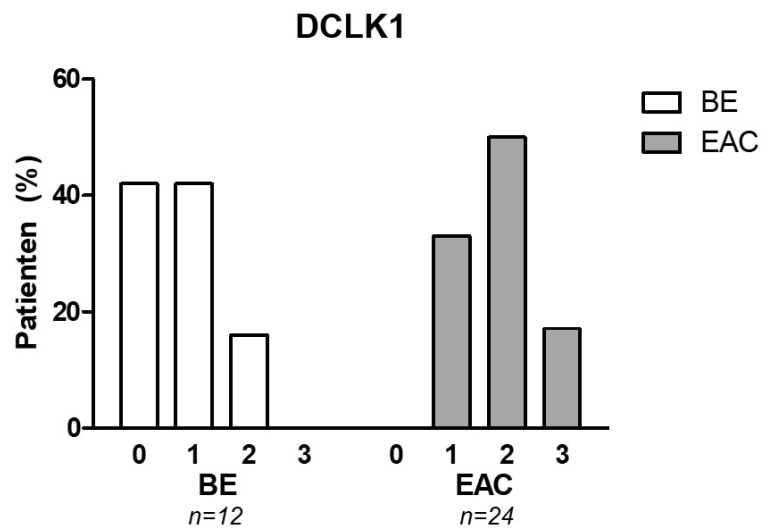


Abbildung 37: Einteilung nach Prozent der Dclk1-positiv gefärbten Krypten (Gruppe 0: <10% pos. gefärbt, Gruppe 1: 10-30% pos. gefärbt, Gruppe 2: 30-60% pos. gefärbt, Gruppe 3: >60% pos. gefärbt) (Chi²-Test p<0,0001 (signifikant)).

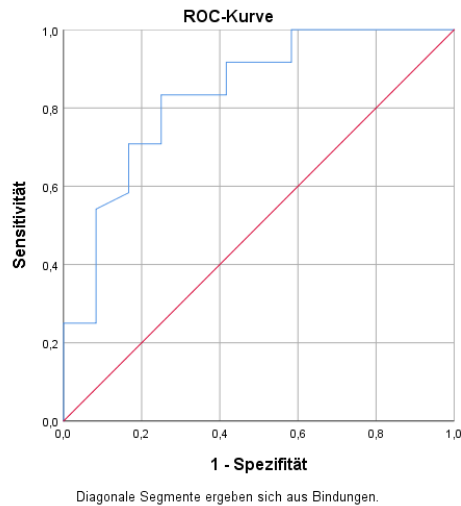


Abbildung 38: Logistische Regressionsanalyse von Dclk1 (altersadaptierte Darstellung) (AUC 0,835)

3.2.2.5 TFF2

Nach Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit TFF2 zeigte sich bei Patienten mit BE mit 41% der größte Anteil in der Gruppe 2 (25-50% positiv gefärbte Krypten). Bei den Patienten mit EAC machte die Gruppe 1 (1-25% positiv gefärbte Krypten) mit 71% mit Abstand die größte Gruppe aus. In die Kategorie 4 mit >75% positiv gefärbter Krypten ließ sich keiner der Patienten mit EAC einschließen. Die BE- bzw. EAC-Gruppe unterschieden sich signifikant voneinander ($p < 0,0001$). In der altersadaptierten logistischen Regressionsanalyse ergab sich ein AUC-Wert von 0,808 (vgl. Abbildung 42).

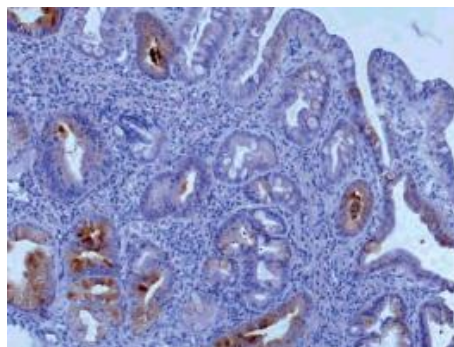


Abbildung 39: TFF2-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines BE (114)

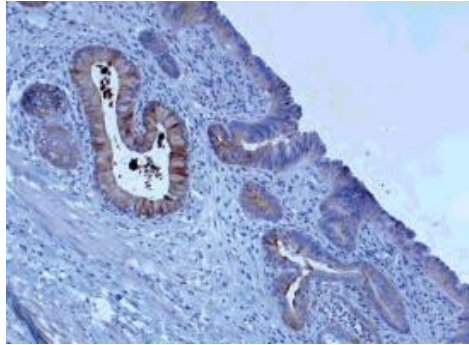


Abbildung 40: TFF2-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines EAC (114)

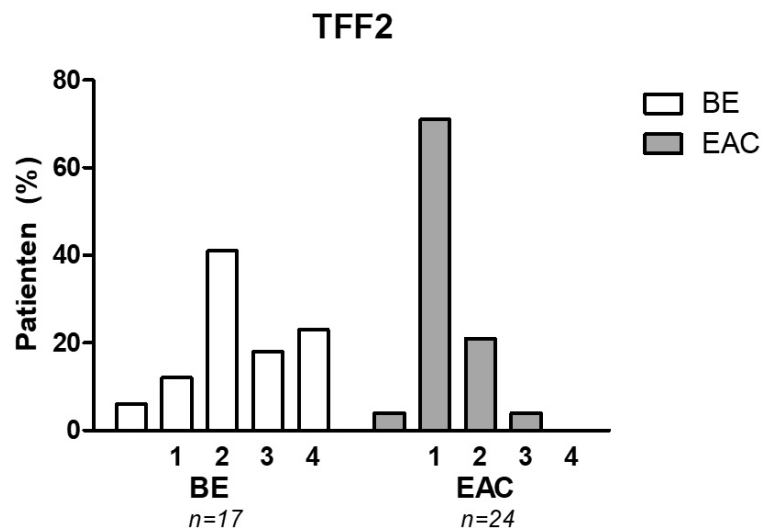


Abbildung 41: Einteilung nach Prozent der TFF2-positiv gefärbten Krypten (Gruppe 0: <1% pos. gefärbt, Gruppe 1: 1-25% pos. gefärbt, Gruppe 2: 25-50% pos. gefärbt, Gruppe 3: 50-75% pos. gefärbt, Gruppe 4: >75% pos. gefärbt) (Chi²-Test <0,0001 (signifikant))

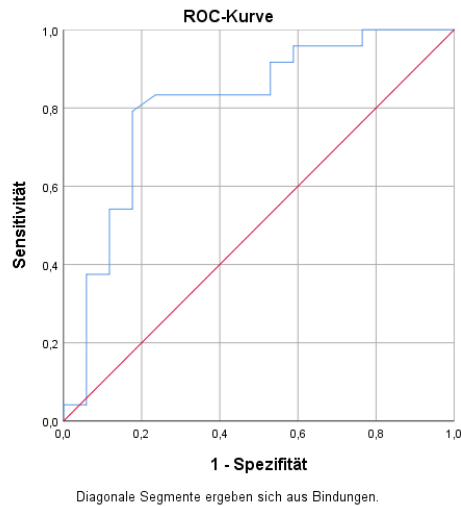


Abbildung 42: Logistische Regressionsanalyse von TFF2 (altersadaptierte Darstellung) (AUC 0,808)

3.2.3 Kombinierte logistische Regressionsmodelle

Um zu testen, ob sich die einzelnen Marker zur Detektion einer malignen Entartung eines BE eignen, erfolgte die Analyse jedes einzelnen Biomarkers mittels logistischer Regressionsmodelle (s.o.). Laut der oben gezeigten Ergebnisse kann Dclk1 mit einer AUC von 0,835 am besten zwischen BE und EAC unterscheiden, gefolgt von TFF2 mit einer AUC von 0,808, Notch1 mit einer AUC von 0,728, der GC-Ratio mit einer AUC von 0,694 sowie Lgr5 mit einer AUC von 0,618. Um diese Ergebnisse weiter zu verbessern, wurden die logistischen Regressionsmodelle der einzelnen Biomarker miteinander kombiniert. Hierbei erzielte die Kombination aus der Becherzellichte, Dclk1 und TFF2 mit einer AUC von 0,959 die besten Ergebnisse, gefolgt von der Kombination von zusätzlich Lgr5 mit einer AUC von 0,958 bzw. eine Kombination aller 5 untersuchten Marker mit einer AUC von 0,951 (vgl. Tabelle 4).

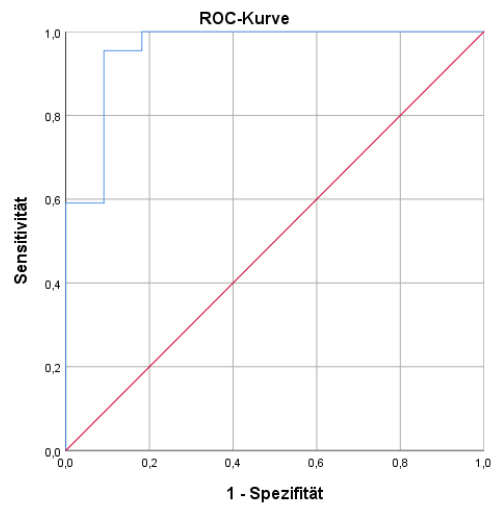


Abbildung 43: logistisches Regressionsmodell von GC-Ratio, Dclk1 und TFF2 (AUC 0,959)

Marker					AUC
GC-Ratio					0,694
Dclk1					0,835
TFF2					0,808
Lgr5					0,618
Notch1					0,728
GC-Ratio	Dclk1				0,868
GC-Ratio	TFF2				0,870
GC-Ratio	Lgr5				0,720
GC-Ratio	Notch1				0,785
Dclk1	TFF2				0,913
Dclk1	Lgr5				0,836
Dclk1	Notch1				0,828
TFF2	Lgr5				0,863
TFF2	Notch1				0,864
Lgr5	Notch1				0,765
GC-Ratio	Dclk1	TFF2			0,959
GC-Ratio	Dclk1	Lgr5			0,882
GC-Ratio	Dclk1	Notch1			0,864
GC-Ratio	TFF2	Lgr5			0,881
GC-Ratio	TFF2	Notch1			0,912
GC-Ratio	Lgr5	Notch1			0,790
DCAM	TFF2	Lgr5			0,905
DCAM	TFF2	Notch1			0,911
TFF2	Lgr5	Notch1			0,896
GC-Ratio	Dclk1	TFF2	Lgr5		0,958
GC-Ratio	Dclk1	TFF2	Notch1		0,950
DCAM	TFF2	Lgr5	Notch1		0,882
GC-Ratio	Dclk1	TFF2	Lgr5	Notch1	0,951

Tabelle 4: Kombinierte logistische Regressionsmodelle

4 Diskussion

4.1 Rolle der einzelnen Färbungen/Biomarker

4.1.1 Rolle von HE/PAS bei Patienten mit BE/EAC

Becherzellen können mittels der HE/PAS-Färbung sicher identifiziert werden. Bislang wird die Notwendigkeit der Becherzellen bei der Diagnosestellung des BE und Entwicklung eines EAC jedoch intensiv diskutiert. Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der Becherzellen näher zu untersuchen. In den oben beschriebenen Ergebnissen unterscheidet sich die Becherzellendichte in der BE-Gruppe mit 0,473 im Vergleich zur EAC-Gruppe mit 0,314 signifikant ($p < 0,05$). In der durchgeführten linearen Regressionsanalyse ergab sich bezüglich der GC-Ratio ein AUC-Wert von 0,694. Für einen alleinigen Prognosemarker mag dieser Wert nicht ausreichend sein. Allerdings könnten hier durch Kombination mit den anderen getesteten Markern noch deutlich bessere Werte erzielt werden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass mit zunehmender Dysplasie die Zahl an Becherzellen sinkt. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Studien.(73) Der Grund dafür ist letztlich nicht vollends geklärt. Eine Möglichkeit hierfür wäre jedoch, dass Becherzellen Schleim produzieren, welcher das Epithel wie eine Schutzschicht überzieht und somit eine protektive Wirkung hat. Zudem scheinen Becherzellen eine wichtige Rolle bei der Abwehrfunktion zu spielen.(78) Becherzellen gelten als ausdifferenzierte Zellen.(98; 73) Eine Becherzell-Metaplasie ist demzufolge als stabile Metaplasie anzusehen mit einem nur geringen Entartungsrisiko. Eine hohe Anzahl an Becherzellen könnte somit mit einem geringeren Karzinomrisiko einhergehen, so wie es die o.g. Ergebnisse vermuten lassen. Die GC-Ratio wäre somit ein Kriterium, anhand dessen zwischen einem BE ohne Dysplasie und einem BE mit zunehmender Dysplasie unterschieden werden könnte. Dennoch ist umstritten, ob die intestinale Metaplasie mit Becherzellen ein notwendiges Diagnosekriterium für den BE ist. Die Entwicklung des EAC entsteht nach bisherigem Wissen über eine Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz. In Deutschland muss für die Diagnosestellung eines BE eine spezialisierte intestinale Metaplasie mit Becherzellen vorliegen,(140) woraufhin diese Patienten in standardisierte Screening-Programme eingeschlossen werden. In anderen Ländern, wie z.B. Japan und England, ist das Vorhandensein von Becherzellen nicht für die Diagnosestellung des BE erforderlich.(132) Es wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen, dass auch aus metaplastischem Epithel ohne Becherzellen (dem

