

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Klinisch-pathologische Bedeutung des Signalweges des Rezeptors des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) beim Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs Typ I (Barrett-Karzinom)

Botho Hermann Johannes Hilber

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. B. Luber

2. Univ. -Prof. Dr. H. K. Höfler

Die Dissertation wurde am 07.11.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 30.01.2013 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Das Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs Typ I (AEG I) – Definition, Epidemiologie, Pathologie, Klinik und Therapie	2
1.1.1. Definition.....	2
1.1.2. Epidemiologie.....	2
1.1.3. Pathologie	3
1.1.4. Klinik	4
1.1.5. Therapie	6
1.1.5.1. Die Wirkung monoklonaler Antikörper gegen EGFR.....	6
1.1.5.2. Die Wirkung von Tyrosinkinase-Inhibitoren gegen EGFR.....	7
1.2. Die Rolle von EGFR bei Tumorentstehung und -progression.....	7
1.3. Bedeutung der PI3K/pAkt- und Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionswege für Tumorentstehung und -progression	9
1.3.1. Rolle des PI3K/pAkt-Signaltransduktionsweges bei Tumorentstehung und -progression.....	9
1.3.2. Rolle des ERK 1/2- bzw. p44/42-MAPK-Signaltransduktionsweges bei Tumorentstehung und -progression	11
1.4. Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	14
1.5. Dreidimensionale FISH-Signalerfassung der <i>EGFR</i> -Genkopien mit dem ApoTome Imaging System	15
1.6. Immunhistochemie.....	15
1.7. Problemstellung	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1. Material	17
2.1.1. Patientenauswahl und Gewebeproben	17
2.1.2. Sonden für die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) und Antikörper für die Immunhistochemie.....	17
2.1.3. Geräte, Materialien, Software, Chemikalien, Reagenzien und Lösungen.....	18
2.2. Methoden	20
2.2.1. Anfertigung der Schnitte von <i>Tissue-Microarray</i> (TMA) Blöcken	20
2.2.2. Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) der <i>Microarrays</i>	21
2.2.3. Mikroskopie, Versuchsaufbau und Auswertung der Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung von <i>EGFR</i> und Zentromer 7	22

2.2.3.1. Mikroskopie.....	22
2.2.3.2. Versuchsaufbau und Ablauf des Experiments.....	23
2.2.3.3. Auswertung, Signalinterpretation und Kontrollen.....	24
2.2.4. LSAB-Methode der Immunhistochemie.....	25
2.2.4.1. Die immunhistochemische Färbung von EGFR.....	25
2.2.4.2. Die immunhistochemische Färbung von pEGFR, pAkt und pMAPK.....	25
2.2.4.3. Auswertung der Immunhistochemie.....	27
2.2.5. Statistik.....	28
3. Ergebnisse.....	29
3.1. Bestimmung der Genkopienzahlen von <i>EGFR</i> und Zentromer 7 durch dreidimensionale Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung im Barrrt-Karzinom.....	29
3.1.1. Häufigkeitsverteilung der <i>EGFR</i> -Genkopienzahlen ($< 2,5$ bis ≥ 6) in der TNM-Klassifikation.....	29
3.1.2. Häufigkeitsverteilung der Zentromer 7-Genkopienzahlen ($< 2,5$ bis ≥ 6) in der TNM-Klassifikation.....	30
3.1.3. Häufigkeitsverteilung der Ratio aus <i>EGFR</i> - und Zentromer 7-Genkopienzahl in der TNM-Klassifikation.....	31
3.2. Häufigkeitsverteilung des Expressionsstatus von EGFR, pEGFR, pAkt und pMAPK in der TNM-Klassifikation.....	34
3.2.1. Häufigkeitsverteilung des Expressionsstatus von EGFR in der TNM-Klassifikation.....	34
3.2.2. Häufigkeitsverteilung des Expressionsstatus von pEGFR in der TNM-Klassifikation.....	36
3.2.3. Häufigkeitsverteilung des Expressionsstatus von pAkt in der TNM-Klassifikation.....	38
3.2.4. Häufigkeitsverteilung des Expressionsstatus von pMAPK in der TNM-Klassifikation.....	40
3.3. Korrelationen zwischen molekularpathologischen und klinisch-pathologischen Parametern.....	41
3.3.1. Korrelationen von <i>EGFR</i> - und Zentromer 7-Genkopienzahlen sowie der Ratio der beiden mit klinisch-pathologischen Parametern.....	41
3.3.2. Korrelationen zwischen der Proteinexpression von EGFR, pEGFR, pMAPK und pAkt und klinisch-pathologischen Parametern.....	42
3.3.3. Korrelationen von pAkt-Proteinexpressionen in zwei Gruppen mit klinisch-pathologischen Parametern.....	43
3.3.4. Korrelationen der klinisch-pathologischen Parameter untereinander.....	44
3.3.5. Korrelationen der Parameter <i>EGFR</i> -Genkopienzahl, Zentromer 7-Genkopienzahl, EGFR-, pEGFR-, pAkt- und pMAPK-Proteinexpression untereinander.....	45
3.4. Uni- und multivariate Analyse bezüglich des Einflusses von klinisch- und molekularpathologischen Parametern auf das Überleben der Patienten.....	46
3.4.1. Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten.....	46

3.4.2.	Einfluss auf das rezidivfreie Überleben der Patienten.....	46
3.5.	Einfluss von <i>EGFR</i> -Genkopienzahl, EGFR-, pAkt- sowie pEGFR- Proteinexpression auf das Überleben der Patienten; Kaplan Meier-Analyse.....	47
3.5.1.	Korrelation zwischen <i>EGFR</i> -Genkopienzahlen und Gesamt- bzw. rezidivfreiem Überleben	48
3.5.2.	Korrelation zwischen EGFR- und pAkt-Proteinexpression mit Gesamt- bzw. rezidivfreiem Überleben	49
3.5.2.1.	EGFR-Proteinexpression korreliert eng mit Gesamt- und rezidivfreiem Überleben der Patienten.....	49
3.5.2.2.	Patienten mit starker Proteinexpression von pAkt haben eine bessere Prognose als Patienten mit geringer pAkt-Proteinexpression	51
4.	Diskussion.....	53
4.1.	Etablierung und Optimierung der dreidimensionalen FISH-Signalerfassung von <i>EGFR</i> in Gewebeproben des Barrett-Karzinoms.....	53
4.2.	Die Genkopienzahl von <i>EGFR</i> in Tumorzellen des Barrett-Karzinoms korreliert mit klinischen Daten der Patienten	54
4.3.	Der Expressionsstatus von EGFR in Tumorzellen des Barrett-Karzinoms korreliert mit klinischen Daten sowie mit den <i>EGFR</i> -Genkopienzahlen	55
4.4.	<i>EGFR</i> -Genkopienzahl korreliert mit EGFR-Proteinexpression	57
4.5.	pAkt-Proteinexpression korreliert invers mit der Ausdehnung des Primärtumors sowie Überlebensdaten	58
4.6.	pMAPK-Expressionsstatus korreliert nicht mit klinisch-pathologischen Parametern und Überlebensdaten.....	60
4.7.	Zielgerichtete Therapie gegen EGFR bei verschiedenen Tumoren.....	61
4.7.1.	Cetuximab in der Therapie des ösophagogastralen Karzinoms.....	61
4.7.2.	Erlotinib in der Therapie des ösophagealen Adenokarzinoms	62
4.8.	Welche Rolle könnten <i>EGFR</i> -Genkopienzahl und EGFR-Expressionsstatus in der klinischen Praxis einnehmen?.....	63
5.	Zusammenfassung	65
6.	Literatur-Verzeichnis	66
	Danksagung	81

Abkürzungsverzeichnis

AEG	<i>Adenocarcinoma of the esophagogastric junction</i>
CC	<i>Correlation coefficient</i>
CEP 7	<i>Centromere enumeration probe 7</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-Phenylindoldihydrochlorid</i>
DFS	<i>Disease free survival</i>
DNS	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>
FISH	<i>Fluoreszenz in situ Hybridisierung</i>
HER 2	<i>Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
LK	<i>Lymphknoten</i>
MAPK	<i>Mitogen-aktivierte Proteinkinase</i>
MEK	<i>Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase</i>
OS	<i>overall survival</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pEGFR	<i>Phosphorylated epidermal growth factor receptor</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
pMAPK	<i>Phosphorylierte mitogen-aktivierte Proteinkinase</i>
Raf	<i>Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
RTK	<i>Rezeptor-Tyrosinkinase</i>
TGF- α	<i>Tumor growth factor-α</i>
TK	<i>Tyrosinkinase</i>
TKI	<i>Tyrosinkinase-Inhibitor</i>
TMA	<i>Tissue-microarray</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Plattenepithel-Metaplasie-Dysplasie-Karzinomsequenz im Barrett-Karzinom.....	3
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des PI3K/Akt Signaltransduktionsweges	10
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der 3-stufigen MAPK-Proteinkinase-Kaskade..	12
Abbildung 4:	Verlauf des Lichtes im ApoTome-Mikroskopeinschub.....	23
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der quantitativen Auswertungskriterien der Fluoreszenz in situ Hybridisierung	25
Abbildung 6:	Dreidimensionale Projektion eines mikroskopisch generierten Bilderstapels von einem Blickfeld des Falles # 395.....	30
Abbildung 7:	Dreidimensionale Projektion eines mikroskopisch generierten Bilderstapels von einem Blickfeld des Falles # 415.....	33
Abbildung 8:	A/B: Dreidimensionale Projektion eines mikroskopisch generierten Bilderstapels von einem Blickfeld des Falles # 376.....	33/34
Abbildung 9:	vier exemplarische Blickfelder für EGFR-Expressionsscores 0, 1+, 2+, 3+	36
Abbildung 10:	vier exemplarische Blickfelder für die pEGFR-Expressionsscores von 0, 1+, 2+, 3+.....	38
Abbildung 11:	Beispiele für ein pAkt-negatives und ein pAkt-positives Barrett-Karzinom.....	39
Abbildung 12:	Beispiele für ein pMAPK-positives und ein pMAPK-negatives Barrett-Karzinom.....	41
Abbildung 13:	Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Darstellung der Korrelation von EGFR-Genkopienzahl und Gesamtüberleben.....	48
Abbildung 14:	Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Darstellung der Korrelation von EGFR-Genkopienzahl und rezidivfreiem Überleben.....	49
Abbildung 15:	Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Darstellung der Korrelation von EGFR-Proteinexpression und Gesamtüberleben	50
Abbildung 16:	Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Darstellung der Korrelation von EGFR-Proteinexpression und rezidivfreiem Überleben	50
Abbildung 17:	Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Darstellung der Korrelation von pAkt-Proteinexpression und Gesamtüberleben.....	51
Abbildung 18:	Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Darstellung des Zusammenhangs von pAkt-Proteinexpression und rezidivfreiem Überleben	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TNM-Klassifikation, UICC-Stadieneinteilung, und Grading des Barrett-Karzinoms.....	5
Tabelle 2:	Verschiedene Tumoren mit EGFR-Überexpression.....	9
Tabelle 3:	Sondenkombination LSI EGFR SO/CEP 7 SG DNA Probe	17
Tabelle 4:	Zur immunhistochemischen Färbung von EGFR, pEGFR, pAkt und pMAPK verwendete Antikörper.....	18
Tabelle 5:	Geräte, Materialien und Software.....	18
Tabelle 6:	Chemikalien und Reagenzien	19
Tabelle 7:	Allgemeine Lösungen.....	20
Tabelle 8:	Im Axio Imager Z1 verwendete Filter	22
Tabelle 9:	Ergebnisse der Fluoreszenz in situ Hybridisierung von EGFR	29
Tabelle 10:	Ergebnisse der Fluoreszenz in situ Hybridisierung von Zentromer 7	31
Tabelle 11:	Ergebnisse der Ratio aus EGFR-/Zentromer 7-Genkopienzahl	32
Tabelle 12:	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von EGFR	35
Tabelle 13:	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von pEGFR.....	37
Tabelle 14:	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von pAkt	39
Tabelle 15:	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von pMAPK.....	40
Tabelle 16:	Korrelationen zwischen EGFR- und Zentromer7 Genkopienzahlen sowie deren Ratio mit klinisch-pathologischen Parametern.....	42
Tabelle 17:	Korrelation von EGFR-, pEGFR-, pAkt- und pMAPK-Proteinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern.....	43
Tabelle 18:	Korrelation von pAkt-Proteinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern	44
Tabelle 19:	Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter untereinander.	45
Tabelle 20:	Korrelation der molekularpathologischen Parameter untereinander	46
Tabelle 21:	Einfluss von klinisch-pathologischen Parametern der TNM-Klassifikation, Genkopienzahl von EGFR und Zentromer 7 sowie des Expressionsstatus von EGFR, pEGFR, pMAPK und pAkt auf das Überleben der Patienten	47

1. Einleitung

Bösartige Neubildungen sind in Deutschland nach den kardiovaskulären Erkrankungen seit Jahren die zweithäufigste Todesursache. Laut statistischem Bundesamt erlag im Jahr 2010 rund ein Viertel (25,5%) aller Verstorbenen (218 889 Menschen) einem Krebsleiden (STATISTISCHES_BUNDESAMT 2010).

Maligne Neoplasien sind dabei weiterhin sehr schwer zu therapieren, da die Faktoren und molekularpathologischen Prozesse, die zur Tumorentstehung und -progression führen, noch nicht ausreichend bekannt bzw. verstanden sind. Die Anwendung modernster molekulargenetischer Methoden in der medizinischen Forschung und die Tatsache, dass bereits seit über einem Jahrzehnt die vollständige Sequenz des humanen Genoms zur Verfügung steht, tragen zu einem raschen Wissenszuwachs über die beteiligten Gene, die Expression der zugehörigen Proteine und deren Regulation bei.

In letzter Zeit wird verstärkt an der Erforschung verschiedener Gene und Proteine gearbeitet, die in vielen Tumoren - im Vergleich zum Normalgewebe - vermehrt vorliegen. Insbesondere erfährt die Erforschung der Familie der humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren großes Interesse. Ein für die Krebsentstehung bedeutsames und gut untersuchtes Gen bzw. das dazugehörige Protein ist *EGFR / HER1*, der Rezeptor Nummer eins des epidermalen Wachstumsfaktors. Dieser spielt mit seinen nachgeschalteten Signaltransduktionswegen eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese und -progression, indem Zellproliferation und Apoptose sowie Zellmotilität, Zelladhäsionsfähigkeit, Zellüberleben und Angiogenese entscheidend beeinflusst werden (WELLS 1999; WOODBURN 1999; GRUNWALD and HIDALGO 2003).

Eine Überexpression bzw. Genkopienzahlerhöhung von EGFR wurde bereits bei einer Vielzahl von malignen Tumoren gefunden, z.B. beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (SUZUKI *et al.* 2005; JEON *et al.* 2006), beim kolorektalen Karzinom (ZENG *et al.* 2007) und beim Magenkarzinom (KIM *et al.* 2008a). Bei einigen dieser Tumoren wurde zusätzlich ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von EGFR und einer ungünstigen Prognose festgestellt (NICHOLSON *et al.* 2001).

Aktuelle Forschungen untersuchen die Rolle von EGFR bei der Entstehung und Progression des Adenokarzinoms des gastroösophagealen Übergangs Typ I (Barrett-Karzinom) (WANG *et al.* 2007; MARX *et al.* 2010; CRONIN *et al.* 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression und exakte Genkopienzahl von EGFR in Tumorzellen des primär resezierten Barrett-Karzinoms bestimmt. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob diese Parameter mit klinisch-pathologischen Parametern bzw. Überlebensdaten korrelieren und damit als prognostische Marker dienen können.

Im Folgenden wird zunächst das Barrett-Karzinom charakterisiert (Definition, Epidemiologie, Pathologie, Klinik und Therapie) sowie die Rolle des EGFR und der zugehörigen Signaltransduktionswege bei der Tumorgenese und -progression näher beschrieben. Im An-

schluss daran sind, nach einer Erläuterung der verwendeten Methoden, die konkreten Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit dargestellt.

1.1. Das Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs Typ I (AEG I) – Definition, Epidemiologie, Pathologie, Klinik und Therapie

1.1.1. Definition

Als Barrett-Karzinom bezeichnet man das Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs Typ I. Die heute gebräuchliche AEG-Klassifikation wurde zur besseren Stratifizierung des chirurgischen Zugangsweges und des Ausmaßes der Resektion von Siewert und Mitarbeitern im Jahr 1987 als topographisch anatomische Klassifikation der Adenokarzinome des ösophagogastralen Übergangs vorgestellt (SIEWERT *et al.* 1987). Entsprechend dieser Klassifikation werden die Adenokarzinome im Bereich des ösophagogastralen Übergangs anhand der Lage des Tumorzentrums (oder bei ausgedehnten Tumoren der Lage der Haupttumormasse) zur anatomischen Kardia in Adenokarzinome des distalen Ösophagus (AEG-I-Tumoren), eigentliche Kardiakarzinome (AEG-II-Tumoren) und subkardiale Magenkarzinome (AEG-III-Tumoren) eingeteilt (STEIN *et al.* 2003).

1.1.2. Epidemiologie

Das Ösophaguskarzinom ist mittlerweile die achthäufigste Krebsform weltweit. Die zwei histologischen Haupttypen sind das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom. Während die Inzidenz für das Plattenepithelkarzinom rückläufig ist, steigt sie beim Adenokarzinom in den letzten Jahren in westlichen Nationen rapide an. Sie liegt jährlich für Männer in Europa und den USA 10-20% über der des Vorjahres, wobei Männer fünf- bis zehnmals häufiger erkranken als Frauen (VIZCAINO *et al.* 2002). Diese Zunahmenrate übertrifft die aller anderen malignen epithelialen Tumoren des Gastrointestinaltraktes (DEVESA *et al.* 1998; BOTTERWECK *et al.* 2000; BOLLSCHWEILER *et al.* 2001; VIZCAINO *et al.* 2002).

Der wichtigste prädisponierende Faktor für die Entstehung eines Barrett-Karzinoms ist der rezidivierende Reflux von Magen- und Duodenalsekret in den Ösophagus, worunter 40% der westlichen Bevölkerung regelmäßig leiden (LOCKE *et al.* 1997). Diese Regurgitation führt zur Entwicklung der gastroösophagealen Refluxkrankheit. Ca. 10% der Patienten mit chronischer gastroösophagealer Refluxkrankheit bilden eine Barrett-Metaplasie, wovon wiederum ca. 10% ein Barrett-Karzinom bekommen (siehe Abbildung 1) (STEIN *et al.* 2000b). Patienten mit Barrett-Metaplasie haben im Vergleich zur Normalbevölkerung ein 30-125fach erhöhtes Risiko an einem ösophagealen Adenokarzinom zu erkranken. Das bedeutet, dass einer von 100-200 Patienten mit Barrett-Schleimhaut über ein Jahr lang beobachtet ein Adenokarzinom bekommt (SHAHEEN *et al.* 2000; JANKOWSKI *et al.* 2002). Die Wahrscheinlichkeit, mit einer Barrett-Schleimhaut ein Barrett-Karzinom zu entwickeln, ist vergleichbar mit dem Lungen-

krebsrisiko für starke Raucher oder dem Leberkrebsrisiko für Patienten mit chronischer Hepatitis-B-Infektion (WILD and HARDIE 2003).

Weitere Risikofaktoren für das Auftreten des Barrett-Karzinoms sind Übergewicht, frucht- und gemüsearme Ernährung in Kombination mit Aufnahme von Nitrosaminen, Nikotinabusus, übermäßiger Alkoholgenuss, die Einnahme von Medikamenten wie z.B. Anticholinergika und genetische Faktoren (WILD and HARDIE 2003).