sogenannten kardiatischen Epithel) eine Dysplasie bzw. ein EAC hervorgehen kann.(65; 130) Meist zeigt sich in der histologischen Aufarbeitung jedoch ein Nebeneinander von verschiedenen Epitheltypen.(99) Dabei ist zu vermuten, dass bei chronischer Säureexposition zunächst ein kardiatisches Epithel im Sinne eines Zylinderepithels ohne Becherzellen entsteht.(50; 22) Daraus kann sich durch anhaltenden Reflux sowohl eine intestinale Metaplasie mit Becherzellen („Barrett-Ösophagus“) als auch ohne Becherzellen entwickeln, welche dafür reich an Parietal- und Hauptzellen ist.(99) Diese Entwicklung konnte auch in o.g. L2-IL-1 β -Mausmodell gezeigt werden, wobei die Bildung eines Barrett-Ösophagus durch die durch Zugabe von Gallensäuren zum Trinkwasser der Mäuse und daraus resultierender Demethylierung von Promotorgenen noch beschleunigt werden konnte.(98) Wie es genau zur Ausbildung der intestinalen Metaplasie kommt, ist dabei noch nicht vollends geklärt. Eine Möglichkeit stellt hierbei das so genannte Transdifferenzierungsmodell dar.(99) Durch die andauernde Exposition des ösophagealen Plattenepithels mit Säure kommt es dieser Theorie zufolge zu einer Down-Regulation der plattenepithelialen Zell-Linie und im Gegenzug zu vermehrter Expression von zylinderepithelialen Zellen durch vermehrte Expression von entsprechenden Transkriptionsfaktoren.(80) Eine andere Theorie besagt, dass durch den anhaltenden Reflux chronische Mikrotraumata entstehen können. Es kommt zur Promotor-Demethylierung und Aktivierung des Cdx2-Promotors.(97) Dadurch werden nahe epitheliale Vorläuferzellen aktiviert, um den Defekt zu reparieren. Die Vorläuferzellen können dabei sowohl von epithelialer Seite als auch von gastraler Seite her einwandern.(99) Daraus resultiert zunächst ein undifferenziertes Epithel, welches die Wunde bedeckt. Durch den andauernden Reflux setzt sich jedoch letztendlich dasjenige Gewebe durch, was am besten säure-resistent ist. Hierbei handelt es sich um das kardiale Epithel, welches im Magen von Natur aus einer andauernden Säureexposition ausgesetzt ist. So breitet sich also das kardiale Gewebe schrittweise immer mehr aus und verdrängt schließlich das Plattenepithel. In dem o.g. L2-IL-1 β -Mausmodell konnte nur in wenigen Fällen eine intestinale Metaplasie mit Becherzellen festgestellt werden. Nichtsdestotrotz entwickelten 20-30% der Mäuse eine höhergradige Dysplasie bzw. ein EAC.(97) Eine weitere Studie mit 141 Patienten nach EMR hat gezeigt, dass bei 71% der Patienten kardiatisches Epithel unmittelbar angrenzend an das EAC nachgewiesen werden konnte. Bei 57% der Patienten konnte dabei sogar gar keine intestinale Metaplasie nachgewiesen werden.(130) In einer weiteren Studie konnte sogar belegt werden, dass es bei Vorliegen einer CLE häufiger zur Ausbildung eines EAC im Sinne der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz kam als bei Vorliegen der typischen

intestinalen Metaplasie mit Becherzellen.(97) Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass ein EAC auch aus einem kardiatypischen Zylinderepithel hervorgehen kann und nicht zwangsweise eine reine intestinale Metaplasie mit Becherzellen vorliegen muss. Allerdings gibt es zur Entwicklung eines EAC auf dem Boden eines CLE aktuell nur vergleichsweise wenige Daten, da bislang in vielen Ländern nur Patienten mit einer intestinalen Metaplasie mit Becherzellen in die entsprechenden Surveillance-Programme aufgenommen werden. Obwohl laut der American Gastroenterological Association (AGA) bislang, wie in Deutschland, die Becherzell-Metaplasie ein notwendiges Diagnosekriterium für den Barrett-Ösophagus und damit auch Einschlusskriterium in die Surveillance-Programme ist, kommt diese Theorie allmählich ins Wanken. Trotz alledem hält die AGA bislang an dieser Definition fest. Sie sieht die Problematik unter anderem darin, dass das kardiatypische Epithel ebenso wie das fundus-typische Epithel im Barrett-Ösophagus nur schwer von dem eigentlichen Zylinderepithel des Magens abgrenzbar ist.(127) Daraus können sich Fehler bei der Auswertung ergeben, wenn z.B. durch die Motilität des Ösophagus während der ÖGD sowie oft schwieriger Identifikation des gastroösophagealen Übergangs Proben aus der Speiseröhre fälschlicherweise dem Magen zugeordnet werden bzw. andersherum. Bei Vorliegen eines kardia- bzw. fundustypischen Epithels kann somit nicht automatisch auf ein metaplastisches Geschehen geschlossen werden. Bei Vorliegen einer intestinalen Metaplasie mit Becherzellen hingegen ist der Nachweis jedoch eindeutig.(127) Und so lange der Zusammenhang zwischen Vorliegen eines kardiatypischen Epithels und Entwicklung eines EAC nicht eindeutig geklärt ist, will die AGA an der bisherigen Definition des Barrett-Ösophagus festhalten. Denn ein Einschluss auch aller Patienten mit Nachweis eines kardiatypischen Epithels ohne gesicherten Malignitätsverdacht würde zum momentanen Zeitpunkt nicht zuletzt zu einer enormen Zunahme der in Surveillance-Programme einzuschließenden Patienten und damit neben logistischen Schwierigkeiten zu einer wahren Kostenexplosion führen.(127) Zunächst muss also der Einfluss des kardiatypischen Epithels auf die Entwicklung eines EAC eindeutig in weiteren, groß angelegten Studien belegt werden.

4.1.2 Rolle von Notch1 bei Patienten mit BE/EAC

Der Notch-Signalweg spielt vor allem bei der Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle, z.B. bei der Differenzierung zu absorptiven Zellen.(87) Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass der Notch-Signalweg bei der Entwicklung des Barrett-Ösophagus von großer Bedeutung ist.(97) Bei Bindung eines Notch-Liganden, wie z.B. Delta, an einen Notch-Rezeptor, kommt es zur Aktivierung des Zielproteins Hes1. Dies resultiert wiederum in der Hemmung von Atoh1 und damit auch in einer verminderten Expression von Becherzellen (vgl. Abbildung 44).(133) Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass es durch Hemmung des Notch-Signalweges, z.B. durch einen γ -Secretase-Inhibitor, zu einer vermehrten Becherzell-Differenzierung kommt und dem malignen Progress somit entgegengewirkt werden könnte. Dieser Effekt konnte auch in dem oben genannten L2-IL-1 β -Mausmodell nachgewiesen werden.(97) Es konnte gezeigt werden, dass mit Hemmung des Notch-Signalweges eine gesteigerte intestinale Genexpression einhergeht.(97) Eine andere Studie kam zu den gleichen Ergebnissen.(133) Hier wurde der Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor Cdx2 und dem Notch-Signalweg näher untersucht. Die Expression von Cdx2 ist darmspezifisch und hat Relevanz in Bezug auf die Zelldifferenzierung sowie den Erhalt der Zellpopulation.(82) Cdx2 induziert außerdem die Transkription von MUC2, einem schleimhaltigen Protein, welches von Becherzellen sezerniert wird. In der Studie konnte nachgewiesen werden, dass durch Gallensäuren die Expression von Cdx2 gesteigert wird, und es dadurch über eine Induktion von Atoh1 bzw. Hemmung von Hes1 zu einer vermehrten Expression von Becherzellen kommt.(133) Des Weiteren wurde die Wirkung nach Einsatz des γ -Secretase-Inhibitors DAPT näher untersucht. Es zeigte sich eine vermehrte Expression von Cdx2, MUC2 und Atoh1 sowie eine verminderte Expression von Hes1 und dem gespaltenen Notch1.(133) Daraus ergab sich eine vermehrte Anzahl an Becherzellen. Die Hemmung der Notch-Expression könnte also ein wichtiger Therapieansatz zur Prävention des EAC sein, wenn durch Gabe eines γ -Secretase-Inhibitors der Progress eines BE zum EAC aufgehalten werden kann.

In der Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit Notch1 wurden 63% der Patienten mit BE der Gruppe 4 zugeordnet (>75% der Krypten positiv gefärbt). In der EAC-Gruppe hingegen ergab sich kein eindeutiger Trend. Dies korreliert jedoch nicht mit der Annahme, dass Notch1 bei hoher Anzahl von Becherzellen eine geringe Expression zeigen dürfte. In der EAC-Gruppe hingegen wäre eine vermehrte Notch-Expression zu erwarten gewesen. Obwohl sich die Werte als signifikant erwiesen,

bleiben sie trotz alledem zu hinterfragen. Nicht zuletzt ergaben sich wie oben beschrieben bei der Färbung von Notch1 technische Schwierigkeiten. Trotz mehrmaliger Versuche und unterschiedlicher Färbeprotokolle grenzten sich die Notch-positiven Zellen größtenteils nur unzureichend vom umliegenden Gewebe ab, was die Auswertung entsprechend erschwerte. Gegebenenfalls müsste die Färbung mit einem anderen Marker bzw. verändertem Färbeprotokoll in einer größer angelegten Studie erneut wiederholt und reevaluiert werden.

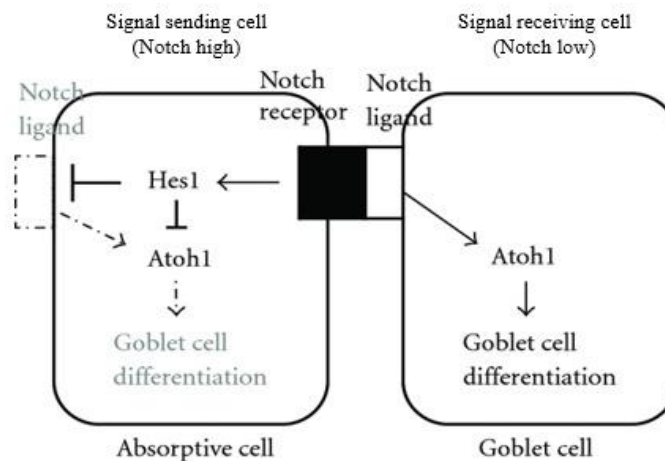


Abbildung 44: Interaktion von Notch, Atoh1 und Hes1. Durch Bindung eines Notch-Liganden einer Signal-schickenden Zelle (rechts) an den Notch-Rezeptor einer Signal empfangenden Zelle (links) wird die Aktivität von Atoh1 in der Signal-empfangenden Zelle durch das Notch-Target-Gen Hes1 gehemmt. Dies führt zur vermehrten Expression einer absorptiven Zelllinie. In der Signal-schickenden Zelle hingegen besteht eine hohe Aktivität von Atoh1, was zur Differenzierung von Becherzellen führt. Dieses Prinzip wird laterale Inhibition genannt (modifiziert nach (88)).

4.1.3 Rolle von Lgr5 bei Patienten mit BE/EAC

Lgr5 konnte als immunhistochemischer Marker für Stammzellen identifiziert werden.(19; 7; 97) Isolierte Lgr5-positive Zellen waren beispielsweise in der Lage, in vitro neue intestinale Drüsen zu bilden.(112) Man geht davon aus, dass Stammzellen in einer sogenannten Stammzellnische lokalisiert sind.(19) Das dort vorherrschende Mikromilieu ist ein empfindliches Gleichgewicht. Kommt es z.B. zu einer Entzündungsreaktionen oder andauernden Säureexposition, kann das Gleichgewicht

empfindlich gestört werden und es zu einer malignen Entartung kommen.(101) Normalerweise befinden sich nur wenige Stammzellen innerhalb einer Stammzellnische. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass sie sich in der Regel asymmetrisch teilen, d.h. es entsteht immer eine identische ruhende Tochter-Stammzelle, sowie eine so genannte „transit amplifying cell“. Diese kann sich noch mehrmals teilen und erreicht schließlich ihre Ausdifferenzierung.(7) Durch diese asymmetrische Teilung ist die originäre Stammzelle relativ gut vor Mutationen oder Zellschäden geschützt. Kommt es dennoch zu Veränderungen des genetischen Materials einer Stammzelle, kann sich daraus eine Tumorstammzelle (cancer stem cell, CSC) entwickeln.(84) Die Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation wird durch ein komplexes Ineinandergreifen verschiedener Signalwege ermöglicht. Der Wnt-Signalweg spielt dabei eine tragende Rolle.(19) Durch Mutationen kann der Wnt-Signalweg jedoch auch „fehlaktiviert“ werden, was z.B. durch Fehlen des negativen Regulators APC (adenomatous polyposis coli) zu einer Tumorgenese im Kolon führen kann.(19; 7) Lgr5 konnte als wichtiges Zielprotein (target proteine) des Wnt-Signalweges identifiziert werden.(7) Zudem dient Lgr5 als Marker von Stammzellen im Bereich der Kardia(8) und konnte auch in Haarfollikeln, der Brustdrüse und dem Kolon nachgewiesen werden.(10) Lgr5-positive Zellen befinden sich üblicherweise an der Kryptenbasis in der Position 1-4 und werden deshalb auch „crypt base columnar cells“ (CBCs) genannt.(115) Dabei sind sie meist zwischen Paneth-Zellen zu finden.(115) Es wird vermutet, dass diese Paneth-Zellen als Stammzellnische dienen.(111) In deren Nähe werden u.a. Wnt3, Egf und Tgfa sowie die Notch-Liganden DLL1 und DLL4 exprimiert,(115) welche das Vorhandensein von Stammzellen an der Kryptenbasis ermöglichen. Versuche haben ergeben, dass bei Fehlen von Paneth-Zellen die Anzahl an Lgr5-positive Stammzellen und Proliferationsraten drastisch zurückgingen.(111) Barker et al. konnten in einer Studie zeigen, dass Lgr5-positive CBCs alle Kriterien intestinaler Stammzellen erfüllen.(7) Sie sind sehr langlebig, besitzen die Fähigkeit zur Selbst-Erneuerung, sind multipotent und resistent gegenüber Apoptose.(19; 7) Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Lgr5-positive Zellen sich sehr häufig teilen und dadurch einen hohen Zellumsatz haben.(19) Bislang ist man davon ausgegangen, dass sich Stammzellen vor allem in der Position 4 der Krypten befinden und sich nur selten teilen.(105) Eine Hypothese ist daher, dass es zwei Typen von Stammzellen gibt. Zum einen die sich langsam teilenden Stammzellen an Position 4, welche als Reserve dienen könnten. Und zum anderen die sich schnell teilenden Lgr5-positiven CBCs an der Kryptenbasis, welche schneller auf Stimuli reagieren können.(19) Die genauen Mechanismen sind allerdings noch nicht

geklärt. Barker et al. gelang wie oben beschrieben bereits der Nachweis, dass Lgr5 als Stammzellmarker im Darm sowie auch im Magenantrum und der Kardia, nicht jedoch im Magencorpus, dient.(8) Die Rolle von Lgr5-positiven Zellen wurde auch in dem oben beschriebenen L2-IL-1 β -Mausmodell näher untersucht.(98) Hier wurden verschiedene Stammzellmarker getestet, darunter auch Lgr5. Bei Lgr5-Cre-ERT-Mäusen erfolgte die Kombination mit einem Rosa-LacZ-Reporter und daraufhin Induktion mit Tamoxifen. Zudem wurden Gallensäuren zum Trinkwasser zugegeben. Die immunhistochemischen Analysen ergaben im Verlauf von 2, 4 und 6 Monaten nach Tamoxifen-Induktion den Nachweis einer Barrett-Metaplasie mit Lgr5-positiven Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass Lgr5-positive Zellen aus der Kardia in den distalen Ösophagus einwandern und somit möglicherweise auch als Ursprungszelle für einen BE bzw. EAC anzusehen sind.(98) Manche handeln Lgr5 sogar als Marker für Tumorstammzellen (cancer stem cells, CSCs).(14; 139) Aufgrund ihrer erhöhten Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie geht die Präsenz von Lgr5-positive Zellen vermeintlich oft mit einer schlechten Prognose einher.(55) Die Rolle von Lgr5 als Biomarker für den BE wurde auch in einer Studie von Becker et al näher untersucht.(14) In der Studie wurden 81 humane Proben aus Biopsien/Resektaten mit BE/Dysplasie/EAC mittels immunhistochemischer Färbung näher untersucht. Dabei wurde jede Färbung bezüglich Intensität und prozentualem Anteil der positiv gefärbten Krypten begutachtet. Es zeigte sich im Verlauf malignen Progresses eine signifikante Zunahme der Intensität der immunhistochemischen Färbung.(14) Zudem wurde die Prognose über einen Zeitraum von 15 Jahren näher untersucht. Es ergab sich hierbei eine Korrelation zwischen einer erhöhten Lgr5-Expression und einer verminderten Überlebenszeit, unabhängig von dem Tumorstadium oder begleitender (neo-)adjuvanter Therapie.(14) Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Lgr5-positive Zellen als Tumorstammzellen zu werten sind.