1.1.3. Pathologie

Die genauen molekularpathologischen Zusammenhänge zwischen Reflux und Karzinogenese sind noch nicht vollständig geklärt. Gesichert ist, dass das Barrett-Karzinom auf dem Boden einer intestinalen Metaplasie entsteht, die sich nach langjährigem gastroösophagealen Reflux im distalen Ösophagus entwickeln kann und bei nahezu allen Barrett-Karzinomen nachzuweisen ist. Der Einfluss von Magensäure auf die Ösophagusschleimhaut wurde eingehend untersucht. Studien haben gezeigt, dass Säure und Pepsin die Ösophagusschleimhaut angreifen. Das dadurch geschädigte Plattenepithel wird dann durch intestinale Metaplasie ersetzt (TOBEY *et al.* 2001; KOAK and WINSLET 2002). Die Barrett-Metaplasie bezeichnet den Ersatz des im distalen Ösophagus normalerweise vorhandenen Plattenepithels durch spezialisierte intestinale Metaplasie, in der typischerweise Becherzellen vorkommen (LAGERGREN *et al.* 1999). Aus dieser intestinalen Metaplasie entsteht das Barrett-Karzinom der Metaplasie-Dysplasie-Karzinomsequenz folgend (siehe Abbildung 1) (STEIN *et al.* 2000a).

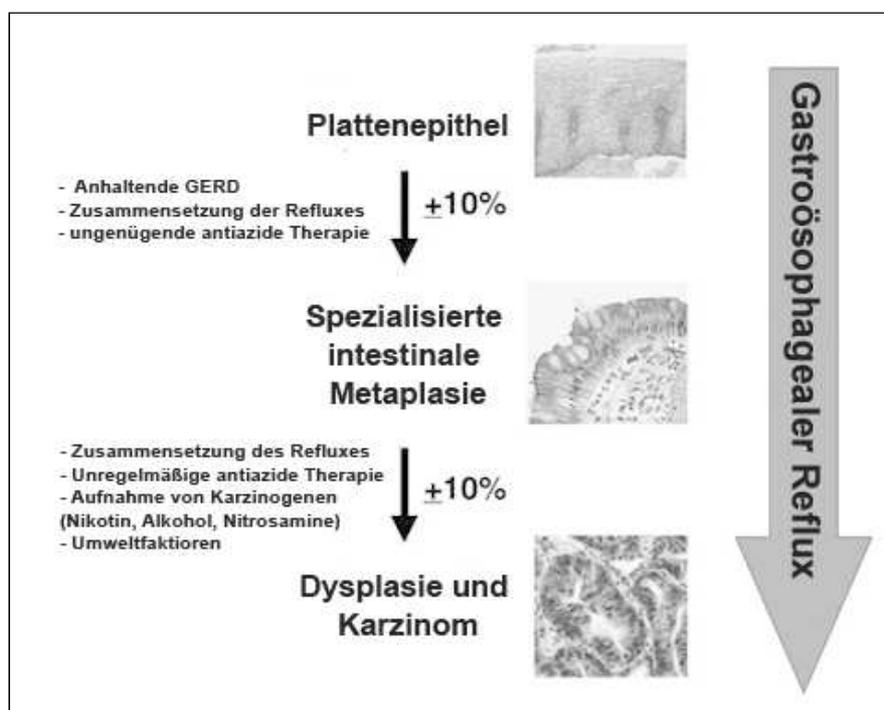


Abbildung 1: Histologische Darstellung der fortschreitenden Entwicklung von Plattenepithelmucosa über intestinale Metaplasie und Dysplasie bis hin zum invasiven Adenokarzinom des Ösophagus. Wichtigster ätiologischer Faktor ist ein starker, langanhaltender gastroösophagealer Reflux. Das relative Risiko und potentielle Risikofaktoren sind angegeben (Abbildung modifiziert nach (STEIN *et al.* 2000a)).

Im Verlauf dieser Sequenz kommt es zur Akkumulation verschiedener genetischer und epigenetischer Veränderungen, von denen viele erst bei vorangeschrittener Dysplasie auftreten (EADS *et al.* 2001; RIEGMAN *et al.* 2001; JENKINS *et al.* 2002). Durch die genetischen Alterationen verlassen die Zellen den normalen Wachstumszyklus. Apoptosemechanismen, Signaltransduktionswege und Gene, die die Zelladhäsion regulieren, werden gestört. Protoonkogene werden aktiviert und Tumorsuppressorgene inaktiviert (COPPOLA *et al.* 1999; BIAN *et al.* 2000; CORN *et al.* 2001; TSELEPIS *et al.* 2002; TSELEPIS *et al.* 2003). Diese genetischen Veränderungen sind bis heute Gegenstand der Forschung.

1.1.4. Klinik

40% der Bevölkerung der westlichen Welt berichten über gelegentlich auftretende, brennende retrosternale Schmerzen („*heart burn*“ = Sodbrennen), Luftaufstoßen, Schluckbeschwerden und Regurgitation von Mageninhalt. 20% leiden mindestens einmal wöchentlich unter diesen Symptomen (LOCKE *et al.* 1997; CAMERON *et al.* 2002). Bestehen diese Beschwerden, die durch duodenogastralen Reflux hervorgerufen werden, über einen längeren Zeitraum, führen sie zur gastroösophagealen Refluxkrankheit. Diese zeichnet sich durch erosive Ösophagitis, Strikturen und Ulzerationen des Ösophagus aus. Chronischer Reflux ist außerdem der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung einer Barrett-Metaplasie (COENRAAD *et al.* 1998; FARROW *et al.* 2000).

Therapiert werden die Symptome der gastroösophagealen Refluxkrankheit mit Protonenpumpeninhibitoren, wobei noch unklar ist, ob eine Langzeittherapie mit diesen Medikamenten das Krebsrisiko senkt (WILD and HARDIE 2003). Auch der duodenale Gallenreflux spielt eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese. Die Auswirkungen von Galle auf die Ösophagusschleimhaut sind stark pH-abhängig. Man geht davon aus, dass die Galle im basischen Milieu leichter intrazellulär kumuliert, was zur Schädigung von mitochondrialer und nukleärer DNS führen kann (DEMEESTER 2001). Die schleimhautprotektive Wirkung von Protonenpumpeninhibitoren wird auf diese Weise etwas abgeschwächt. Dennoch ist die anti-azide Medikation ein wichtiger Bestandteil der Therapie der gastroösophagealen Refluxkrankheit, da hiermit das gesamte Regurgitationsvolumen und damit auch das des biliären Refluxes stark reduziert wird (MENGENS *et al.* 2001).

Nach Primärdiagnose einer gastroösophagealen Refluxkrankheit mit oder ohne intestinale Metaplasie ist eine regelmäßige endoskopische Überwachung mit Biopsieentnahme notwendig, um Patienten in einem frühen Tumorstadium rechtzeitig einer geeigneten Therapie zuzuführen (FITZGERALD *et al.* 2001). Eine solche Früherkennung wirkt sich positiv auf die Prognose aus. Bei Patienten, die im frühen Tumorstadium der subtotalen Ösophagektomie zugeführt wurden, konnten fünf-Jahres-Überlebensraten von bis zu 90% beobachtet werden (STEIN *et al.* 2000c). Im Vergleich dazu ist bei Patienten deren Barrett-Karzinom direkt (*de novo*) diagnostiziert wurde ein kurativer Ansatz meist nicht mehr möglich. Die fünf-Jahres-Überlebensrate liegt hier bei 5-15% (JANKOWSKI *et al.* 1999). Insgesamt ähneln die zehn-

Jahres-Überlebensraten des Barrett-Karzinoms mit 40% denen des Magenkarzinoms (SIEWERT 2007).

Die klinisch-pathologische Klassifikation des Barrett-Karzinoms erfolgte nach den UICC-Richtlinien von 1997 (fünfte Auflage) (SOBIN and FLEMING 1997). Alle Tumore wurden der pTNM-Klassifikation zugeordnet, wobei die Ausdehnung des Primärtumors (pT) sowie das Fehlen bzw. Vorhandensein von Lymphknoten (pN)- und/oder Fernmetastasen (M) erfasst wurde (siehe Tabelle1).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation, UICC-Stadieneinteilung, und Grading des Barrett-Karzinoms nach UICC-Richtlinien von 1997 (SOBIN and FLEMING 1997)

TNM-Klassifikation		Beschreibung		
T-Primärtumor				
pTX		Primärtumor nicht beurteilbar		
pT0		Kein Anhalt für Primärtumor		
pTis		Carcinoma <i>in situ</i>		
pT1		Infiltration der Lamina propria oder Submukosa		
pT2		Infiltration der Muscularis propria		
pT3		Infiltration in die Adventitia		
pT4		Infiltration benachbarter Strukturen		
N-regionäre Lymphknoten				
pNX		Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar		
pN0		Keine regionären Lymphknotenmetastasen		
pN1		Regionäre Lymphknotenmetastasen		
M-Fernmetastasen				
MX		Fernmetastasen nicht beurteilbar		
M0		Keine Fernmetastasen		
M1		Fernmetastasen		
UICC-Stadium	TNM-System			5-Jahres-Überlebensrate
0	Tis	N0	M0	
I	pT1	N0	M0	67%
IIA	pT2-3	N0	M0	43%
IIB	pT1-2	N1	M0	26%
III	pT3	N1	M0	16%
IV	pT4	Jedes N	M0	3%
	Jedes pT	Jedes N	M1	
Grading		G1	G2	G3
Beschreibung		hoch differenziert	mäßig differenziert	wenig differenziert

1.1.5. Therapie

Es gibt derzeit keine Therapie mit der eine Barrett-Metaplasie zur kompletten Remission gebracht werden könnte. Der Säurereflux bzw. die gastroösophageale Refluxkrankheit kann pharmakologisch gut mit Protonenpumpeninhibitoren therapiert werden. Eine intensive anti-azide Medikation führt allerdings nicht zu einer Rückbildung der Barrett-Schleimhaut und/oder einer Wiederherstellung des Plattenepithels (PETERS *et al.* 1999). Bis heute ist die chirurgische Therapie der medikamentösen überlegen, wenn man verhindern will, dass sich eine Barrett-Metaplasie zum Adenokarzinom entwickelt (PARRILLA *et al.* 2003).

Barrett-Karzinome der Kategorie pT1 und pT2 können primär operiert werden. Lokal fortgeschrittene Tumore (pT3/pT4) werden in neoadjuvanten Therapieprotokollen behandelt. Da hier in Anbetracht der Tumorlokalisation ein „*Tumor-Downstaging*“ nicht unbedingt notwendig ist, erfolgt in der Regel eine alleinige Chemotherapie ohne Radiotherapie, die sowohl Primärtumor als auch Metastasen erreichen soll (STEIN *et al.* 2000c).

Da bei vielen epithelialen Tumoren eine Überexpression von EGFR gefunden wurde (siehe Tabelle 2) (HARARI 2004), richtet sich die Aufmerksamkeit zunehmend auf zielgerichtete („*targeted*“) Therapieansätze gegen EGFR. Zu einer solchen „*targeted therapy*“ gegen EGFR existieren aktuell zwei Hauptgruppen von Wirkstoffen; Monoklonale Antikörper (z.B. Cetuximab), und Tyrosinkinaseinhibitoren (z.B. Erlotinib, Gefitinib), die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.1.5.1. Die Wirkung monoklonaler Antikörper gegen EGFR

Die Wirkung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab alleine oder in Kombination mit Chemotherapeutika wird seit einigen Jahren an verschiedenen Tumoren untersucht. Cetuximab ist ein Maus-Mensch-chimärer Antikörper der IgG1 Subklasse, der an die extrazelluläre Domäne des EGFR mit höherer Affinität als die natürlichen Liganden EGF und TGF- α bindet, wodurch die Rezeptorphosphorylierung und Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase blockiert wird (GOLDSTEIN *et al.* 1995). Außerdem wird die Internalisation von EGFR stimuliert, wodurch dieser nicht mehr mit den Liganden interagieren kann (BASELGA *et al.* 1993).

Daten zur Wirksamkeit von Cetuximab liegen vor allem für das kolorektale Karzinom und das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom vor. In präklinischen Studien mit kolorektalen Karzinomzelllinien verhinderte Cetuximab das Tumorwachstum, verkleinerte bereits bestehende Tumoren und verlängerte das Überleben von Versuchstieren mit EGFR-positiven Tumoren (WU *et al.* 1995; BASELGA 2001). Bestätigt wurde dies in einer Studie an Irinotecan-resistenten Xenograft-Kolonkarzinomen, bei der nach Therapie mit Cetuximab ein erneutes Ansprechen auf Irinotecan gezeigt werden konnte (PREWETT *et al.* 2002). Verschiedene Patientenstudien zeigten ein verbessertes Ansprechen auf Chemotherapeutika wenn zur Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms zusätzlich Cetuximab eingesetzt wurde (CUNNINGHAM *et al.* 2004; FOLPRECHT *et al.* 2008). Interessanterweise gibt es eine Studie, die besagt, dass sowohl Patienten mit erhöhter als auch mit normaler EGFR-Expression im meta-

stasierten kolorektalen Karzinom von einer Antikörpertherapie profitieren (LOUPAKIS *et al.* 2008).

Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zeigte sich, dass Patienten mit erhöhter *EGFR*-Genkopienzahl und -Expression von einer Kombinationstherapie aus konventioneller Chemotherapie und Cetuximab profitierten. Sie hatten gegenüber der Vergleichsgruppe eine drei Monate längere Überlebenszeit ohne Tumorprogression und das mediane Gesamtüberleben lag bei 15 statt sieben Monaten (HIRSCH *et al.* 2008).

1.1.5.2. Die Wirkung von Tyrosinkinase-Inhibitoren gegen EGFR

Der Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib ist ein kompetitiver Antagonist, der intrazellulär mit ATP (Adenosintriphosphat) um die Bindung an EGFR konkurriert. Dadurch wird die Aktivierung von EGFR verhindert und die tumorstimulierende Wirkung abgeschwächt. Präklinische Studien *in vitro* und *in vivo* haben gezeigt, dass die antitumoröse Wirkung zytotoxischer Chemotherapeutika durch die Kombination mit Tyrosinkinase-Inhibitoren gesteigert werden kann (CIARDIELLO and TORTORA 2001). Dabei ist die Sensitivität auf den Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom von Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne des EGFR abhängig, z.B. (AZUMA *et al.* 2011). Gleiche Beobachtungen wurden auch an Ösophaguskarzinomzelllinien gemacht (GUO *et al.* 2006). Präklinische Studien zeigten des Weiteren, dass in Tumorzellen, die mit Tyrosinkinase-Inhibitoren oder Antikörpern behandelt wurden, die MAPK- und Akt-Signaltransduktionswege massiv herunter reguliert wurden, was zu einer Blockierung der Proliferation von Tumorzellen und Xenografttumoren in Nacktmäusen führte (PETIT *et al.* 1997; OLAYIOYE *et al.* 2000; KERBEL and FOLKMAN 2002; MOTOYAMA *et al.* 2002).

Die Wirkung von Cetuximab und Erlotinib beim Adenokarzinom des Ösophagus wird am Ende der Arbeit diskutiert.

1.2. Die Rolle von EGFR bei Tumorentstehung und -progression

EGFR wird zur Subklasse I der Rezeptor-Tyrosinkinasen gezählt und hat ein Molekulargewicht von 170 kD. Die Familie der EGFR-Rezeptoren umfasst außer EGFR (=ErbB1 oder HER 1) die drei weiteren Mitglieder ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 und ErbB4/HER4. All diese Rezeptoren verfügen über eine extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne, eine Transmembranregion und eine zytoplasmatische Tyrosinkinase-Bindedomäne. Die Bindung eines Liganden (z.B. EGF) an den passenden Rezeptor führt zur Bildung von Homo- und Heterodimeren der vier Rezeptoruntereinheiten und zur Aktivierung der intrinsischen Kinasedomäne durch Autophosphorylierung. Dadurch werden intrazelluläre Signaltransduktionswege aktiviert. Zwei wichtige Signalkaskaden sind der Raf/MEK/ERK- und der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg (OLAYIOYE *et al.* 2000; SCHLESSINGER 2000; YARDEN and SLIWKOWSKI 2001). Eine Aktivierung des Raf/MEK/ERK-Signalweges führt zu Zellproliferation, Migration und Differenzierung während die Aktivierung des PI3K/Akt-

Signalweges zur Inhibition von Apoptose und vermindertem Ansprechen des Tumorgewebes auf Radio- und Chemotherapie führt. Endpunkt der Signalwege sind im Zellkern Transkriptionsfaktoren bzw. Protoonkogene sowie im Zytosol Proteine, die zellregulatorische Enzyme beeinflussen (YARDEN and SLIWKOWSKI 2001).

EGFR wird sowohl von normalen als auch von maligne transformierten Zellen epithelialen Ursprungs auf der Oberfläche exprimiert und spielt bei der Karzinogenese und Progression vieler Tumoren wie z.B. dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, dem kolorektalen Karzinom und dem Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches eine wichtige Rolle (SALTZ *et al.* 2004; THIENELT *et al.* 2005; BOURHIS *et al.* 2006). Patienten mit Karzinomen, welche Veränderungen oder Überexpression der ErbB-Rezeptoren aufweisen, haben oftmals eine schlechtere Prognose und einen schlechteren klinischen Verlauf als Patienten, deren Tumoren einen normalen Expressionsstatus aufweisen (HOLBRO and HYNES 2004). Die intensive Untersuchung des EGFR Rezeptors in verschiedenen Tumoren brachte Deletionen und Punktmutationen zu Tage, die zu einer Erhöhung der katalytischen Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors führen können (HUMPHREY *et al.* 1990). Die am häufigsten gefundene Mutation ist EGFRvIII, bei der eine Deletion der Exons zwei bis sieben vorliegt, welche durch Gen-Umlagerungen oder verändertes *mRNA-Splicing* entsteht (*mRNA = messenger Ribonucleic acid*) (MALDEN *et al.* 1988).

Pathologische Veränderungen in der Expressionskontrolle des EGFR begünstigen die maligne Transformation gesunder Zellen. So kann eine durch Genamplifikation verursachte Überexpression des EGFR den Zellzyklus oder die Zelldifferenzierung stören und zum Entstehen eines Tumors beitragen. Im Fall eines bestehenden Tumors bedeutet die Überexpression des Rezeptors, vor allem wenn sie mit einer erhöhten Co-Expression der Liganden assoziiert ist, eine besonders ungünstige Prognose. Die Stimulation des EGFR führt in diesem Falle zu verstärktem Tumorwachstum, Stimulation von Metastasierung, Angiogenese und Gefäßinvasion sowie Apoptoseinhibition (WELLS 1999; WOODBURN 1999; GRUNWALD and HIDALGO 2003). Tumoren verschiedensten Ursprungs können eine Überexpression des EGFR aufweisen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Verschiedene Tumoren mit EGFR-Überexpression (HARARI 2004)

Tumortyp	Prozent der Tumoren mit Überexpression von EGFR
Blase	31–48
Brust	14–91
Zervix/Uterus	90
Kolon	25–77
Ösophagus	43–89
Magen	4–33
Gliazelltumor	40–63
Kopf und Halsbereich	80–100
Ovarial	35–70
Pankreas	30–89
Prostata	40–80
Nierenzell	50–90
Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	40–80

Ein Überblick über mehr als 200 Studien der Jahrgänge 1985 bis 2000 mit insgesamt mehr als 20000 Krebspatienten, die sich mit der Korrelation zwischen EGFR-Expression verschiedener Karzinomformen und Gesamt- bzw. rezidivfreiem Überleben befasste, brachte zu Tage, dass beim Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches, dem Ovarial-, Zervikal-, Harnblasen- und Ösophaguskarzinom eine starke Korrelation zwischen EGFR-Proteinexpression und Überlebensdaten besteht. Beim Magen-, Mamma-, Endometrium- und kolorektalen Karzinom war der EGFR-Expressionsstatus prognostisch weniger aussagekräftig. Die schwächste Assoziation wies das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom auf (NICHOLSON *et al.* 2001).