In der in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbung mittels Lgr5 ergab sich eine geringe Ausprägung von Lgr5 bei Patienten mit BE. Bei zwei Dritteln der BE-Patienten waren lediglich $\leq 30\%$ der Krypten positiv gefärbt. Bei Patienten mit EAC war Lgr5 jedoch signifikant erhöht (68% in den Gruppen 2 und 3, $p < 0,0001$). In angrenzendem Plattenepithel ließ sich keine Lgr5-Positivität nachweisen. Es bestätigen sich demzufolge die Ergebnisse aus dem L2-IL-1 β -Mausmodell sowie aus der Studie von Becker et al., dass Lgr5 in der Entwicklung zum EAC durchwegs nachweisbar ist und somit als Ursprungszelle des BE bzw. EAC in Frage kommt.(14) Die Intensität der Färbung wurde in dieser Arbeit nicht explizit näher untersucht. Wäre

jedoch anhand dieses Kriteriums wie bei Becker et al. eine Aussage über den prognostischen Verlauf der Erkrankung möglich, so könnte damit auch das Zeitintervall endoskopischer Surveillance-Untersuchungen bzw. das weitere Therapieregime im Allgemeinen entscheidend beeinflusst werden und damit eine wichtige Hilfestellung bei der Prognoseeinschätzung und Wahl der adäquaten Therapie sein.

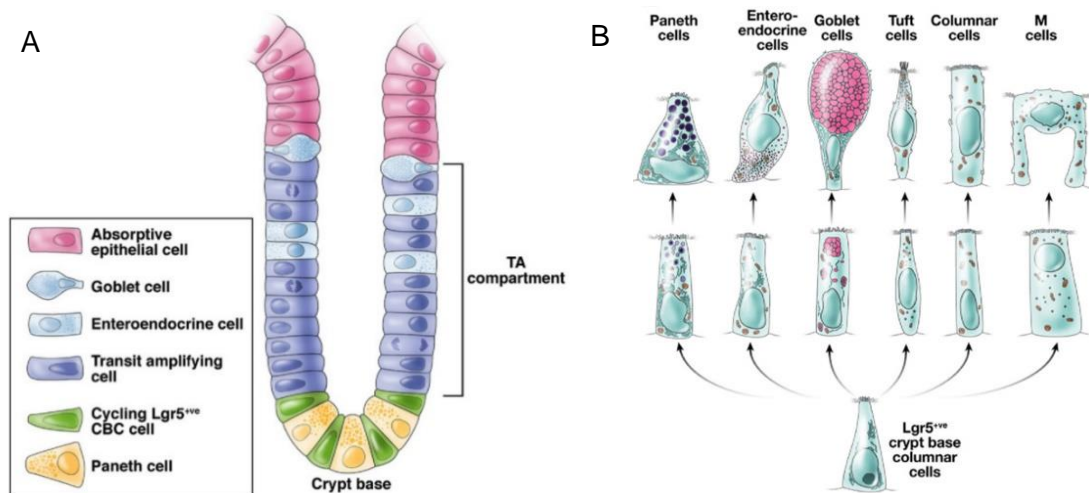


Abbildung 45: Schematische Darstellung der Lokalisation von Lgr5-positiven Zellen im Bereich der Krypte sowie der Darstellung der Differenzierung verschiedener Zelllinien aus Lgr5-positiven Zellen. A) Expression der Lgr5-positiven Zellen (grün) im Bereich der Krypten-Basis (crypt base columnar cells, CBCs) (TA = transit amplifying). B) Differenzierung verschiedener Zelllinien aus Lgr5-positiven Zellen an der Kryptenbasis (7)

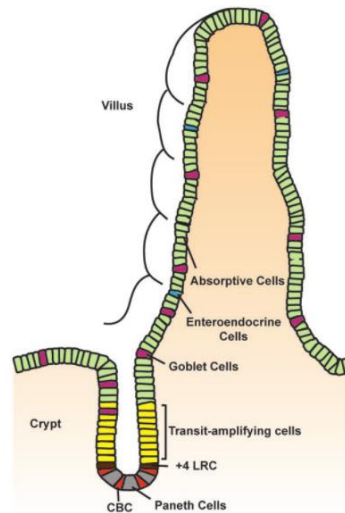


Abbildung 46: Schematische Darstellung der Zellverteilung im Bereich einer Krypte/Villus. Die Stammzellen befinden sich im Bereich der Kryptenbasis. Hier gibt es zum einen die langsam proliferierenden Stammzellen im Bereich der Position +4 (braun) unmittelbar über den Paneth-Zellen (grau). Zum anderen befinden sich die schnell proliferierenden Stammzellen, die so genannten crypt base columnar cells (CBCs) (rot), zwischen den Paneth-Zellen. Dabei dient Lgr5 als Marker der CBCs. Diese können sich zu so genannten Transit amplifying cells (TA cells) (gelb) entwickeln. Hieraus wiederum kann es zur Differenzierung von vier verschiedenen Zelllinien kommen: Paneth-Zellen (grau), enteroendokrine Zellen (blau), Becherzellen (pink) und Enterozyten (grün) (48)

4.1.4 Rolle von Dclk1 bei Patienten mit BE/EAC

Neben Lgr5 werden auch weitere mögliche Stammzellmarker bei der Entstehung eines EAC diskutiert. Dazu gehört auch Dclk1 (Doublecortin and CaM Kinase-Like 1). Dass Dclk1-positive Zellen z.B. im Kolon eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Stammzellnische spielen, konnte 2014 in einer Studie von Westphalen et al. demonstriert werden. In den Versuchen wurde gezeigt, dass durch Verlust von Dclk1-positiven Zellen eine Regeneration von geschädigtem Gewebe z.B. im Rahmen einer Kolitis nur eingeschränkt möglich war. Dclk1 scheint also eine wichtige Rolle im Rahmen der Aufrechterhaltung und Beeinflussung der Stammzellnische und damit auch der Stammzellproliferation zu spielen.(143) In einer weiteren Studie

konnte das Vorhandensein von Dclk1-positiven Zellen im Isthmusbereich von Magendrüsen belegt werden, wobei in diesem Bereich in der Regel ruhende multipotente Stammzellen zu vermuten sind.(44) Zudem gelang der Nachweis von Dclk1-positiven Zellen im Darmepithel. Dabei stellten sich diese Zellen in der Position +4 der Krypten dar, wo normalerweise Stammzellen lokalisiert sind.(76) In einer Studie von May et al. wurden Mäusen Dclk1-positive Zellen injiziert.(77) An der Injektionsstelle stellte sich nach drei Wochen eine knotige Raumforderung dar. In der histologischen Aufarbeitung der Raumforderung ergab sich der Nachweis von Drüsengewebe. Die immunhistochemische Färbung mit dem Stammzell-Marker Msi-1 fiel positiv aus, sodass davon auszugehen ist, dass es sich bei den Dclk1-positiven Zellen um Stammzellen handelt. Einige der Zellen exprimierten sogar Math1, ein Hinweis dafür, dass es sich um eine intestinale sekretorische Zelllinie handelt und dass diese Zellen pluripotent sind.(77) In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Zahl und Verteilung von Dclk1-positiven Zellen beinahe der von proliferativen Zellen 24 Stunden nach Mukosaschaden entspricht.(67) Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Dclk1-positive Zellen Stamm- bzw. Vorläuferzellen sind, aus welchen sich proliferative Zellen entwickeln können.

Dclk1 spielt auch in Bezug auf den Barrett-Ösophagus eine wichtige Rolle. So wurde im oben genannten L2-IL-1 β -Mausmodell eine erhöhte Expression von Dclk1 im Barrett-Ösophagus nachgewiesen.(98) Dclk1-positive Zellen fanden sich hier vor allem im Bereich der Kardie und speziell am gastroösophagealen Übergang. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass der BE durch Migration aus Zellen aus der Kardie entsteht. Bei den L2-IL-1 β -Mäusen korrelierte die Zunahme der Dclk1-positiven Zellen mit der Entwicklung eines BE. Mit zunehmender Dysplasie war die Anzahl der Dclk1-positiven Zellen jedoch wieder regredient.(98) Auch in den humanen Proben konnten mittels RT-PCR im BE gleichermaßen signifikant mehr Dclk1-positive Zellen nachgewiesen werden als im normalen ösophagealen Plattenepithel.(98) Jedoch war auch hier die Expression von Dclk1 mit zunehmendem Dysplasiegrad bzw. Entwicklung eines EAC regredient.(98) Auch eine weitere Studie zeigte eine vermehrte Expression von Dclk1 im BE bzw. EAC.(137) Eine Dclk1-Expression während des Progresses des Barrett-Ösophagus zum EAC zeigte sich demzufolge sowohl im Stroma, Epithel, dem angrenzenden Plattenepithel als auch im Endothel von Blutgefäßen.(137) In Untersuchungen mit RT-PCR wurde beim BE im Vergleich zu normalem Epithel vermehrt Dclk1-mRNA beobachtet,(137) was ein weiterer Hinweis auf die tragende Rolle von Dclk1 bei der Entstehung des BE bzw. EAC ist.

In der Auswertung der immunhistochemischen Färbung mittels Dclk1 finden sich beim BE in 84% der Fälle weniger als 30% der Krypten positiv gefärbt. Beim EAC hingegen sind in 67% der Fälle mehr als 30% der Krypten positiv gefärbt. Dies zeigt, dass Dclk1 bei der Entwicklung eines BE bzw. EAC durchaus eine tragende Rolle zukommt. In dieser Arbeit wurde der Anteil der positiv gefärbten Krypten jedoch nur bei Vorliegen eines BE bzw. EAC untersucht und nicht weiter zwischen den Dysplasiegraden unterschieden. In der Publikation von Schellnegger et al., für welche diese Arbeit als Basis diente, zeigte sich unter Berücksichtigung eines Tumorscores hingegen, dass Dclk1 mit zunehmendem Dysplasie-Grad immer geringer ausgeprägt ist.(114) Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Dclk1 eher als Marker für eine beginnende Dysplasie zu werten ist. In Zukunft könnte also in der histopathologischen Auswertung auch der Zusammenhang zwischen der Anzahl der Dclk1-positiven Zellen und dem Dysplasiegrad untersucht werden, was Dclk1 durchaus zu einem interessanten Marker im Hinblick auf Verlauf und Prognose einer Barrett-Erkrankung macht. Eine weitere Studie von Houchen et al. untersuchte die Konzentration von Dclk1 im Serum von Patienten.(144) Es konnte gezeigt werden, dass anhand der Serumkonzentration von Dclk1 eindeutig zwischen einer Dysplasie und einem EAC unterschieden werden kann. Auch wenn hier noch weiterer Forschungsbedarf besteht, wäre dies ein sehr einfaches Mittel, anhand von immunhistochemischer Untersuchung in Kombination mit einer Blutuntersuchung eine Aussage über die Prognose eines BE machen zu können. Dies hätte einen wesentlichen Einfluss auf die weiteren Surveillance-Untersuchungen und das weitere Therapieprocedere im Generellen.

4.1.5 Rolle von TFF2 bei Patienten mit BE/EAC

TFF2 wird als Marker von Progenitorzellen gehandelt und spielt wie oben beschrieben u.a. bei der Reparatur von Epithelschädigung und bei der Entwicklung des Magenkarzinoms eine wichtige Rolle. Daher ist auch die Funktion von TFF2 im Rahmen der Genese eines BE bzw. EAC von großem Interesse. In einer Studie von Quante et al. wurde die Rolle von TFF2 als Marker für Progenitorzellen des Magens näher untersucht. Die Stammzellen des Magens befinden sich üblicherweise im Isthmusbereich der Magendrüsen.(102) Die Studie ergab, dass Nebenzellen, welche TFF2 produzieren, sich jedoch unterhalb dieses Bereichs befinden.(100) TFF2 mRNA hingegen wurde im Isthmusbereich, also über den Nebenzellen, und damit in der

Stammzellregion, nachgewiesen. Diese TFF2-mRNA-haltigen Zellen werden auch als TTEs (TFF2 mRNA transcript-expressing cells) bezeichnet. TTEs wandern zur Basis der Drüsen und können zu Neben-, Haupt- und Parietalzellen differenzieren. Die aus dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse unterstützen somit die Theorie, dass TTEs als Progenitorzellen angesehen werden können und TFF2 als Marker dafür genutzt werden könnte.(100)

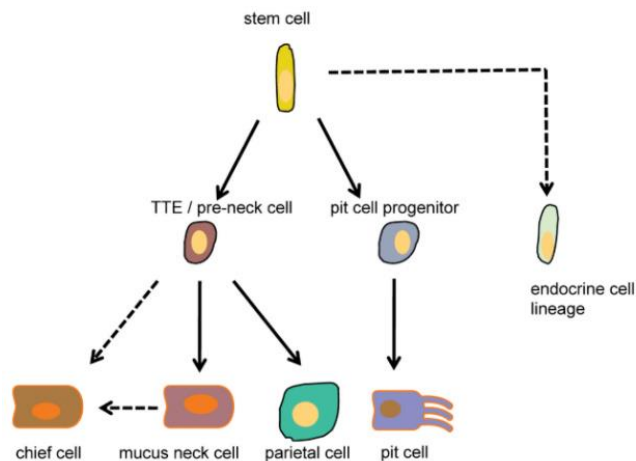


Abbildung 47: Die TTE als gemeinsame Vorläuferzelle für Hauptzellen, Nebenzellen und Parietalzellen, nicht jedoch für Bürstenzellen (100)