1.3. Bedeutung der PI3K/pAkt- und Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionswege für Tumorentstehung und -progression

1.3.1. Rolle des PI3K/pAkt-Signaltransduktionsweges bei Tumorentstehung und -progression

Aktiviertes Akt (pAkt) reguliert grundlegende Zellfunktionen, wie Zellzyklus und Überleben (DATTA *et al.* 1999; VIVANCO and SAWYERS 2002). Die Aktivierung erfolgt über den PI3K-Akt-Signaltransduktionsweg. Eine Bindung von Wachstumsfaktoren an eine Rezeptor-Tyrosinkinase führt über ein G-Protein (Ras) zur Phosphorylierung von PI3K. Diese PI3K wandelt Phosphatidylinositol-4-5-Biphosphonat (PI(4,5)P₂) in Phosphatidylinositol-3-4-5-

Triphosphat (PI(3,4,5)P₃) um, während PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) diesen Vorgang rückgängig macht. Akt gelangt zur Zellmembran und interagiert über seine PH-Domäne mit PI(3,4,5)P₃. Zusätzlich wird Akt an zwei Residuen durch PDK 1, PDK 2 (*phosphoinositide-dependent kinase*) und ILK (*integrin-linked kinase*) phosphoryliert und damit aktiviert (siehe Abbildung 2) (OSAKI *et al.* 2004).

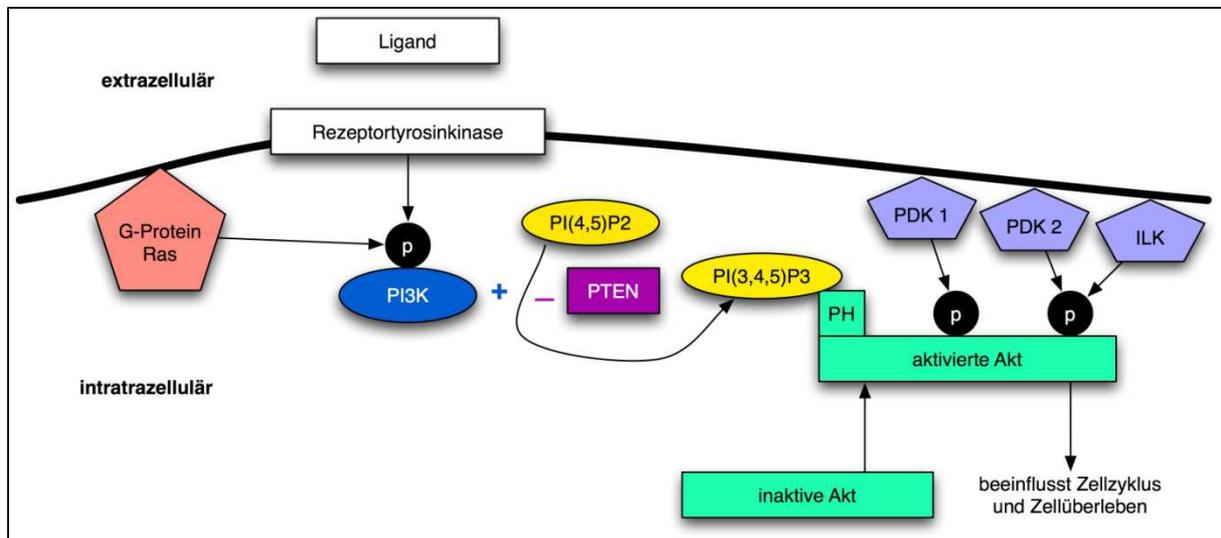


Abbildung 2: Schematische Darstellung des PI3K/Akt Signaltransduktionsweges (Abbildung modifiziert nach (OSAKI *et al.* 2004)).

Durch eine Vielzahl zellulärer Stimuli oder toxischer Einflüsse wird dieser Signaltransduktionsweg aktiviert und regelt so grundlegende zelluläre Funktionen wie Transkription, Translation, Proliferation, Zellwachstum und Überleben (DATTA *et al.* 1999; VIVANCO and SAWYERS 2002). Ist der PI3K-Akt-Signaltransduktionsweg gestört kommt es deshalb zu unkontrollierter Zellproliferation (TESTA and BELLACOSA 2001; HILL and HEMMINGS 2002; VIVANCO and SAWYERS 2002). Außerdem führt eine vermehrte Expression von Akt zur Inhibition von Apoptose (YAO and COOPER 1995). Die Serin/Threonin-Kinase Akt ist die entscheidende Kinase in diesem Weg. Eine gestörte Aktivierung des PI3K-Akt-Weges wurde mit der Entwicklung verschiedener Krankheiten wie Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen und Krebs in Zusammenhang gebracht (DI CRISTOFANO *et al.* 1999; TESTA and BELLACOSA 2001; HILL and HEMMINGS 2002; NICHOLSON and ANDERSON 2002; VIVANCO and SAWYERS 2002). Bei menschlichen Krebserkrankungen spielt dieser Signaltransduktionsweg nicht nur eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und kontrolliertem Zelltod, sondern ist auch bei einem potentiellen Ansprechen eines Tumors auf verschiedene Krebsbehandlungen beteiligt (OSAKI *et al.* 2004).

Einige Studien an Tumoren verschiedener Genese zeigten nun eine Überexpression von Akt-Isoformen, z.B. beim Kolon- (ROY *et al.* 2002), Mamma- (VIVANCO and SAWYERS 2002), Pankreas- (ALTOMARE *et al.* 2002) und Gallengangskarzinom (TANNO *et al.* 2004). Immunhistochemische Studien mit Antikörpern gegen das an Serin 473 phosphorylierte Akt

fanden beim Pankreas- (YAMAMOTO *et al.* 2004), Magen- (NAM *et al.* 2003), und Mammakarzinom (PEREZ-TENORIO and STAL 2002) eine erhöhte Expression des Proteins, welche mit einer schlechteren Prognose assoziiert war. Außerdem verringerte eine erhöhte Aktivität von pAkt im Gallengangs- (TANNO *et al.* 2004) und Mammakarzinom (CLARK *et al.* 2002) sowie im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (BROGNARD *et al.* 2001) die Sensibilität auf Radio- und Chemotherapie.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Expressionsstatus von pAkt bestimmt und mit klinisch-pathologischen Parametern sowie Überlebensdaten korreliert. Damit wurde der Frage nachgegangen, ob der pAkt-Signaltransduktionsweg auch im Barrett-Karzinom an Tumorentstehung, -progression und klinischem Verlauf beteiligt ist.

1.3.2. Rolle des ERK 1/2- bzw. p44/42-MAPK-Signaltransduktionsweges bei Tumorentstehung und -progression

Die mitogen aktivierten Proteinkinasen (p42/p44-MAPK = ERK 1/2) sind das Kernstück eines Signaltransduktionsnetzwerkes, welches Proliferation, Differenzierung und zelluläres Überleben steuert (PEARSON *et al.* 2001). Im Folgenden wird zur besseren Verständlichkeit eine einheitliche Terminologie gewählt: Raf für MAP-Kinase-Kinase-Kinase, MEK 1/2 für MAP-Kinase-Kinase eins und zwei und ERK 1/2 für p42/p44MAPK. Die MAPK-Signaltransduktion besteht nun aus einer Kaskade von Proteinphosphorylierungen, die diese drei entscheidende Kinasen einschließt: Raf, MEK 1/2 und ERK 1/2 (siehe Abbildung 3) (HILGER *et al.* 2002).

Liganden wie EGF binden an eine Rezeptor-Tyrosinkinase, wie z.B. EGFR und führen damit zur Autophosphorylierung und Aktivierung des Rezeptors. Über das G-Protein Ras wird nun unter Rekrutierung von Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) und Sos (*Son of sevenless*) Raf phosphoryliert und aktiviert. Raf phosphoryliert und aktiviert daraufhin MEK 1/2, welches schließlich ERK 1/2 phosphoryliert und dadurch aktiviert (siehe Abbildung 3) (HILGER *et al.* 2002).

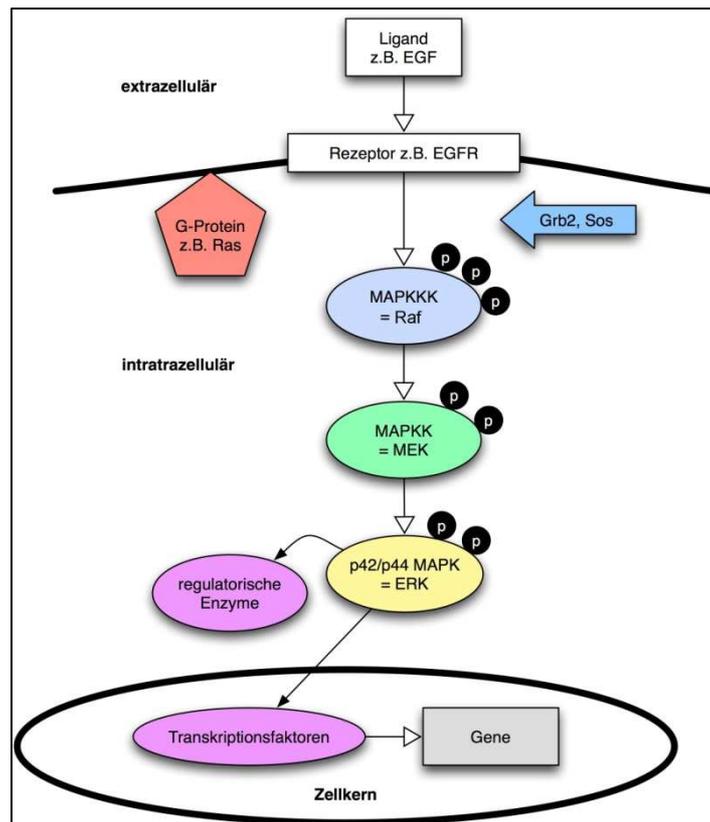


Abbildung 3: Schematische Darstellung der 3-stufigen MAPK-Proteinkinase-Kaskade (Abbildung modifiziert nach (KOLCH 2000)).

Durch Erforschung der Ras-vermittelten Wachstumssignale stellte sich heraus, dass die MAPK-Signaltransduktion eine entscheidende und zugleich kritische Verbindung zwischen membrangebundenem Ras (G-Protein) und dem Zellkern darstellt. Die Phosphorylierung von ERK führt zu seiner Konformationsänderung und zur vollen enzymatischen Aktivität. Auch ermöglicht sie die Dimerbildung dieser Kinase, die für eine Wanderung in den Zellkern nötig ist (CANAGARAJAH *et al.* 1997; KHOKHLATCHEV *et al.* 1998). ERK 1/2 kann eine Vielzahl von Enzymen phosphorylieren, welche wiederum Proteine des Zytoskeletts, des Zellmetabolismus und einige Transkriptionsfaktoren regulieren (ROBINSON and COBB 1997; DHANASEKARAN and PREMKUMAR REDDY 1998; SCHAEFFER and WEBER 1999).

Ras und Raf sind Protoonkogene, die bei übermäßiger Stimulation bzw. Aktivierung zur Krebsentstehung beitragen können (HAMAD *et al.* 2002). Viele Hormone, Wachstumsfaktoren sowie kanzerogene Substanzen greifen in diesen Signalweg ein. Die meisten dieser Stimuli aktivieren Ras indem sie den Austausch von GDP (Guanosin-5-diphosphat) durch GTP (Guanosintriphosphat) herbeiführen, wodurch es in seine aktive Form überführt wird. Aktiviertes Ras stimuliert primär drei Hauptklassen von Effektorproteinen, Raf-Kinasen, PI3K/Akt und RalGEFs, wobei Raf die höchste Potential zur Störung des Zellzyklus zugeordnet wird (HAMAD *et al.* 2002). Ras ist ein G-Protein, welches mit hoher Affinität an Raf-Kinasen bindet, wodurch diese an die Zellmembran verlagert werden, wo Raf aktiviert wird (MOODIE and WOLFMAN 1994). Das einzige Substrat für Raf ist MEK 1/2 (SCHAEFFER and

WEBER 1999). MEK 1/2 wird durch Phosphorylierung an zwei Serin-Enden aktiviert und aktiviert nun wiederum ERK 1/2 durch Phosphorylierung einer Threonin-Glutamin-Threonin-Sequenz. ERK hat als Serin/Threonin-Kinase mehr als 50 Substrate (LEWIS *et al.* 1998) und ist in sehr wichtige grundlegende zelluläre Funktionen wie Genexpression, Zellzyklusregulation, Apoptoseregulation, Zellmetabolismus, -beweglichkeit und -überleben involviert (PEARSON *et al.* 2001). Dem ausgeprägten mitogenen Effekt von ERK 1/2 liegen mehrere Mechanismen zugrunde, wie die Stimulation der Nukleotidsynthese, die Rekrutierung von Ribosomen durch Phosphorylierung von Translationsfaktoren, die Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Phosphorylierung von Chromatin (KYRIAKIS and AVRUCH 2001; SCHRAMEK 2002). In Endothelzellen bewirkt ERK 1/2 eine erhöhte Expression von VEGF (*vascular endothelial growth factor*), welcher wiederum für Angiogenese, Migration und ebenfalls für eine MAPK-Aktivierung und Zellproliferation verantwortlich ist (KROLL and WALTENBERGER 1997; BERRA *et al.* 2000; KROLL and WALTENBERGER 2000; PAGES *et al.* 2000). Die antiapoptotische Wirkung der p42/p44 MAPK im Rahmen von Proliferation und Migration erscheint sinnvoll, da normalerweise Zellen, die sich aus dem Zellverband und von der extrazellulären Matrix lösen, einen programmierten Zelltod erleiden (BERRA *et al.* 2000; CHO and KLEMKE 2000). Metastasierung ist die Hauptursache für Todesfälle durch Krebs und Zellbewegung ist ein wichtiger Bestandteil dieses Prozesses. Zusätzlich zu seiner Rolle bei der Regulierung der Zellproliferation und des Zellüberlebens scheint der ERK-Signalweg bei invasivem Wachstum und Metastasierung eine bedeutende Rolle zu spielen (REDDY *et al.* 2003; VIALA and POUYSSEGUR 2004). Mit Mutanten der Effektor-domäne von Ras, die hergestellt wurden um spezifische Moleküle entlang der Ras-Kaskade zu aktivieren (Raf, PI3K), wurde gezeigt, dass eine Aktivierung des ERK-Signaltransduktionsweges zur Bildung von Lungenmetastasen in Nacktmäusen führte (WEBB *et al.* 1998). Obwohl der PI3K-Signaltransduktionsweg, wie oben beschrieben, eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellmotilität spielt, haben einige Studien gezeigt, dass der ERK-Signaltransduktionsweg einen direkten Einfluss auf Zellmotilität und die Migration von Tumorzellen hat (VIALA and POUYSSEGUR 2004). Die Hemmung von ERK könnte also ein Weg sein, um invasives Wachstum, Metastasierung, Tumorzell-überleben und -proliferation zu unterbinden.

Bei einigen Studien an verschiedenen Tumoren fand sich eine Korrelation zwischen ERK 1/2-Proteinexpression und klinisch-pathologischen Parametern sowie Überlebensdaten, so zum Beispiel beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (ZHANG *et al.* 2005) und beim hepatozellulären Karzinom (HUYNH *et al.* 2003).

Es ist damit offensichtlich, dass die ERK-Signalkaskade eine wichtige Rolle bei der Krebspathogenese spielt, weshalb auch in der vorliegenden Arbeit die Zusammenhänge zwischen ERK 1/2 Expression und klinisch-pathologischen Parametern sowie Überlebensdaten von Patienten mit Adenokarzinom des distalen Ösophagus untersucht wurden. Im positiven Falle könnte der ERK 1/2 Proteinexpressionsstatus als prognostischer Marker aber auch zur Therapie- und Risikostratifizierung eingesetzt werden. Des Weiteren könnte ERK 1/2 als Ziel für eine Antikörpertherapie genutzt werden.

1.4. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Eine etablierte Methode zum Nachweis struktureller und numerischer chromosomaler Veränderungen in Zellen oder Geweben ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Die *in situ* Hybridisierung ist eine sensitive molekularbiologische Technik um Nukleinsäuresequenzen mit Sonden direkt in Metaphasechromosomen und Interphasekernen nachzuweisen und somit chromosomale Aberrationen zu untersuchen (GRAY *et al.* 1994). Die Besonderheit dieser Methode beruht auf der Darstellung der Zielsequenz im biologischen Präparat *in situ*, d.h. in Geweben (Gewebeschnitten), Zellen, Zellkernen oder in Chromosomen. Das Prinzip der FISH beruht auf der Ausbildung von DNS Doppelsträngen aus DNS Einzelsträngen, die so genannte Hybridisierung. Dabei erfolgt die Detektion einer DNS Zielsequenz durch eine spezifische Rekombination mit einem möglichst homologen DNS Einzelstrang, der DNS Sonde. Für eine Hybridisierung, der Ausbildung eines Doppelstranges aus DNS Zielsequenz und DNS Sonde, müssen sowohl die Zielsequenzen im Gewebe als auch die DNS Sonden denaturiert, d.h. als Einzelstränge, vorliegen. Dies ist ein reversibler Prozess, dessen Reassoziationskinetik sich die *in situ*-Hybridisierung zunutze macht. Die verhältnismäßig kurze DNS Sonde hybridisiert relativ schnell mit der Zielsequenz und zwar bevor sich aus den einzelnen Strängen des Chromosoms wieder ein Doppelstrang bildet. Bei einer Hybridisierung eines Gens mit einer DNS Sonde kann der so neu gebildete Doppelstrang anhand einer Markierung der DNS Sonde sichtbar gemacht werden. Erfolgt die Signalgebung durch Fluoreszenzfarbstoffe spricht man von der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung. Im Allgemeinen erfolgt die Untersuchung von DNS Sequenzen mit lokusspezifischen DNS Sonden. Zielstrukturen der FISH können beispielsweise repetitive Sequenzen, Genome und Einzelkopiesequenzen sein. Als Untersuchungsmaterial können unter anderem Einzelzellen (z.B. Blut- und Knochenmarkzellen) oder Gewebeschnitte verwendet werden. Gewebeschnitte müssen besonders vorbehandelt werden damit ein Eindringen der DNS Sonden in die Zellkerne erreicht werden kann. Dieser Schritt dient auch der Vermeidung unspezifischer Hybridisierungen mit anderen Sequenzen, z.B. mit RNA, und der Vermeidung von Wechselwirkungen mit Bestandteilen des Nukleoplasmas, wie z.B. Proteinen (GRAY *et al.* 1994). Repetitive Sequenzen, z.B. alpha Satelliten Sequenzen der Zentromerregionen, wurden als eine der ersten mit der *in situ* Hybridisierung nachgewiesen (BAUMAN *et al.* 1980; PINKEL *et al.* 1986; GRAY *et al.* 1994). Sie dienen vor allem dem Nachweis von Aneuploidie bei bestimmten Chromosomen. Der Nachweis von Einzelkopiesequenzen ist eine weitere wichtige Anwendung der FISH. Mittlerweile lassen sich DNS-Sequenzen von einigen zehn Kilobasenpaaren Länge lokalisieren. Neben numerischen chromosomalen Aberrationen können auch strukturelle Veränderungen aufgedeckt werden. Bei numerischen Aberrationen können nur durch die Kombination einer Zentromersonde und einer lokusspezifischen DNS Sonde die Kopienzahlen der Gene interpretiert und beispielsweise als Amplifikation gewertet werden. Wird z.B. eine lokusspezifische Sequenz mehrfach mit der FISH in einem Zellkern nachgewiesen, muss erst ausgeschlossen werden, dass dieser Genzahlvermehrung nicht eine Aneuploidie des Chromosoms, auf dem die spezifische Sequenz sich befindet, zugrunde liegt. Erst wenn das Gen häufiger vorzufinden ist als das Chromosom kann von einer alleinigen Vermehrung dieses Gens ausgegangen werden (VAN DEKKEN and BAUMAN 1988; WALCH *et al.* 2000).