Die Proteine der TFF-Familie spielen nach bisherigen Erkenntnissen zudem eine wichtige Rolle beim Heilungsprozess nach Mukosaschäden.(122) Die Reparatur des Gewebes setzt schon wenige Minuten nach Schädigung des Epithels ein. Man unterscheidet eine kurzfristige Reparatur („Restitution“) von einer langfristigen Reparatur („Re-Epithelialisierung“).(122) Dies geschieht über mehrere Schritte. Zunächst werden Zell-Zell-Kontakte gelöst. Anschließend kommt es zur Migration von Zellen in das geschädigte Areal, Verhinderung von Apoptose und schließlich zur Wiederherstellung von Zell-Zell-Kontakten und damit der Barrierefunktion des Epithels.(57) Dabei ist neben TFFs auch ein komplexes Netzwerk zahlreicher anderer regulatorischer Peptide aktiv, wie zum Beispiel EGF, TGF, IL-1 β oder IL-8.(94; 25) Mittels Lineage tracing wurde bereits im Vorfeld gezeigt, dass TFF2 als Marker für Vorläuferzellen des Magens gilt.(100) In dem L2-IL-1 β -Mausmodell konnte schließlich nachgewiesen werden, dass im Bereich eines BE eine erhöhte Expression von TFF2 vorliegt.(98) Im Gegensatz dazu stellte sich im Plattenepithel des Ösophagus keine entsprechende Färbung dar, was für die selektive Detektion des BE spricht. Dabei

scheint es so zu sein, dass TFF2 vor allem im BE und weniger in dysplastischen Arealen bzw. im Bereich eines EAC vermehrt exprimiert wird, dass also eine inverse Beziehung zwischen der TFF2-Expression und dem Karzinomrisiko besteht.(98)

Die Ergebnisse decken sich auch mit der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse. Bei Patienten mit BE waren signifikant mehr Krypten positiv auf TFF2 gefärbt als bei Patienten mit EAC ($p < 0,0001$). In der BE-Gruppe hatten 82% der Patienten mehr als 25% positiv gefärbte Krypten. In der EAC-Gruppe hingegen waren bei 75% der Patienten weniger als 25% der Krypten positiv gefärbt. Im angrenzenden Plattenepithel war keine Färbung nachweisbar. TFF2-positive Zellen sind also mit zunehmendem Malignitätsgrad immer weniger vertreten. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie der inversen Assoziation von TFF2 und dem Malignitätsrisiko. Somit wäre anzunehmen, dass das Karzinomrisiko im Falle einer geringen Expression von TFF2 deutlich erhöht ist. TFF2 könnte also als frühzeitiger Marker eingesetzt werden. Bei im Verlauf verminderter Expression von TFF2 könnte dementsprechend früh eine endoskopische bzw. chirurgische Therapie eingeleitet werden.

4.2 Diskussion der Ursprungszelle des BE/EAC

Es existieren zahlreiche Studien, die sich mit dem Thema der Ursprungszelle des Barrett-Ösophagus bzw. des EAC beschäftigen. Dabei gibt es unterschiedliche Modelle, welche weiter oben bereits kurz angeschnitten wurden (Kapitel 1.2). Im folgenden Abschnitt sollen diese Modelle nochmals diskutiert werden.

Eine Theorie folgt dem Ansatz, dass der Barrett-Ösophagus durch eine Transdifferenzierung des originären ösophagealen Plattenepithels entsteht.(38) Transdifferenzierung bedeutet, dass sich eine bereits ausdifferenzierte Zelle zu einem anderen Zelltyp differenziert.(38) Dies kann z.B. im Rahmen von Aktivierung oder Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren geschehen.(32) Im Falle des Barrett-Ösophagus kommt es demnach zur Transdifferenzierung einer reifen Plattenepithelzelle des Ösophagus zu einer Zylinderepithelzelle.(138) Diese Theorie konnte anhand eines Mausmodells demonstriert werden. Normalerweise entsteht der Ösophagus während der Embryonalentwicklung zunächst aus Zylinderepithel, welches sich im Lauf der 18. Woche in Plattenepithel umwandelt.(81) Daraus könnte man ableiten, dass sich die Zellen der basalen Schicht des plattenepithelialen Ösophagus direkt von Zylinderepithelzellen ableiten. Beim Erwachsenen könnte man demzufolge vermuten, dass der Barrett-Ösophagus sozusagen durch reverse Transdifferenzierung, also durch Re-Umwandlung des Plattenepithels zu Zylinderepithel, entsteht.(38) Als Auslöser gelten unter anderem Umweltreize wie z.B. der Reflux von saurem Mageninhalt. Allerdings ist bewiesen, dass sich z.B. nach therapeutischer kompletter Ablation eines Barrett-Ösophagus erneut ein Plattenepithel entwickeln kann, was dieser Theorie demzufolge widerspricht.(6)

Eine andere, von den meisten Forschern favorisierte Theorie ist, dass der Barrett-Ösophagus nicht durch Transdifferenzierung entsteht, sondern sich aus Stammzellen entwickelt. Jedoch herrscht bislang keine Einigkeit darüber, welche Stammzellen hierfür als Ursprungszelle dienen. Laut dem aktuellen Forschungsstand kommen dabei verschiedene Möglichkeiten in Frage. Eine Theorie ist, dass diese Stammzellen dem Ösophagus entspringen. Dabei kann es sich zum einen um plattenepitheliale Stammzellen handeln,(1) welche in der basalen Epithelschicht zwischen den Papillen liegen.(116) Zum anderen wird die Meinung vertreten, dass die Stammzellen aus dem Halsbereich von submukösen Drüsen des Ösophagus stammen.(38) Durch einen Mukosaschaden, z.B. durch anhaltenden Reflux, kommt es zur Aktivierung dieser plattenepithelialen bzw. submukösen Stammzellen. Die genauen Mechanismen sind

allerdings nicht geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass es durch den Gewebeschaden zu einer „Fehlprogrammierung“ der Stammzellen kommt, die in der Entstehung eines Barrett-Ösophagus resultiert („trans-commitment“).(1)

Andere Forschergruppen sind der Meinung, dass es sich bei der Ursprungszelle des Barrett-Ösophagus um Stammzellen aus dem Knochenmark, sogenannte „bone marrow derived stem cells“, handelt.(110; 60) Sarosi et al. führten diesbezüglich 2008 eine Studie an Ratten durch.(110) Dabei erhielten weibliche Ratten nach Verabreichung einer tödlichen Bestrahlungsdosis eine Transplantation von Knochenmark-Stammzellen männlicher Ratten. Diese Stammzellen konnten im Verlauf anhand des Y-Chromosoms sicher von denen der weiblichen Ratten unterschieden werden. Die weiblichen Ratten erhielten eine Ösophagojejunostomie, wodurch es zu verstärktem Reflux und zur Entwicklung einer intestinalen Metaplasie kam. Mittels FISH-Analyse konnte in knapp der Hälfte der plattenepithelialen Zellen ein Y-Chromosom, und damit die Abstammung von den männlichen Ratten nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse konnten in einer weiteren Studie demonstriert werden, als bei einer männlichen Maus nach Transplantation von Knochenmark-Stammzellen eines Weibchens eben diese Zellen im Bereich eines EAC nachgewiesen werden konnten.(138) Allerdings handelt es sich hierbei nur um einen Nachweis am Tier-Modell. Inwieweit diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind und ob die Stammzellen aus dem Knochenmark tatsächlich maßgeblich an der Entwicklung eines Barrett-Ösophagus beteiligt sind, bleibt noch zu klären.

Ein weiteres Modell besagt, dass der Barrett-Ösophagus durch Migration von Stammzellen aus dem gastroösophagealen Übergang bzw. der Kardia entsteht.(98) Durch den anhaltenden Reflux von saurem Mageninhalt und Gallensäuren kann es durch oxidativen Stress zur Bildung freier Radikale, und damit zu DNA-Schäden kommen.(46) Andererseits entstehen durch das saure Refluat Entzündungsreaktionen und Mikrotraumata der Schleimhaut. Dies bewirkt die Ausschüttung von Signalmolekülen (z.B. Zytokine), um die Wundheilung zu initiieren. In dem o.g. L2-IL-1 β -Mausmodell zeigte sich, dass durch die vermehrte Ausschüttung von IL1 β und IL6 Stammzellen aktiviert werden, um den entstandenen Mukosadefekt zu beheben.(97) Des Weiteren konnte belegt werden, dass Lgr5-positive Zellen als Stammzellen im Bereich der Kardia fungieren.(97) In dem L2-IL-1 β -Mausmodell konnten bei der immunhistochemischen Aufarbeitung ebenfalls Lgr5-positive Zellen im BE nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass Lgr5-positive Zellen aus der Kardia möglicherweise als Ursprungszellen für den BE und damit auch das EAC in Frage kommen. Es stellte sich außerdem eine vermehrte Expression von Krt19 und TFF2

dar, welche beide u.a. als Marker für Progenitorzellen des Magens gelten.(97) Diese beiden Marker sind normalerweise nicht im ösophagealen Plattenepithel nachweisbar. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Ursprungszelle des BE nicht aus dem ösophagealen Plattenepithel stammt, sondern von Stammzellen aus der Kardialia. Bislang konnte, außer durch gezielte Veränderung der Transkriptionsfaktoren, weder im Mausmodell, noch am Menschen eine De-Differenzierung einer bereits differenzierten Zelle nachgewiesen werden.(97) Dies unterstützt die Theorie, dass es sich bei den Stammzellen aus der Kardialia, welche auf die Ausbildung eines Zylinderepithels programmiert sind, um die Ursprungszellen des BE handelt. In einer anderen Arbeit konnte belegt werden, dass Stammzellen aus dem Bereich des gastroösophagealen Übergangs als Ursprungszellen des BE in Frage kommen.(98) In der Studie kam es bei p63-Knockout-Mäusen zu einer raschen Entwicklung einer intestinalen Metaplasie, welche von Seiten der Genexpression dem BE sehr ähnlich ist. p63 gilt als wichtiger Regulator bei der Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation mehrschichtiger Epithelien, wie z.B. dem Ösophagus.(138) Als Ursprungszellen konnten dabei embryogene Vorläuferzellen identifiziert werden, welche nach der Geburt normalerweise ausschließlich am gastroösophagealen Übergang zu finden sind.(138)

Letztendlich lässt sich jedoch sagen, dass die meisten Theorien auf Tiermodellen aufbauen und noch keine dieser Stammzellen am Menschen zweifelsfrei als Ursprungszelle des BE identifiziert werden konnte. Möglicherweise entsteht der BE auch durch ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren und Zellen – es bleiben also weiter viele Fragen offen.

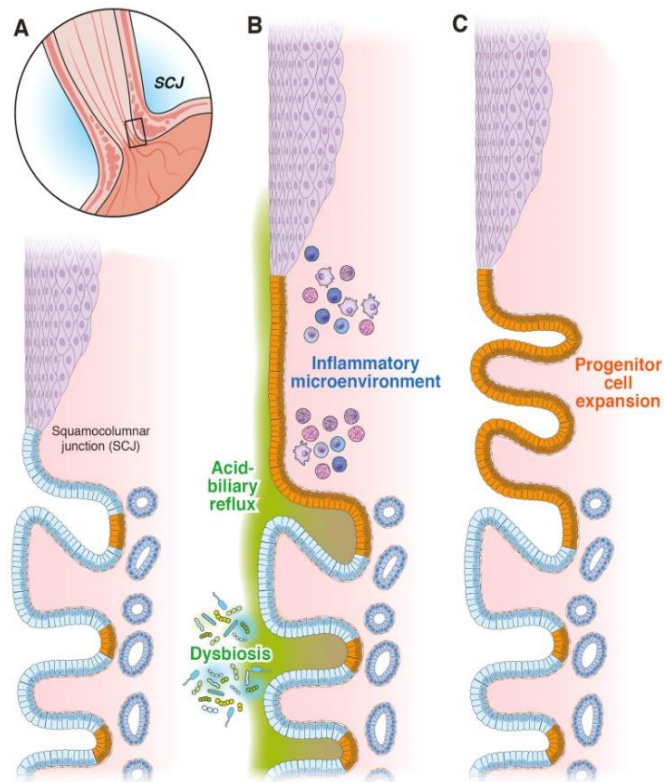


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Entwicklung eines BE. Durch eine im Ösophagus hervorgerufene Entzündungsreaktion kommt es zur Migration von zylinderepithelialen Vorläuferzellen aus dem proximalen Magen in den Ösophagus. (A) Im originären Ösophagus entspricht der Übergang von Plattenepithel zu Zylinderepithel (squamocolumnar junction, SCJ) dem anatomischen Übergang von Ösophagus zu Magen (gastroösophagealer Übergang). In orange sind Stammzellen im proximalen Magen dargestellt. (B) Durch galligen Reflux, zusammen mit einem gestörten Gleichgewicht im Bereich der Stammzellnische, kommt es zur Expansion von zylinderepithelialen Vorläuferzellen in Richtung Ösophagus. Das neu entstandene Epithel ähnelt hierbei vom histologischen Erscheinungsbild dem des proximalen Magens. (C) Im Laufe der Zeit entwickelt sich aus dem Übergangsepithel ein Zylinderepithel mit zunehmender Expression von schleimbildenden Zellen.(99)