1.5. Dreidimensionale FISH-Signalerfassung der *EGFR*-Genkopien mit dem ApoTome Imaging System

In dieser Studie wurden die FISH-Signale von *EGFR* und Zentromer 7 in 16 µm dicken Gewebeschnitten mittels ApoTome Imaging System dreidimensional erfasst und einzelbildbasiert ausgewertet. Vergleichbar mit einer computertomographischen Untersuchung wurde ein Bilderstapel durch die Gewebeproben gelegt. Die einzelnen Bilder wurden von oben bis unten „durchgescrollt“, wodurch das Problem der Überlagerung einzelner Zellkerne umgangen wurde. Außerdem lagen in den 16 µm dicken Gewebeschnitten die Zellkerne, welche einen durchschnittlichen Durchmesser von acht bis zehn µm haben, nicht angeschnitten vor. So konnten pro Zellkern alle Genkopien in exakter Anzahl bestimmt werden.

Ein großer Vorteil gegenüber vorherigen Studien an bis zu 16 µm Gewebeschnitten, in denen auch mehrere Fokusebenen pro Blickfeld als Bilderstapel angelegt wurden (AUBELE *et al.* 1997; MAIERHOFER *et al.* 2003; RAUSER *et al.* 2007), lag darin, dass man vor dem Starten des Experiments eine große Anzahl von Blickfeldern manuell einstellen und speichern konnte. Das ApoTome Imaging System fuhr nach dem Starten des Experiments die einzelnen Blickfelder nacheinander automatisch an, legte einen Bilderstapel durch die verschiedenen Areale und speicherte die Daten automatisch. Das zeitaufwendige erneute Einstellen eines neuen Blickfeldes nach jedem Durchlauf konnte dadurch vermieden werden.

1.6. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein etabliertes Verfahren zur Quantifizierung einzelner Proteine in Geweben. Die Proteine (=Antigene) werden mittels eines spezifischen Antikörpers markiert, welcher wiederum mit einem Detektionssystem gekoppelt ist, wodurch er im Präparat sichtbar gemacht werden kann.

Man bezeichnet den Antikörper, der gegen das gesuchte Epitop gerichtet ist, als Primärantikörper. Er sollte sich durch hohe Spezifität und Affinität auszeichnen und keine Kreuzreaktionen mit ähnlichen Epitopen eingehen. Zur Sichtbarmachung des Antigen-Antikörper-Komplexes werden verschiedene Verfahren unterschieden (siehe Material-Methoden Teil).

In situ Methoden wie die Immunhistochemie haben den Vorteil, dass sie an Gewebeschnitten (Paraffin- oder Frischmaterial) durchgeführt werden können und somit auch eine intratumorale Heterogenität erfassbar wird. Vor diesem Hintergrund wird derzeit der immunhistochemische Nachweis von *EGFR* als wichtigste Methode zur Bestimmung des *EGFR*-Expressionsstatus betrachtet.

Die Immunhistochemie birgt allerdings auch methodische Schwierigkeiten. Ein Problem liegt in der fehlenden Standardisierung der immunhistochemischen Färbung und der Quantifizierung der Ergebnisse. Für *EGFR* wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl von immunhistochemischen „Scores“ postuliert. Dies ist letztendlich auch als Schwäche einiger publizierter Studien einzustufen. Durch die fehlende Standardisierung und die Intra- und

Interobservervariabilität bei der Bewertung des Expressionsstatus sind die Ergebnisse von Studien, die den Expressionsstatus von EGFR untersuchen, nicht immer vergleichbar (DEI TOS and ELLIS 2005). Darüber hinaus wurden in den Studien verschiedene Antikörper verwendet, wodurch zum Teil Unterschiede in den Ergebnissen auftreten. Ob dies mit unterschiedlichen Vorbehandlungsprotokollen, einer differierenden Gewebepreparation oder variierenden Antikörpersensitivitäten beziehungsweise Antikörperspezifitäten zusammenhängt ist derzeit noch nicht hinreichend geklärt. Vergleichende Daten von Sauter et al. an einer Vielzahl von Tumoren weisen aber darauf hin, dass die Klärung dieser Frage in der Zukunft eine sehr wichtige Rolle spielen wird. So konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass bei einzelnen Tumorarten antikörperabhängige Expressionsraten von bis zu 50% Unterschied auftraten (SAUTER *et al.* 2003).

1.7. Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war es zu ermitteln, ob molekularpathologische Parameter mit klinischen Parametern korreliert sind und daher als prognostische Marker für das Barrett-Karzinom verwendet werden können. Dazu wurden die genauen Genkopienzahlen von *EGFR* zusammen mit Zentromer 7 mittels dreidimensionaler FISH-Signalerfassung sowie der Expressionsstatus von EGFR, pEGFR, pAkt und pMAPK mittels Immunhistochemie im primär resezierten Barrett-Karzinom gemessen. Anschließend wurden die Korrelationen zwischen diesen molekularpathologischen und klinisch-pathologischen Parametern berechnet.

Folgende Fragen wurden dabei im Einzelnen untersucht:

- Wie sind *EGFR*-Genkopienzahlbereiche mit klinischen Parametern wie Ausdehnung des Primärtumors, Auftreten von Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen, Resektionsstatus, Grading und UICC-Stadium korreliert?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen Ausmaß der Proteinexpression von EGFR, pEGFR, pAkt und pMAPK und den genannten klinisch-pathologischen Parametern?
- Besteht nach der univariaten Analyse ein Zusammenhang zwischen *EGFR*-Genkopienzahl sowie EGFR-, pEGFR-, pAkt- und pMAPK- Proteinexpression und dem Gesamt- und/oder rezidivfreien Überleben. Bildet eine dieser Variablen nach der multivariaten Analyse einen unabhängigen Parameter zur Abschätzung der Prognose sowie dem Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs?
- Besteht eine Korrelation zwischen Genkopienzahl und Proteinexpression von EGFR?
- Wie hoch ist der Anteil der Tumoren mit erhöhter EGFR-Expression? Könnte EGFR auch im Barrett-Karzinom als Antigen für eine zielgerichtete Antikörpertherapie dienen?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Patientenauswahl und Gewebeproben

Die Gewebeproben dieser Studie stammen von insgesamt 118 Patienten ($n = 118$) mit Adenokarzinomen des gastroösophagealen Übergangs Typ I. Das Durchschnittsalter der Patienten bei Resektion betrug 63,6 Jahre (zwischen 33 und 83 Jahren) wobei neun Patienten weiblichen und 109 Patienten männlichen Geschlechts waren. 47 Tumoren entsprachen dem UICC Stadium I, 18 dem Stadium IIA, 16 dem Stadium IIB, 28 dem Stadium III und acht dem Stadium IV. Bei 65 Fällen gab es keine Lymphknotenmetastasen (pN0M0), bei 51 Fällen waren diese vorhanden (pN1M1). Der mediane Beobachtungszeitraum für das Gesamtüberleben betrug 33 Monate (zwischen 0,8 und 164 Monaten), für das rezidivfreie Überleben 31 Monate (zwischen 1,6 und 164 Monaten).

Alle Barrett-Karzinome waren mit histologisch gesicherter Barrett-Mukosa assoziiert und primär, ohne adjuvante Chemo- oder Strahlentherapie, reseziert worden. Die Operationen wurden in der chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München vorgenommen. Postoperativ wurden die Gewebeproben in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die klinisch-pathologischen Daten der Patienten wurden unter der Einwilligung des Ethikkomitees der Technischen Universität München erhoben.

2.1.2. Sonden für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und Antikörper für die Immunhistochemie

Es wurde eine Sondenkombination verwendet, die das zu untersuchende Gen (*EGFR*) und das Zentromer des entsprechenden Chromosoms 7 (CEP 7) nachweist (siehe Tabelle 3). Die *EGFR* Sonde ist spezifisch für eine 300 kb lange Sequenz, welche das *EGFR*-Gen beinhaltet. Die Zentromersonde ("*centromere enumeration probe*", CEP) ist spezifisch für hochrepetitive Sequenzen ("*alpha satellite DNA*"), die im Zentromer des Chromosoms 7 liegen.