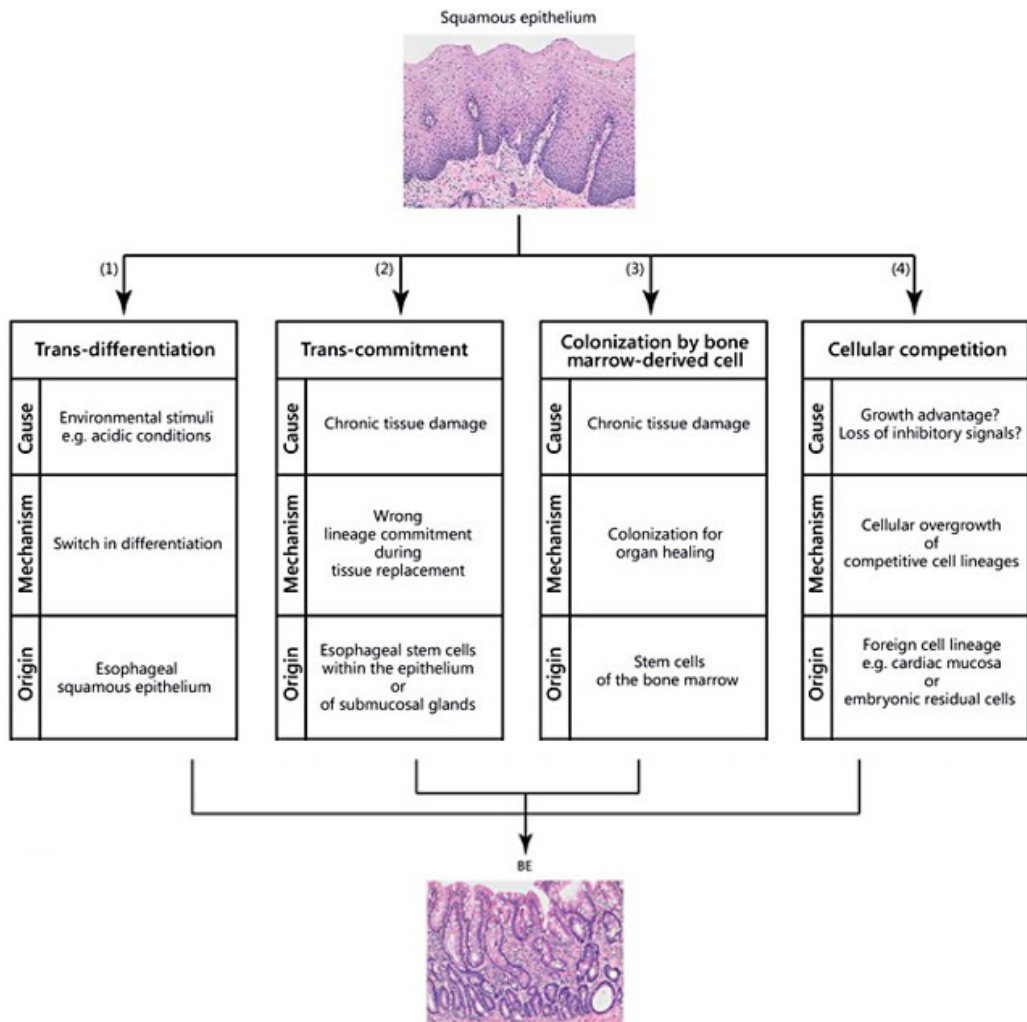


Abbildung 49: Überblick über die verschiedenen Modelle zur Ursprungszelle des BE bzw. EAC (modifiziert nach Ahrens et al. (1))

5 Zusammenfassung

Die Inzidenz des Barrett-Karzinoms ist in den letzten Jahrzehnten rapide angestiegen. Die genaue Ursache hierfür ist bislang nicht geklärt. Durch Reflux von saurem Mageninhalt bzw. galligem Reflux in den Ösophagus wird dort eine Entzündungsreaktion hervorgerufen. Dadurch kann es durch Umwandlung des originalen Plattenepithels zur Ausbildung einer Metaplasie kommen, dem so genannten Barrett-Ösophagus.⁽⁹⁹⁾ Im Verlauf kann sich hieraus über die Zwischenstufen einer IglEN bzw. hgIEN ein EAC entwickeln. Bezüglich der genauen molekulargenetischen Entstehung sowie Identifizierung der Ursprungszelle des BE sind allerdings noch viele Fragen offen. Nach aktuellem Forschungsstand kommen wie oben beschrieben neben dem Transdifferenzierungsmodell verschiedene Stammzellen als Ursprungszelle eines EAC in Frage (vgl. Kapitel 4.2.).⁽³²⁾ Dazu gehören unter anderem Stammzellen aus dem Plattenepithel sowie submukösen Drüsen des Ösophagus.^(38; 1) Außerdem wird die Rolle von Stammzellen aus dem Knochenmark (bone-marrow derived stem-cells) ^(110; 60) sowie aus dem Bereich des gastroösophagealen Übergangs bzw. der Kardia diskutiert.⁽⁹⁸⁾ Meist proliferieren diese Stammzellen nur langsam, was es schwierig macht, einen entsprechenden Marker dafür zu finden. Normalerweise ruhen gewebespezifische Stammzellen im Bereich ihrer Stammzellnischen.⁽⁹⁷⁾ Dieses Mikromilieu kann durch anhaltende Noxen empfindlich gestört werden. Es kann zu einer genomischen Instabilität kommen, was schließlich in der Entstehung eines EAC resultieren kann.⁽⁹⁹⁾ Die Aktivierung der Stammzellen und damit deren Proliferation und Differenzierung wird durch verschiedene Signalwege gesteuert. Über den Wnt-Signalweg wird z.B. die Expression von Cdx1, Cdx2, Math1 und Sox9 gesteuert.⁽³²⁾ Durch Aktivierung des NFκB-Signalweges erfolgt ebenso die vermehrte Expression von Cdx1 und Cdx2. Der Notch-Signalweg wiederum reguliert zum einen die Expression von Math1 und interagiert ebenso mit Cdx2.⁽³²⁾ Dies sind nur Beispiele für das enge Zusammenspiel der einzelnen Signalwege, wobei es eine große Herausforderung bleibt, die molekulargenetischen Zusammenhänge vollständig zu entschlüsseln.

Von den zahlreichen zur Prognosebestimmung des BE entwickelten Biomarkern konnte bislang keiner vollends im klinischen Alltag etabliert werden. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass durch Kombination verschiedener immunhistochemischer Marker (GC-Ratio, Notch1, Lgr5, Dcl1, TFF2) eine bessere Einschätzung der Prognose gelingen kann. Demzufolge sinkt z.B. die Anzahl der Becherzellen mit zunehmendem Dysplasie-Grad. Die GC-Ratio wäre somit ein Kriterium, anhand dessen zwischen

einem BE ohne Dysplasie und einem BE mit zunehmender Dysplasie unterschieden werden kann. Ebenso waren TFF2-positive Zellen mit zunehmendem Malignitätsgrad immer weniger vertreten, es besteht also eine inverse Korrelation zwischen der TFF2-Expression und dem Karzinomrisiko. Laut der Studie von Schellnegger et al. ist auch die Expression von Dclk1 mit zunehmendem Dysplasie-Grad immer geringer ausgeprägt.(114) Dclk1 könnte also als Marker etabliert werden, um eine beginnende Dysplasie zu detektieren. Lgr5 hingegen stellt sich im Verlaufe der Entwicklung eines EAC mit zunehmender Intensität dar, wobei eine erhöhte Lgr5-Expression mit einer verminderten Überlebenszeit einhergeht.(14) Die immunhistochemische Färbung von Notch1 und Lgr5 war aufgrund technischer Schwierigkeiten in dieser Arbeit nur eingeschränkt beurteilbar. Es zeigte sich allerdings in einer Studie von Quante et al., dass eine gesteigerte Expression von Notch1 mit einer verminderten Zahl an Becherzellen einhergeht und dass dementsprechend beim EAC eine erhöhte Notch-Expression besteht.(98) Hier könnte über den Einsatz eines γ -Secretase-Inhibitors der Progress des BE zum EAC zumindest verzögert werden.

Die bei Diagnose eines BE bisher durchgeführten Surveillance-Endoskopien sind für die Patienten sehr belastend. Sie unterliegen zudem einer hohen Intra- und Interobserver-Varianz und sind nicht zuletzt sehr zeitaufwendig und kostspielig. Durch Einsatz der o.g. immunhistochemischen Marker könnten Patienten, bei denen ein erhöhtes Risiko für einen Krankheitsprogress besteht, gezielter in Surveillance-Endoskopien eingeschlossen werden. Des Weiteren könnte bei Hinweisen auf einen Progress des BE zum EAC frühzeitig eine endoskopische bzw. chirurgische Therapie eingeleitet und somit die Prognose deutlich verbessert werden. Es bleibt jedoch zu sagen, dass die Diagnosekriterien und damit auch die Einschlusskriterien in die Surveillance-Endoskopien insgesamt kritisch hinterfragt werden müssen, da weiterhin Uneinigkeit über die genaue Definition des Barrett-Ösophagus besteht. In Deutschland und den USA ist bislang das Vorliegen einer intestinalen Metaplasie mit Becherzellen erforderlich, im Gegensatz zu z.B. England und Japan.(140; 132) Mehrere Studien haben jedoch mittlerweile ergeben, dass sich ein BE auch auf dem Boden eines metaplastischen Epithels ohne Becherzellen entwickeln kann.(65; 130) Diesbezüglich besteht also dringend weiterer Forschungsbedarf, um endlich eine klare Richtlinie in der Diagnosestellung und ein einheitliches Procedere bezüglich der Surveillance-Endoskopien und Therapiemöglichkeiten zu gewährleisten.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Steigende Inzidenz des Adenokarzinoms des Ösophagus	S. 8
Abbildung 2:	Epidemiologie des EAC	S. 9
Abbildung 3:	Auswahl an Risikofaktoren bei der Entwicklung des EAC	S. 9
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der möglichen Ursprungszellen des Barrett-Ösophagus	S. 10
Abbildung 5/6:	Norman Rupert Barrett (1903–1979)	S. 14
Abbildung 7:	histologisches Bild einer GERD	S. 15
Abbildung 8:	Orientierung anhand endoskopischer Leitstrukturen zur Unterscheidung zwischen dem originären Ösophagus und einem Barrett-Ösophagus	S. 17
Abbildung 9:	histologisches Bild eines BE	S. 18
Abbildung 10:	histologisches Bild einer IgIEN	S. 20
Abbildung 11:	histologisches Bild einer hgIEN	S. 21
Abbildung 12:	Klassifikation der Adenokarzinome des gastro-ösophagealen Übergangs nach Siewert (AEG I-III)	S. 22
Abbildung 13:	histologisches Bild eines EAC	S. 24
Abbildung 14:	Modell der Surveillance-Endoskopien	S. 26
Abbildung 15:	Therapie des Ösophaguskarzinoms in lokal begrenztem und in lokal fortgeschrittenem bzw. metastasiertem Stadium	S. 31
Abbildung 16:	Der Notch-Signalweg	S. 35
Abbildung 17:	Der Notch-Signalweg hat großen Einfluss auf die Proliferation und Aufrechterhaltung der Stammzellpopulation	S. 35
Abbildung 18:	Der Wnt-Signalweg in Stammzellen	S. 37
Abbildung 19:	Familie der Trefoil-Peptide	S. 39
Abbildung 20:	Geschlechterverteilung bei Patienten mit BE bzw. EAC	S. 49
Abbildung 21:	Altersverteilung bei Patienten mit BE	S. 49
Abbildung 22:	Altersverteilung bei Patienten mit EAC	S. 49
Abbildung 23:	BE mit spezialisierter intestinaler Metaplasie mit Becherzellen	S. 50
Abbildung 24:	histologisches Bild eines EAC	S. 51
Abbildung 25:	Graphische Boxplot-Darstellung der Becherzell-dichte (GC-Ratio) bei Patienten mit BE bzw. EAC	S. 51
Abbildung 26:	logistische Regressionsanalyse der GC-Ratio (altersadaptierte Darstellung)	S. 52
Abbildung 27:	Notch-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines BE	S. 52
Abbildung 28:	Notch-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines EAC	S. 53

Abbildung 29:	Einteilung nach Prozent der Notch1-positiv gefärbten Krypten	S. 53
Abbildung 30:	Logistische Regressionsanalyse von Notch1 (altersadaptierte Darstellung)	S. 54
Abbildung 31:	Lgr5-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines BE	S. 54
Abbildung 32:	Lgr5-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines EAC	S. 55
Abbildung 33:	Einteilung nach Prozent der Lgr5-positiv gefärbten Krypten	S. 55
Abbildung 34:	Logistische Regressionsanalyse von Lgr5 (altersadaptierte Darstellung)	S. 56
Abbildung 35:	Dclk1-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines BE	S. 56
Abbildung 36:	Dclk1-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines EAC	S. 57
Abbildung 37:	Einteilung nach Prozent der Dclk1-positiv gefärbten Krypten	S. 57
Abbildung 38:	Logistische Regressionsanalyse von Dclk1 (altersadaptierte Darstellung)	S. 58
Abbildung 39:	TFF2-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines BE	S. 58
Abbildung 40:	TFF2-positiv gefärbte Zellen im Bereich eines EAC	S. 59
Abbildung 41:	Einteilung nach Prozent der TFF2-positiv gefärbten Krypten	S. 59
Abbildung 42:	Logistische Regressionsanalyse von TFF2 (altersadaptierte Darstellung)	S. 60
Abbildung 43:	logistisches Regressionsmodell der Marker GC-Ratio, Dclk1 und TFF2	S. 61
Abbildung 44:	Interaktion von Notch, Atoh1 und Hes1	S. 67
Abbildung 45:	Schematische Darstellung der Lokalisation von Lgr5-positiven Zellen im Bereich der Krypte sowie der Darstellung der Differenzierung verschiedener Zelllinien aus Lgr5-positiven Zellen	S. 70
Abbildung 46:	Schematische Darstellung der Zellverteilung im Bereich einer Krypte/Villus	S. 71
Abbildung 47:	Die TTE als gemeinsame Vorläuferzelle für Haupt-, Neben- und Parietalzellen	S. 74
Abbildung 48:	Schematische Darstellung der Entwicklung eines BE	S. 79
Abbildung 49:	Überblick über die verschiedenen Modelle zur Ursprungszelle des BE bzw. EAC	S. 80

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TNM-Klassifikation des Ösophagus-Ca	S. 23
Tabelle 2:	Kategorisierung der immunhistochemischen Marker nach Anteil der positiv gefärbten Krypten (Prozent)	S. 42
Tabelle 3:	Altersdurchschnitt und Geschlechterverteilung bei Patienten mit BE bzw. EAC	S. 48
Tabelle 4:	Kombinierte logistische Regressionsmodelle	S. 62