Tabelle 3: Sondenkombination LSI *EGFR* SO/CEP 7 SG DNA Probe

Bezeichnung der Sondenkombination	Zielsequenzen	Region	Fluorochrom	Bezugsquelle
LSI <i>EGFR</i> SO/CEP 7 SG DNA Probe	<i>EGFR</i> -Gen	7p12	Spectrum Orange	Vysis/Abbott Inc., Downers Grove, IL USA
	Zentromer des Chromosom 7 (CEP 7)	7p11,1-q11,1	Spectrum Green	

Die immunhistochemische Färbung der Proteine EGFR, pEGFR, pAkt und pMAPK erfolgte mit folgenden Antikörpern (siehe Tabelle 4):

Tabelle 4: Zur immunhistochemischen Färbung von EGFR, pEGFR, pAkt und pMAPK verwendete Antikörper

Antikörper	Isotyp	Verwendung/ Konzentration	Bezugsquelle
EGFR	Maus monoklonal	Aus pharmDx™ Kit	DAKO, Glostrup, Dänemark Bestellnummer: K1492
phospho-EGFR (Tyr 1086)	Kaninchen polyklonal	1:100	Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA/USA (über Invitrogen, Karlsruhe)
phospho-Akt (Ser473)	Kaninchen polyklonal	1:250	Cell Signaling Technology, Beverly, MA/USA (über NEB, Frankfurt am Main)
phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Kaninchen polyklonal	1:100	Cell Signaling Technology, Beverly, MA/USA (über NEB, Frankfurt am Main)

2.1.3. Geräte, Materialien, Software, Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Zur Durchführung der Untersuchungen wurden in dieser Arbeit folgende Geräte, Materialien, Chemikalien, Reagenzien, Lösungen und Software verwendet (siehe Tabellen 5-7):

Tabelle 5: Geräte, Materialien und Software

Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager Z1 von Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Brutschrank	Trockenschrank Heraeus Modell T6060
Heizplatte	Stork Präzitherm Typ PZ 281
Mikrowelle	Bauknecht
Objektträger	Chemmate Slides, 75Xm (7x72) Dako, Hamburg, Deutschland
Deckgläschen	Menzel Gläser
AxioVision Release 4.5	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, München, Deutschland
SAS, Statistical Analysis Software	SAS Institute Inc., Cary, NC, USA

Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien

Zitronensäuremonohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris Base Ultrapure Pulver	USB, Cleveland, Ohio, USA
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pronase E	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Nonidet P 40 (NP 40)	SIGMA/ Igepal CA-360, Taufkirchen, , Deutschland
Fixogum [®]	Marabu GmbH, Tamm, Deutschland
Vectashield [®]	Mounting Medium H-1000, Vector Laboratories, über Linaris, Wertheim, Deutschland
Hoechst [®] -Stammlösung	Molecular Probes, Eugene, Oregon/USA
REAL-Detection Systems DAB-Kit Rabbit/Mouse	DAKO, Hamburg, Deutschland; (# K-500111)
REAL-Antibody-Diluent 250ml	DAKO, Hamburg, Deutschland; (#S-2022)
Goat Serum Normal	DAKO, Hamburg, Deutschland; (#X-0907)
EGFR pharmDx Kit for Manual use	DAKO, Hamburg, Deutschland; (# K-149211)
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector, über Linaris, Wertheim, Deutschland; (#SP-2001)
Hämalaun Färbe-Kit nach Mayer	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 7: Allgemeine Lösungen

PBS, pH 7,0	80 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O + 15 mM KH ₂ PO ₄ + 1,35 M NaCl + 30 mM KCl Für Gebrauch 1:10 verdünnen
Citratpuffer für FISH pH 6,0	18 ml 0,1 M Zitronensäure (= 21,01g C ₆ H ₈ O ₇ xH ₂ O in 1000 ml Aqua dest) + 82 ml 0,1 M Natriumcitrat (= 29,41g C ₆ H ₅ O ₇ xH ₂ O in 1000 ml Aqua dest) ad 1000 ml
Citratpuffer 10 mM für IHC	2,1g Zitronensäuremonohydrat in 920 ml Aqua dest. lösen. Mit 2N Natronlauge auf pH 6,0 einstellen. Aufbewahrung im Kühlschrank
Trispuffer 0,5 M pH 7,6	60,5 g Tris Base Ultrapure in 700 ml Agua dest. lösen. Mit 2N HCl auf pH 7,6 einstellen, ad 1000 ml Aqua dest. Darin 90 g NaCl lösen und in Flaschen füllen. Aufbewahrung bei Raumtemperatur
SSC, pH 5,3	3 M NaCl + 0,3 M Na-Citrat, auf 250 ml mit H ₂ O auffüllen
Pronase E 0,05 %	50 mg Pronase in 100 ml PBS
Hoechst- Gebrauchslösung	7,5 µg/ml PBS

2.2. Methoden

2.2.1. Anfertigung der Schnitte von *Tissue-Microarray* (TMA) Blöcken

Der *Microarray* bietet die Möglichkeit eine Vielzahl von Proben verschiedener Gewebe auf einem Objektträger zu vereinen. Dazu werden die Gewebe in Paraffin eingebettet (Spenderblöcke). Aus diesen werden Zylinder ausgestanzt und in einen leeren Paraffinblock (Empfängerblock) eingesetzt. Von dem Empfängerblock werden Schnitte mit Hilfe des “*Paraffin Aid Sectioning Systems*” angefertigt. So kann ein Experiment Daten über alle Proben liefern, die auf dem Array vertreten sind. Dabei können mehrere hundert Gewebe in einem Array organisiert werden, wodurch auch sichergestellt ist, dass alle Proben auf einem Objektträger die identischen Versuchsbedingungen durchlaufen (KONONEN *et al.* 1998).

In diesem Fall wurden auf dem Objektträger jeweils drei Stanzen (je ein mm Durchmesser) pro Fall aufgebracht. Beim Schneiden wurde ein Klebestreifen („*window tape*“) auf die Anschnittseite des Blockes geklebt und zusammen mit einem 16 µm dicken Schnitt wieder vom Block geschnitten. Klebestreifen und Schnitt wurden mit einem Handroller auf einen mit Klebstoff beschichteten Objektträger aufgerollt. Nach Polymerisierung dieses Klebstoffes unter ultraviolettem Licht kann der Klebestreifen mit Lösungsmittel („*TPC-Solvent*“) wieder entfernt werden. Der Schnitt haftet fest auf dem Objektträger und ist bei 4°C haltbar. Hierdurch ist gewährleistet, dass die Stanzen auch bei mehrfacher Verwendung nicht abschwimmen und dass durch die Mikrowellenbehandlung kein Material verloren geht.

2.2.2. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) der *Microarrays*

1) Entparaffinierung und Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Die Entparaffinierung der TMA-Schnitte erfolgte für zwei mal 20 Minuten in Xylol und für fünf Minuten in Isopropanol. Anschließend erfolgte die Rehydrierung in absteigender Ethanolreihe (100% Ethanol, 90% Ethanol, 70% Ethanol; jeweils fünf Minuten), worauf mit PBS bei Raumtemperatur gespült wurde. Nach zwanzigminütigem Kochen in Citratpuffer (pH 6,0) bei 350 W in der Mikrowelle wurden die Schnitte mit PBS gespült und anschließend fünf Minuten in 0,05% Pronase E bei 37°C inkubiert. Es folgte die Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe (je fünf Minuten 70%, 90%, 100%) bei minus 20°C sowie das Lufttrocknen der Gewebeprobe.

2) Denaturierung und Hybridisierung

Nach Aufbringen von 15 µl der fertigen Sondenlösung auf einen Objektträger wurde das Deckglas (24 mm mal 24 mm) aufgelegt und mit Fixogum versiegelt. Nach Trocknen im Dunkeln erfolgte die simultane Denaturierung der Sonde und des Gewebes für acht Minuten bei 75°C auf der Heizplatte. Anschließend erfolgt die Hybridisierung in feuchter Kammer bei 37°C für mindestens 16 Stunden.

Durch die Denaturierung wird die doppelsträngige DNS in zwei Einzelstränge getrennt, weil die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleinsäurebasen der hohen Temperatur nicht standhalten können. Bei der Hybridisierung macht man sich zu Nutze, dass denaturierte Einzelstränge wieder mit dem Einzelstrang, der die komplementäre Nukleinsäureabfolge hat, renaturieren bzw. hybridisieren. Es entsteht so ein neuer Doppelstrang, der aus einem Einzelstrang mit Sonden-DNS und einem Einzelstrang mit der Ziel-DNS besteht. Bei der Hybridisierung wählt man eine Temperatur unterhalb des Schmelzpunktes der Doppelhelix. Dieser Temperatur können falsch gepaarte Sequenzen auf Grund ihrer schwachen Bindungskräfte nicht standhalten, die Bindungen zwischen richtig gepaarten Sequenzen bleiben stabil.

3) Waschen und Gegenfärben

Nach Entfernung des Fixogums wurde kurz in 2 x SSC/0,3% NP40 bei RT inkubiert, wobei sich auch das Deckglas löste. Anschließend wurden diese unspezifischen Bindungen durch zweiminütiges Inkubieren in 2 x SSC/0,3% NP40 im Wasserbad bei 73 °C ausgewaschen. Es folgte die Kerngegenfärbung für zwei min in Hoechst-33342 Lösung (7,5 µg/ml) bei RT im Dunkeln. Nach abgedunkeltem Lufttrocknen folgte die Eindeckelung in 36 µl Vectashield.

Die Durchführung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung erfolgte in der Abteilung für Analytische Pathologie des Helmholtzzentrums München in Zusammenarbeit mit der medizinisch-technischen Assistentin Ulrike Buchholz sowie mit Dr. rer. nat. Sandra Rauser.

2.2.3. Mikroskopie, Versuchsaufbau und Auswertung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von *EGFR* und Zentromer 7

2.2.3.1. Mikroskopie

Die Aufnahmen wurden mit dem ApoTome Imaging System von Zeiss vorgenommen. Dieses besteht aus folgenden Komponenten

1) Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1:

Der Axio Imager ist ein Fluoreszenzmikroskop mit einem schnellen motorisierten Reflektorrevolver, der bis zu zehn Filtermodule aufnehmen kann. Damit können ohne Zeitverlust und unnötiges Ausbleichen der Gewebe Mehrkanalaufnahmen gemacht werden. Außerdem ist ein präziser, von hochsensiblen Schrittmotoren angetriebener Scanningtisch montiert. Dieser ermöglicht das punktgenaue Ansteuern von Positionen in x-, y- und z- Richtung und damit eine hohe Reproduzierbarkeit. Folgende Filter wurden verwendet (siehe Tabelle 8):

Tabelle 8: Im Axio Imager Z1 verwendete Filter

Fluoreszenzfarbstoff	Anregungsfilter Bandpassfilter [nm]	Farbteiler [nm]	Sperrfilter Langpassfilter [nm]
sGFP (<i>Green fluorescent protein</i>) / FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	450-490	510	520
DsRed	546	580	590
DAPI	365	395	397

2) Software AxioVision: Release 4.5

Als Software wurde Axio Vision Release 4.5 verwendet. Dabei sind vor allem die beiden Module „