8 Literaturverzeichnis

1. Ahrens TD, Lutz L, Lassmann S and Werner M (2017). "Turning Skyscrapers into Town Houses: Insights into Barrett's Esophagus." Pathobiology **84**(2): 87-98.
2. Ali N, Allam H, May R, Sureban SM, Bronze MS, Bader T, Umar S, Anant S and Houchen CW (2011). "Hepatitis C virus-induced cancer stem cell-like signatures in cell culture and murine tumor xenografts." J Virol **85**(23): 12292-12303.
3. Alison MR, Chinery R, Poulson R, Ashwood P, Longcroft JM and Wright NA (1995). "Experimental ulceration leads to sequential expression of spasmolytic polypeptide, intestinal trefoil factor, epidermal growth factor and transforming growth factor alpha mRNAs in rat stomach." J Pathol **175**(4): 405-414.
4. Allison PR and Johnstone AS (1953). "The Oesophagus Lined with Gastric Mucous Membrane." Thorax **8**(2): 87-101.
5. Bajaj J, Maliekal TT, Vivien E, Pattabiraman C, Srivastava S, Krishnamurthy H, Giri V, Subramanyam D and Krishna S (2011). "Notch signaling in CD66+ cells drives the progression of human cervical cancers." Cancer Res **71**(14): 4888-4897.
6. Barham CP, Jones RL, Biddlestone LR, Hardwick RH, Shepherd NA and Barr H (1997). "Photothermal laser ablation of Barrett's oesophagus: endoscopic and histological evidence of squamous re-epithelialisation." Gut **41**(3): 281-284.
7. Barker N and Clevers H (2010). "Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells." Gastroenterology **138**(5): 1681-1696.
8. Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S, Korving J, Abo A, Peters PJ, Wright N, Poulson R and Clevers H (2010). "Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro." Cell Stem Cell **6**(1): 25-36.
9. Barker N, Tan S and Clevers H (2013). "Lgr proteins in epithelial stem cell biology." Development **140**(12): 2484-2494.
10. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ and Clevers H (2007). "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5." Nature **449**(7165): 1003-1007.
11. Barrett NR (1950). "Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'." Br J Surg **38**(150): 175-182.
12. Bauer R, Laney A, Smith R, Gerfen J, Morrisette J, Woyciechowski S, Garbarini J, Loomes K, Krantz I, Urban Z, Gelb B, Goldmuntz E and Spinner N (2010). "Jagged1 (JAG1) mutations in patients with tetralogy of fallot or pulmonic stenosis." Hum Mutat **31**(5): 594-601.
13. Becker L, Huang Q and Mashimo H (2008). "Immunostaining of Lgr5, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue." ScientificWorldJournal **8**: 1168-1176.
14. Becker L, Huang Q and Mashimo H (2010). "Lgr5, an intestinal stem cell marker, is abnormally expressed in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma." Dis Esophagus **23**(2): 168-174.
15. Behrens A, Pech O, Graupe F, May A, Lorenz D and Ell C (2011). "Barrett's adenocarcinoma of the esophagus: better outcomes through new methods of diagnosis and treatment." Dtsch Arztebl Int **108**(18): 313-319.
16. Bittinger M, Geißler B, Probst A, Messman H. (2015). "S2k-Leitlinie Gastroösophageale Refluxkrankheit." Bayer Arztebl **2015**(10): 488-495.
17. Borgegard T, Gustavsson S, Nilsson C, Parpal S, Klintonberg R, Berg AL, Rosqvist S, Serneels L, Svensson S, Olsson F, Jin S, Yan H, Wanngren J, Jureus A, Ridderstad-Wollberg A, Wollberg P, Stockling K, Karlstrom H, Malmberg A, Lund J, Arvidsson PI, De Strooper B, Lendahl U and Lundkvist J (2012). "Alzheimer's Disease: Presenilin 2-Sparing -

- Secretase Inhibition Is a Tolerable A Peptide-Lowering Strategy." J Neurosci **32**(48): 17297-17305.
18. Boshier LH and Taylor FH (1951). "Heterotopic gastric mucosa in the esophagus with ulceration and stricture formation." J Thorac Surg **21**(3): 306-312.
 19. Brabletz S, Schmalhofer O and Brabletz T (2009). "Gastrointestinal stem cells in development and cancer." J Pathol **217**(2): 307-317.
 20. Burgess JN, Payne WS, Andersen HA, Weiland LH and Carlson HC (1971). "Barrett esophagus: the columnar-epithelial-lined lower esophagus." Mayo Clin Proc **46**(11): 728-734.
 21. Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A and Liu Q (2011). "R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling." Proc Natl Acad Sci USA **108**(28): 11452-11457.
 22. Castillo D, Puig S, Iglesias M, Seoane A, de Bolós C, Munitiz V, Parrilla P, Comerma L, Poulson R, Krishnadath KK, Grande L and Pera M (2011). "Activation of the BMP4 Pathway and Early Expression of CDX2 Characterize Non-specialized Columnar Metaplasia in a Human Model of Barrett's Esophagus." J Gastrointest Surg **16**(2): 227-237.
 23. Cheng P, Zlobin A, Volgina V, Gottipati S, Osborne B, Simel EJ, Miele L and Gibrilovich DI (2001). "Notch-1 regulates NF-kappaB activity in hemopoietic progenitor cells." J Immunol **167**(8): 4458-4467.
 24. Chillakuri CR, Sheppard D, Lea SM and Handford PA (2012). "Notch receptor–ligand binding and activation: Insights from molecular studies." Semin Cell Dev Biol **23**(4): 421-428.
 25. Cho C and Wang J (2002). "Gastrointestinal mucosal repair and experimental therapeutics". *Frontiers of Gastrointestinal Research, Frontiers of Gastrointestinal Research, 2002, Vol. 25, p. 15-20, Basel (Switzerland), Karger Medical and Scientific Publishers. 25.*
 26. Corley DA, Kubo A, Levin TR, Block G, Habel L, Rumore G, Quesenberry C and Buffler P (2009). "Race, ethnicity, sex and temporal differences in Barrett's oesophagus diagnosis: a large community-based study, 1994-2006." Gut **58**(2): 182-188.
 27. Curvers W, ten Kate F, Krishnadath K, Visser M, Elzer B, Baak L, Bohmer C, Mallant-Hent R, van Oijen A, Naber A, Scholten P, Busch O, Blaauwgeers H, Meijer G and Bergman J (2010). "Low-Grade Dysplasia in Barrett's Esophagus: Overdiagnosed and Underestimated." Am J Gastroenterol **105**(7): 1523-1530.
 28. de Jonge PJF, van Blankenstein M, Looman CWN, Casparie MK, Meijer GA and Kuipers EJ (2010). "Risk of malignant progression in patients with Barrett's oesophagus: a Dutch nationwide cohort study." Gut **59**(8): 1030-1036.
 29. Dhar DK (2005). "Expression of Trefoil Factor Family Members Correlates with Patient Prognosis and Neoangiogenesis." Clin Cancer Res **11**(18): 6472-6478.
 30. Dijkmans TF, van Hooijdonk LW, Fitzsimons CP and Vreugdenhil E (2010). "The doublecortin gene family and disorders of neuronal structure." Cent Nerv Syst Agents Med Chem **10**(1): 32-46.
 31. Dulai GS, Shekelle PG, Jensen DM, Spiegel BMR, Chen J, Oh D and Kahn KL (2005). "Dysplasia and Risk of Further Neoplastic Progression in a Regional Veterans Administration Barrett's Cohort." Am J Gastroenterol **100**(4): 775-783.
 32. Dvorak K, Goldman A, Kong J, Lynch JP, Hutchinson L, Houghton JM, Chen H, Chen X, Krishnadath KK and Westra WM (2011). "Molecular mechanisms of Barrett's esophagus and adenocarcinoma." Ann NY Acad Sci **1232**: 381-391.
 33. Faller G, Berndt R, Borchard F, Ell C, Fuchs K-H, Geddert H, Gossner L, Gunther T, Kirchner T and Koch H (2003). "Histopathologische Diagnostik der Barrett-Schleimhaut und ihrer Neoplasien Ergebnisse einer Konsensus-Konferenz der Arbeitsgemeinschaft

- "Gastroenterologische Pathologie der Deutschen Gesellschaft für Pathologie" am 22. September 2001 in Erlangen." Pathologe **24**(1): 9-14.
34. Fan X (2006). "Notch Pathway Inhibition Depletes Stem-like Cells and Blocks Engraftment in Embryonal Brain Tumors." Cancer Res **66**(15): 7445-7452.
35. Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, Koh C, Zhang J, Li YM, Maciaczyk J, Nikkhah G, Dimeco F, Piccirillo S, Vescovi AL and Eberhart CG (2010). "NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts." Stem Cells **28**(1): 5-16.
36. Farnie G, Clarke RB, Spence K, Pinnock N, Brennan K, Anderson NG and Bundred NJ (2007). "Novel cell culture technique for primary ductal carcinoma in situ: role of Notch and epidermal growth factor receptor signaling pathways." J Natl Cancer Inst **99**(8): 616-627.
37. Fein M, Fuchs KH, Ritter MP, Freys SM, Heimbucher J, Staab C and Thiede A (1998). "Application of the new classification for cancer of the cardia." Surgery **124**(4): 707-713; discussion 713-704.
38. Fitzgerald RC (2006). "Molecular basis of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma." Gut **55**(12): 1810-1820.
39. Fitzgerald RC, Abdalla S, Onwuegbusi BA, Sirieix P, Saeed IT, Burnham WR and Farthing MJ (2002). "Inflammatory gradient in Barrett's oesophagus: implications for disease complications." Gut **51**(3): 316-322.
40. Franke K (2016). "Barrett-Ösophagus–Keine Zunahme der Längenausdehnung im Verlauf." Z Gastroenterol **54**(05): 386-386.
41. Gagliardi G and Bellows CF (2012). "DCLK1 expression in gastrointestinal stem cells and neoplasia." J Cancer Res Ther **1**(1).
42. Garces C, Ruiz-Hidalgo MJ, de Mora JF, Park C, Miele L, Goldstein J, Bonvini E, Porras A and Laborda J (1997). "Notch-1 Controls the Expression of Fatty Acid-activated Transcription Factors and Is Required for Adipogenesis." J Biol Chem **272**(47): 29729-29734.
43. Gatenby PA, Ramus JR, Caygill CP, Shepherd NA and Watson A (2008). "Relevance of the detection of intestinal metaplasia in non-dysplastic columnar-lined oesophagus." Scand J Gastroenterol **43**(5): 524-530.
44. Giannakis M, Stappenbeck TS, Mills JC, Leip DG, Lovett M, Clifton SW, Ippolito JE, Glasscock JI, Arumugam M, Brent MR and Gordon JI (2006). "Molecular Properties of Adult Mouse Gastric and Intestinal Epithelial Progenitors in Their Niches." J Biol Chem **281**(16): 11292-11300.
45. Gilbert EW, Luna RA, Harrison VL and Hunter JG (2011). "Barrett's esophagus: a review of the literature." J Gastrointest Surg **15**(5): 708-718.
46. Giroux V and Rustgi AK (2017). "Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia–cancer sequence." Nat Rev Cancer **17**(10): 594-604.
47. Graf D, Vallbohmer D, Knoefel WT, Budach W and Haussinger D (2014). "Multimodal treatment of esophageal carcinoma." Dtsch Med Wochenschr **139**(42): 2141-2147.
48. Haegebarth A and Clevers H (2009). "Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin." Am J Pathol **174**(3): 715-721.
49. Haggitt RC, Tryzelaar J, Ellis FH and Colcher H (1978). "Adenocarcinoma complicating columnar epithelium-lined (Barrett's) esophagus." Am J Clin Pathol **70**(1): 1-5.
50. Hamilton SR and Yardley JH (1977). "Regenerative of cardiac type mucosa and acquisition of Barrett mucosa after esophagogastrotomy." Gastroenterology **72**(4 Pt 1): 669-675.
51. Hanby AM, Jankowski JA, Elia G, Poulosom R and Wright NA (1994). "Expression of the trefoil peptides pS2 and human spasmodic polypeptide (hSP) in Barrett's metaplasia and the native oesophageal epithelium: delineation of epithelial phenotype." J Pathol **173**(3): 213-219.

52. Harrison R, Perry I, Haddadin W, McDonald S, Bryan R, Abrams K, Sampliner R, Talley NJ, Moayyedi P and Jankowski JA (2007). "Detection of intestinal metaplasia in Barrett's esophagus: an observational comparator study suggests the need for a minimum of eight biopsies." Am J Gastroenterol **102**(6): 1154-1161.
53. Hawe A, Payne WS, Weiland LH and Fontana RS (1973). "Adenocarcinoma in the columnar epithelial lined lower (Barrett) oesophagus." Thorax **28**(4): 511-514.
54. Heitmiller RF, Redmond M and Hamilton SR (1996). "Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. An indication for prophylactic esophagectomy." Ann Surg **224**(1): 66-71.
55. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ and Heeschen C (2007). "Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer." Cell Stem Cell **1**(3): 313-323.
56. Herold G (2012). Innere Medizin. Gerd Herold et al., Köln. "Gastroösophageale Refluxkrankheit", p426-430.
57. Hoffmann W (2005). "Trefoil factors." Cell Mol Life Sci **62**(24): 2932-2938.
58. Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VSW, van de Wetering M, Sato T, Hamer K, Sasaki N, Finegold MJ, Haft A, Vries RG, Grompe M and Clevers H (2013). "In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration." Nature **494**(7436): 247-250.
59. Hulscher JB, van Sandick JW, de Boer AG, Wijnhoven BP, Tijssen JG, Fockens P, Stalmeier PF, ten Kate FJ, van Dekken H, Obertop H, Tilanus HW and van Lanschot JJ (2002). "Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the esophagus." N Engl J Med **347**(21): 1662-1669.
60. Hutchinson L, Stenstrom B, Chen D, Piperdi B, Levey S, Lyle S, Wang TC and Houghton J (2011). "Human Barrett's adenocarcinoma of the esophagus, associated myofibroblasts, and endothelium can arise from bone marrow-derived cells after allogeneic stem cell transplant." Stem Cells Dev **20**(1): 11-17.
61. Hvid-Jensen F, Pedersen L, Drewes AM, Sorensen HT and Funch-Jensen P (2011). "Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus." N Engl J Med **365**(15): 1375-1383.
62. Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG, Kerr D and Young LS (1999). "Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus." Am J Pathol **154**(4): 965-973.
63. John GR, Shankar SL, Shafit-Zagardo B, Massimi A, Lee SC, Raine CS and Brosnan CF (2002). "Multiple sclerosis: Re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation." Nat Med **8**(10): 1115-1121.
64. Kahrilas PJ, Shaheen NJ, Vaezi MF, Hiltz SW, Black E, Modlin IM, Johnson SP, Allen J, Brill JV and American Gastroenterological A (2008). "American Gastroenterological Association Medical Position Statement on the management of gastroesophageal reflux disease." Gastroenterology **135**(4): 1383-1391, 1391 e1381-1385.
65. Kelty CJ, Gough MD, Van Wyk Q, Stephenson TJ and Ackroyd R (2007). "Barrett's oesophagus: intestinal metaplasia is not essential for cancer risk." Scand J Gastroenterol **42**(11): 1271-1274.
66. Khulusi S, Hanby AM, Marrero JM, Patel P, Mendall MA, Badve S, Poulosom R, Elia G, Wright NA and Northfield TC (1995). "Expression of trefoil peptides pS2 and human spasmolytic polypeptide in gastric metaplasia at the margin of duodenal ulcers." Gut **37**(2): 205-209.
67. Kikuchi M, Nagata H, Watanabe N, Watanabe H, Tatemichi M and Hibi T (2010). "Altered expression of a putative progenitor cell marker DCAMKL1 in the rat gastric mucosa in regeneration, metaplasia and dysplasia." BMC Gastroenterol **10**: 65.
68. Kopan R and Ilagan MX (2009). "The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism." Cell **137**(2): 216-233.

69. Labenz J, Koop H, Tannapfel A, Kiesslich R and Holscher AH (2015). "The epidemiology, diagnosis, and treatment of Barrett's carcinoma." Dtsch Arztebl Int **112**(13): 224-233; quiz 234.
70. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A and Nyren O (1999). "Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma." N Engl J Med **340**(11): 825-831.
71. Leedham SJ, Preston SL, McDonald SA, Elia G, Bhandari P, Poller D, Harrison R, Novelli MR, Jankowski JA and Wright NA (2008). "Individual crypt genetic heterogeneity and the origin of metaplastic glandular epithelium in human Barrett's oesophagus." Gut **57**(8): 1041-1048.
72. Lord RV (1999). "Norman Barrett, "doyen of esophageal surgery"." Ann Surg **229**(3): 428-439.
73. Lynch JP, Srivastava A, Golden KL, Sanchez CA, Liu K, Fong PY, Li X, Cowan DS, Rabinovitch PS, Reid BJ, Blount PL and Odze RD (2015). "High Goblet Cell Count Is Inversely Associated with Ploidy Abnormalities and Risk of Adenocarcinoma in Barrett's Esophagus." Plos One **10**(7): e0133403.
74. Mansour NM, Groth SS and Anandasabapathy S (2017). "Esophageal Adenocarcinoma: Screening, Surveillance, and Management." Annu Rev Med **68**: 213-227.
75. Mariette C, Piessen G, Briez N, Gronnier C and Triboulet JP (2011). "Oesophagogastric junction adenocarcinoma: which therapeutic approach?" Lancet Oncol **12**(3): 296-305.
76. May R, Riehl TE, Hunt C, Sureban SM, Anant S and Houchen CW (2008). "Identification of a Novel Putative Gastrointestinal Stem Cell and Adenoma Stem Cell Marker, Doublecortin and CaM Kinase-Like-1, Following Radiation Injury and in Adenomatous Polyposis Coli/Multiple Intestinal Neoplasia Mice." Stem Cells **26**(3): 630-637.
77. May R, Sureban S, Hoang N, Riehl T, Lightfoot S, Ramanujam R, Wyche J, Anant S and Houchen C (2009). "Doublecortin and CaM Kinase-like-1 and Leucine-Rich-Repeat-Containing G-Protein-Coupled Receptor Mark Quiescent and Cycling Intestinal Stem Cells, Respectively." Stem Cells **27**(10): 2571-2579.
78. McCauley HA and Guasch G (2015). "Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia." Trends Mol Med **21**(8): 492-503.
79. McClanahan T, Koseoglu S, Smith K, Grein J, Gustafson E, Black S, Kirschmeier P and Samatar AA (2006). "Identification of overexpression of orphan G protein-coupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors." Cancer Biol Ther **5**(4): 419-426.
80. Minacapelli CD, Bajpai M, Geng X, Cheng CL, Chouthai AA, Souza R, Spechler SJ and Das KM (2017). "Barrett's metaplasia develops from cellular reprogramming of esophageal squamous epithelium due to gastroesophageal reflux." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **312**(6): G615-G622.
81. Montgomery RK, Mulberg AE and Grand RJ (1999). "Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress." Gastroenterology **116**(3): 702-731.
82. Moons LMG (2004). "The homeodomain protein CDX2 is an early marker of Barrett's oesophagus." J Clin Pathol **57**(10): 1063-1068.
83. Morgan TH (1917). "The theory of the gene." Am Nat **51**(609): 513-544.
84. Morrison SJ and Spradling AC (2008). "Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life." Cell **132**(4): 598-611.
85. Naef A, Savary M and Ozzello L (1975). "Columnar-lined lower esophagus: an acquired lesion with malignant predisposition. Report on 140 cases of Barrett's esophagus with 12 adenocarcinomas." J Thorac Cardiovasc Surg **70**(5): 826-835.
86. Naini BV, Souza RF and Odze RD (2016). "Barrett's Esophagus: A Comprehensive and Contemporary Review for Pathologists." Am J Surg Pathol **40**(5): e45-66.
87. Nakamura T, Tsuchiya K and Watanabe M (2007). "Crosstalk between Wnt and Notch signaling in intestinal epithelial cell fate decision." J Gastroenterol **42**(9): 705-710.

88. Nakamura Y, Hamajima Y, Komori M, Yokota M, Suzuki M and Lin J (2012). "The role of *atoh1* in mucous cell metaplasia." Int J Otolaryngol **2012**: 438609.
89. Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S and Chiba T (2012). "Dcl1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine." Nat Genet **45**(1): 98-103.
90. Nguyen DM, Richardson P and El-Serag HB (2010). "Medications (NSAIDs, Statins, Proton Pump Inhibitors) and the Risk of Esophageal Adenocarcinoma in Patients With Barrett's Esophagus." Gastroenterology **138**(7): 2260-2266.
91. Nusse R, Fuerer C, Ching W, Harnish K, Logan C, Zeng A, Berge Dt and Kalani Y (2008). "Wnt Signaling and Stem Cell Control." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **73**(0): 59-66.
92. Omori Y, Suzuki M, Ozaki K, Harada Y, Nakamura Y, Takahashi E and Fujiwara T (1998). "Expression and chromosomal localization of KIAA0369, a putative kinase structurally related to Doublecortin." J Hum Genet **43**(3): 169-177.
93. Paull A, Trier JS, Dalton MD, Camp RC, Loeb P and Goyal RK (1976). "The histologic spectrum of Barrett's esophagus." N Engl J Med **295**(9): 476-480.
94. Playford RJ (1995). "Peptides and gastrointestinal mucosal integrity." Gut **37**(5): 595-597.
95. Porschen R, Buck A, Fischbach W, Gockel I, Görling U, Grenacher L, Hollerbach S, Hölscher A, Körber J and Messmann H (2015). "S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus (Langversion 1.0–September 2015, AWMF-Registernummer: 021/023OL)." Z Gastroenterol **53**(11): 1288-1347.
96. Qin L, Bromberg-White JL and Qian CN (2012). "Opportunities and challenges in tumor angiogenesis research: back and forth between bench and bed." AdvCancerRes **113**: 191-239.
97. Quante M, Abrams JA, Lee Y and Wang TC (2012). "Barrett esophagus: what a mouse model can teach us about human disease." Cell Cycle **11**(23): 4328-4338.
98. Quante M, Bhagat G, Abrams JA, Marache F, Good P, Lee MD, Lee Y, Friedman R, Asfaha S, Dubeykovskaya Z, Mahmood U, Figueiredo JL, Kitajewski J, Shawber C, Lightdale CJ, Rustgi AK and Wang TC (2012). "Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia." Cancer Cell **21**(1): 36-51.
99. Quante M, Graham T and Jansen M (2018). "Insights Into the Pathophysiology of Esophageal Adenocarcinoma." Gastroenterology **154**(2): 406-420.
100. Quante M, Marrache F, Goldenring JR and Wang TC (2010). "TFF2 mRNA transcript expression marks a gland progenitor cell of the gastric oxyntic mucosa." Gastroenterology **139**(6): 2018-2027 e2012.
101. Quante M and Wang TC (2008). "Inflammation and stem cells in gastrointestinal carcinogenesis." Physiology (Bethesda) **23**: 350-359.
102. Quante M and Wang TC (2009). "Stem cells in gastroenterology and hepatology." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **6**(12): 724-737.
103. Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F and Dotto GP (2001). "Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation." EMBO J **20**(13): 3427-3436.
104. Reid BJ, Blount PL, Feng Z and Levine DS (2000). "Optimizing endoscopic biopsy detection of early cancers in Barrett's high-grade dysplasia." Am J Gastroenterol **95**(11): 3089-3096.
105. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.

106. Rio MC, Chenard MP, Wolf C, Marcellin L, Tomasetto C, Lathe R, Bellocq JP and Chambon P (1991). "Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract." Gastroenterology **100**(2): 375-379.
107. Ronchini C and Capobianco AJ (2001). "Induction of Cyclin D1 Transcription and CDK2 Activity by Notch^{ic}: Implication for Cell Cycle Disruption in Transformation by Notch^{ic}." Mol Cell Biol **21**(17): 5925-5934.
108. Sancho R, Cremona CA and Behrens A (2015). "Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease." EMBO Rep **16**(5): 571-581.
109. Saqui-Salces M, Keeley TM, Grosse AS, Qiao XT, El-Zaatari M, Gumucio DL, Samuelson LC and Merchant JL (2011). "Gastric tuft cells express DCLK1 and are expanded in hyperplasia." Histochem Cell Biol **136**(2): 191-204.
110. Sarosi G, Brown G, Jaiswal K, Feagins LA, Lee E, Crook TW, Souza RF, Zou YS, Shay JW and Spechler SJ (2008). "Bone marrow progenitor cells contribute to esophageal regeneration and metaplasia in a rat model of Barrett's esophagus." Dis Esophagus **21**(1): 43-50.
111. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shroyer NF, van de Wetering M and Clevers H (2010). "Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts." Nature **469**(7330): 415-418.
112. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ and Clevers H (2009). "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche." Nature **459**(7244): 262-265.
113. Savarino E, de Bortoli N, De Cassan C, Della Coletta M, Bartolo O, Furnari M, Ottonello A, Marabotto E, Bodini G and Savarino V (2017). "The natural history of gastro-esophageal reflux disease: a comprehensive review." Dis Esophagus **30**(2): 1-9.
114. Schellnegger R, Quante A, Rospleszcz S, Schernhammer M, Hohl B, Tobiasch M, Pastula A, Brandtner A, Abrams JA, Strauch K, Schmid RM, Vieth M, Wang TC and Quante M (2016). "Goblet Cell Ratio in Combination with Differentiation and Stem Cell Markers in Barrett Esophagus Allow Distinction of Patients with and without Esophageal Adenocarcinoma." Cancer Prev Res (Phila).
115. Schuijers J and Clevers H (2012). "Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins." EMBO J **31**(12): 2685-2696.
116. Seery JP (2002). "Stem cells of the oesophageal epithelium." J Cell Sci **115**(Pt 9): 1783-1789.
117. Sei Y, Lu X, Liou A, Zhao X and Wank SA (2010). "A stem cell marker-expressing subset of enteroendocrine cells resides at the crypt base in the small intestine." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. **300**(2): G345-G356.
118. Shaheen NJ, Crosby MA, Bozymski EM and Sandler RS (2000). "Is there publication bias in the reporting of cancer risk in Barrett's esophagus?" Gastroenterology **119**(2): 333-338.
119. Sharma N and Ho KY (2016). "Risk Factors for Barrett's Oesophagus." Gastrointest Tumors **3**(2): 103-108.
120. Siewert JR, Stein HJ and Feith M (2006). "Adenocarcinoma of the esophago-gastric junction." Scand J Surg **95**(4): 260-269.
121. Sikandar SS, Pate KT, Anderson S, Dizon D, Edwards RA, Waterman ML and Lipkin SM (2010). "NOTCH Signaling Is Required for Formation and Self-Renewal of Tumor-Initiating Cells and for Repression of Secretory Cell Differentiation in Colon Cancer." Cancer Res **70**(4): 1469-1478.
122. Silen W and Ito S (1985). "Mechanisms for rapid re-epithelialization of the gastric mucosal surface." Annu Rev Physiol **47**: 217-229.
123. Sinh P, Anaparthi R, Young PE, Gaddam S, Thota P, Balasubramanian G, Singh M, Higbee AD, Wani S, Gupta N, Rastogi A, Mathur SC, Bansal A, Horwhat JD, Cash BD, Falk GW,

- Lieberman DA, Vargo JJ, Sampliner RE and Sharma P (2015). "Clinical outcomes in patients with a diagnosis of "indefinite for dysplasia" in Barrett's esophagus: a multicenter cohort study." Endoscopy **47**(8): 669-674.
124. Skacel M, Petras RE, Gramlich TL, Sigel JE, Richter JE and Goldblum JR (2000). "The diagnosis of low-grade dysplasia in Barrett's esophagus and its implications for disease progression." Am J Gastroenterol **95**(12): 3383-3387.
125. Spechler SJ (2002). "Barrett's Esophagus." N Engl J Med **346**(11): 836-842.
126. Spechler SJ (2013). "Barrett esophagus and risk of esophageal cancer: a clinical review." JAMA **310**(6): 627-636.
127. Spechler SJ, Sharma P, Souza RF, Inadomi JM and Shaheen NJ (2011). "American Gastroenterological Association medical position statement on the management of Barrett's esophagus." Gastroenterology **140**(3): 1084-1091.
128. Sureban S, Ramalingam S, Subramaniam D, Natarajan G, Anant S and Houchen C (2009). "Selective Blockade of DCAMKL-1 Results in Tumor Growth Arrest by a Let-7a MicroRNA-Dependent Mechanism." Gastroenterology **137**(2): 649-659.e642.
129. Sureban SM, May R, Lightfoot SA, Hoskins AB, Lerner M, Brackett DJ, Postier RG, Ramanujam R, Mohammed A, Rao CV, Wyche JH, Anant S and Houchen CW (2011). "DCAMKL-1 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Pancreatic Cells through a miR-200a-Dependent Mechanism." Cancer Res **71**(6): 2328-2338.
130. Takubo K, Aida J, Naomoto Y, Sawabe M, Arai T, Shiraishi H, Matsuura M, Ell C, May A, Pech O, Stolte M and Vieth M (2009). "Cardiac rather than intestinal-type background in endoscopic resection specimens of minute Barrett adenocarcinoma." Hum Pathol **40**(1): 65-74.
131. Takubo K, Vieth M, Aida J, Matsutani T, Hagiwara N, Iwakiri K, Kumagai Y, Hongo M, Hoshihara Y and Arai T (2014). "Histopathological diagnosis of adenocarcinoma in Barrett's esophagus." Dig Endosc **26**(3): 322-330.
132. Takubo K, Vieth M, Aida J, Sawabe M, Kumagai Y, Hoshihara Y and Arai T (2009). "Differences in the Definitions Used for Esophageal and Gastric Diseases in Different Countries." Digestion **80**(4): 248-257.
133. Tamagawa Y, Ishimura N, Uno G, Yuki T, Kazumori H, Ishihara S, Amano Y and Kinoshita Y (2012). "Notch signaling pathway and Cdx2 expression in the development of Barrett's esophagus." Lab Invest **92**(6): 896-909.
134. Thim L (1997). "Trefol peptides: from structure to function." Cell. mol. life sci. **53**(11): 888-903.
135. Tileston W (1906). "Peptic ulcer of the oesophagus." Am J Med Sci **132**: 240-65.
136. VanDussen KL, Carulli AJ, Keeley TM, Patel SR, Puthoff BJ, Magness ST, Tran IT, Maillard I, Siebel C, Kolterud A, Grosse AS, Gumucio DL, Ernst SA, Tsai YH, Dempsey PJ and Samuelson LC (2011). "Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells." Development **139**(3): 488-497.
137. Vega KJ, May R, Sureban SM, Lightfoot SA, Qu D, Reed A, Weygant N, Ramanujam R, Souza R, Madhoun M, Whorton J, Anant S, Meltzer SJ and Houchen CW (2012). "Identification of the putative intestinal stem cell marker doublecortin and CaM kinase-like-1 in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma." J Gastroenterol Hepatol **27**(4): 773-780.
138. von Holzen U and Enders GH (2012). "A surprise cell of origin for Barrett's esophagus." Cancer Biol Ther **13**(8): 588-591.
139. von Rahden BHA, Kircher S, Lazariotou M, Reiber C, Stuermer L, Otto C, Germer CT and Grimm M (2011). "Lgr5 expression and cancer stem cell hypothesis: clue to define the true origin of esophageal adenocarcinomas with and without Barrett's Esophagus?" J Exp Clin Cancer Res **30**(1): 23.
140. Wang KK, Sampliner, Richard E. (2008). "Updated Guidelines 2008 for the Diagnosis, Surveillance and Therapy of Barrett's Esophagus." Am J Gastroenterol **103**(3): 788-797.

141. Weng AP, Nam Y, Wolfe MS, Pear WS, Griffin JD, Blacklow SC and Aster JC (2003). "Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling." Mol Cell Biol **23**(2): 655-664.
142. Weston AP, Sharma P, Mathur S, Banerjee S, Jafri AK, Cherian R, McGregor D, Hassanein RS and Hall M (2004). "Risk stratification of Barrett's esophagus: updated prospective multivariate analysis." Am J Gastroenterol **99**(9): 1657-1666.
143. Westphalen CB, Asfaha S, Hayakawa Y, Takemoto Y, Lukin DJ, Nuber AH, Brandtner A, Setlik W, Remotti H, Muley A, Chen X, May R, Houchen CW, Fox JG, Gershon MD, Quante M and Wang TC (2014). "Long-lived intestinal tuft cells serve as colon cancer–initiating cells." J Clin Invest **124**(3): 1283-1295.
144. Whorton J, Sureban SM, May R, Qu D, Lightfoot SA, Madhoun M, Johnson M, Tierney WM, Maple JT, Vega KJ and Houchen CW (2015). "DCLK1 Is Detectable in Plasma of Patients with Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma." Dig Dis Sci **60**(2): 509-513.
145. Wolf J. (29.07.2012, Institut für Pathologie der Universität Heidelberg). "Ösophaguskarzinom." Retrieved 31.05.2019, from https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/texte_s/616/oesophaguskarzinom.
146. Wong A and Fitzgerald RC (2005). "Epidemiologic risk factors for Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma." Clin Gastroenterol Hepatol **3**(1): 1-10.
147. Wong WM, Poulosom R and Wright NA (1999). "Trefol peptides." Gut **44**(6): 890-895.
148. Wright NA (1998). "Aspects of the biology of regeneration and repair in the human gastrointestinal tract." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **353**(1370): 925-933.
149. Xian W, Ho KY, Crum CP and McKeon F (2012). "Cellular origin of Barrett's esophagus: controversy and therapeutic implications." Gastroenterology **142**(7): 1424-1430.
150. Yamaguchi H, Goldenring JR, Kaminishi M and Lee JR (2002). "Association of spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia with carcinogen administration and oxyntic atrophy in rats." Lab Invest **82**(8): 1045-1052.
151. Yamamoto Y (2003). "Overexpression of orphan G-protein–coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with β -catenin mutations." Hepatology **37**(3): 528-533.
152. Ychou M, Boige V, Pignon JP, Conroy T, Bouche O, Lebreton G, Ducourtieux M, Bedenne L, Fabre JM, Saint-Aubert B, Geneve J, Lasser P and Rougier P (2011). "Perioperative Chemotherapy Compared With Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Adenocarcinoma: An FNCLCC and FFCD Multicenter Phase III Trial." J Clin Oncol **29**(13): 1715-1721.
153. Younes M, Lauwers GY, Ertan A, Ergun G, Verm R, Bridges M, Woods K, Meriano F, Schmulen C, Johnson C, Barroso A, Schwartz J, McKechnie J and Lechago J (2011). "The significance of "indefinite for dysplasia" grading in Barrett metaplasia." Arch Pathol Lab Med **135**(4): 430-432.
154. Yousef F, Cardwell C, Cantwell MM, Galway K, Johnston BT and Murray L (2008). "The Incidence of Esophageal Cancer and High-Grade Dysplasia in Barrett's Esophagus: A Systematic Review and Meta-Analysis." Am J Epidemiol **168**(3): 237-249.
155. Yu WY, Slack JM and Tosh D (2005). "Conversion of columnar to stratified squamous epithelium in the developing mouse oesophagus." Dev Biol **284**(1): 157-170.
156. Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C, Boyault S, Grimber G, Balabaud C, Cunha AS, Bioulac-Sage P and Perret C (2006). "Differential effects of inactivated Axin1 and activated β -catenin mutations in human hepatocellular carcinomas." Oncogene **26**(5): 774-780.

9 Publikation

Goblet Cell Ratio in Combination with Differentiation and Stem Cell Markers in Barrett Esophagus Allow Distinction of Patients with and without Esophageal Adenocarcinoma. Schellnegger R, Quante A, Rospleszcz S, Schernhammer M, Hohl B, Tobiasch M, et al. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2017 Jan;10(1):55-66. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-16-0117. Epub 2016 Nov 2

Anhang

Geschlecht (1=m, 2=w)	Alter (Jahre)	Dignität (0=BE, 1=EAC)	GC-Ratio (Mittelwert)	vorhergesagte Wahrscheinlichkeit (altersadaptiert)
1	53	0	0,573	0,468
1	48	0	0,159	0,732
2	46	0	0,335	0,616
1	71	0	0,658	0,460
1	79	0	0,495	0,600
1	78	0	0,286	0,730
1	48	0	0,299	0,646
1	67	0	0,719	0,406
1	68	0	0,574	0,512
1	61	0	0,354	0,645
1	67	0	0,369	0,651
2	45	0	0,463	0,523
1	66	0	0,679	0,431
1	62	0	0,373	0,635
2	76	0	0,334	0,697
1	68	0	0,516	0,553
2	48	0	0,832	0,282
2	75	0	0,108	0,813
2	56	0	0,861	0,285
1	66	1	0,776	0,364
1	63	1	0,284	0,695
1	77	1	0,040	0,844
1	51	1	0,000	0,817
1	54	1	0,052	0,800
1	77	1	0,322	0,707
1	58	1	0,555	0,496
1	39	1	0,145	0,718
1	44	1	0,089	0,761
2	61	1	0,285	0,689
1	70	1	0,212	0,753
1	48	1	0,049	0,789
1	81	1	0,592	0,538
1	62	1	0,048	0,816
1	58	1	0,000	0,829
1	76	1	0,112	0,813
1	88	1	0,039	0,861
2	78	1	0,157	0,797
1	69	1	0,683	0,437
1	59	1	0,700	0,396
1	49	1	0,386	0,590
2	36	1	0,660	0,359
1	79	1	0,276	0,738
1	79	1	0,064	0,838
1	70	1	0,194	0,762
1	72	1	0,364	0,668
1	69	1	0,639	0,468
1	63	1	0,447	0,587
1	59	1	0,713	0,387
1	66	1	0,346	0,664
1	70	1	0,502	0,569

GC-Ratio (Mittelwert) und vorhergesagte altersadaptierte Wahrscheinlichkeit bei Patienten mit BE bzw. EAC

Geschlecht (1=m, 2=w)	Alter (Jahre)	Dignität (0=BE, 1=EAC)	Score Notch1	vorhergesagte Wahrscheinlichkeit (altersadaptiert)
1	53	0	3	0,565
2	46	0	4	0,407
1	71	0	4	0,435
1	79	0	4	0,444
1	78	0	4	0,443
1	68	0	4	0,431
1	61	0	4	0,424
1	67	0	4	0,430
2	45	0	4	0,406
1	66	0	4	0,429
1	62	0	4	0,425
2	76	0	0	0,899
1	68	0	1	0,824
2	48	0	3	0,560
2	75	0	3	0,590
2	56	0	1	0,816
1	63	1	4	0,426
1	77	1	2	0,727
1	54	1	2	0,706
1	77	1	4	0,441
1	58	1	3	0,571
1	44	1	3	0,555
2	61	1	1	0,819
1	70	1	4	0,434
1	48	1	1	0,811
1	81	1	3	0,596
1	62	1	3	0,575
1	76	1	4	0,440
2	78	1	1	0,831
1	69	1	2	0,720
1	59	1	2	0,710
1	49	1	1	0,811
2	36	1	4	0,396
1	79	1	3	0,594
1	70	1	1	0,825
1	72	1	2	0,722
1	69	1	1	0,825
1	63	1	3	0,576
1	59	1	1	0,818
1	66	1	2	0,717
1	70	1	1	0,825

Score Notch1 (1-4) und vorhergesagte altersadaptierte Wahrscheinlichkeit bei Patienten mit BE bzw. EAC

Geschlecht (1=m, 2=w)	Alter (Jahre)	Dignität (0=BE, 1=EAC)	Score Lgr5	vorhergesagte Wahrscheinlichkeit (altersadaptiert)
1	53	0	1	0,544
1	48	0	0	0,471
2	46	0	2	0,640
1	71	0	3	0,665
1	79	0	0	0,402
1	78	0	3	0,651
1	48	0	1	0,555
1	67	0	3	0,673
1	68	0	1	0,510
1	61	0	0	0,442
1	67	0	0	0,428
2	45	0	1	0,562
1	66	0	0	0,431
1	62	0	1	0,524
2	76	0	0	0,408
1	68	0	2	0,593
2	48	0	3	0,710
2	75	0	1	0,494
1	63	1	2	0,604
1	77	1	2	0,573
1	54	1	3	0,699
1	77	1	2	0,573
1	58	1	1	0,533
1	39	1	3	0,727
1	44	1	3	0,718
2	61	1	3	0,685
1	70	1	0	0,422
1	48	1	2	0,636
1	81	1	3	0,645
1	76	1	1	0,492
2	78	1	2	0,571
1	69	1	0	0,424
1	59	1	0	0,446
1	49	1	0	0,469
2	36	1	3	0,732
1	79	1	2	0,569
1	70	1	2	0,589
1	72	1	2	0,584
1	63	1	2	0,604
1	70	1	0	0,422

Score Lgr5 (1-3) und vorhergesagte altersadaptierte Wahrscheinlichkeit bei Patienten mit BE bzw. EAC

Geschlecht (1=m, 2=w)	Alter (Jahre)	Dignität (0=BE, 1=EAC)	Score Dclk1	vorhergesagte Wahrscheinlichkeit (altersadaptiert)
1	53	0	0	0,117
1	48	0	0	0,111
2	46	0	1	0,495
1	71	0	1	0,578
1	79	0	0	0,158
1	48	0	0	0,111
1	67	0	0	0,138
1	66	0	1	0,561
1	68	0	1	0,568
2	48	0	2	0,891
2	75	0	2	0,921
2	56	0	1	0,528
1	63	1	1	0,552
1	77	1	1	0,597
1	54	1	2	0,898
1	77	1	2	0,923
1	58	1	2	0,903
1	39	1	1	0,472
1	44	1	1	0,489
1	70	1	2	0,916
1	48	1	2	0,891
1	81	1	2	0,927
2	78	1	3	0,990
1	69	1	1	0,571
1	59	1	1	0,538
1	49	1	2	0,892
2	36	1	2	0,874
1	79	1	2	0,925
1	79	1	1	0,603
1	70	1	3	0,989
1	72	1	2	0,918
1	69	1	1	0,571
1	63	1	2	0,909
1	59	1	3	0,987
1	66	1	2	0,912
1	70	1	1	0,574

Score Dclk1 (1-3) und vorhergesagte altersadaptierte Wahrscheinlichkeit bei Patienten mit BE bzw. EAC

Anhang

Geschlecht (1=m, 2=w)	Alter (Jahre)	Dignität (0=BE, 1=EAC)	Score TFF2	vorhergesagte Wahrscheinlichkeit (altersadaptiert)
1	53	0	3	0,183
1	48	0	2	0,499
2	46	0	4	0,049
1	71	0	1	0,804
1	79	0	2	0,477
1	78	0	4	0,045
1	67	0	4	0,047
1	68	0	2	0,485
1	61	0	2	0,490
1	67	0	1	0,806
2	45	0	3	0,186
1	66	0	2	0,487
1	62	0	2	0,489
1	68	0	0	0,948
2	48	0	3	0,185
2	75	0	4	0,046
2	56	0	2	0,494
1	63	1	1	0,808
1	77	1	2	0,479
1	54	1	3	0,183
1	77	1	1	0,801
1	58	1	1	0,810
1	39	1	1	0,818
1	44	1	2	0,502
2	61	1	1	0,808
1	70	1	1	0,804
1	48	1	2	0,499
1	81	1	2	0,476
1	76	1	1	0,802
2	78	1	1	0,801
1	69	1	1	0,805
1	59	1	1	0,809
2	36	1	1	0,819
1	79	1	1	0,800
1	79	1	1	0,800
1	70	1	1	0,804
1	72	1	2	0,482
1	63	1	1	0,808
1	59	1	0	0,949
1	66	1	1	0,806
1	70	1	1	0,804

Score TFF2 (1-4) und vorhergesagte altersadaptierte Wahrscheinlichkeit bei Patienten mit BE bzw. EAC

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Roland Schmid, Direktor der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Technischen Universität München, ganz herzlich für die Möglichkeit danken, diese Promotion an der von ihm geleiteten Klinik durchführen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt außerdem Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Michael Quante für seine ausgezeichnete Betreuung, seine große Geduld sowie seine stets freundliche und kompetente Hilfestellung in allen Fragen.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. med. univ. Raphael Schellnegger für die tatkräftige Unterstützung bei der Datenerhebung und –auswertung bedanken. Darüber hinaus geht mein aufrichtiger Dank an Herrn Prof. Dr. med. Michael Vieth für seine fundierte Beratung sowie für die Bereitstellung des Probenmaterials. Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Frau Priv.-Doz. Dr. med. Julia Slotta-Huspenina für ihre freundliche Unterstützung in allen histopathologischen Fragestellungen sowie für die Bereitstellung von Bildmaterialien bedanken.

Ebenfalls danke ich sehr herzlich allen Mitgliedern der „Arbeitsgruppe Quante“ für die unermüdliche Unterstützung, die gute Arbeitsatmosphäre und die stets bereitwillige Hilfeleistung in allen labortechnischen Angelegenheiten.

Zum Schluss gilt mein ganz besonderer Dank meinem treuen Freund, meiner Familie und meinen vielen Kollegen und Freunden für ihre unendliche Geduld und die stets motivierenden Worte. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke!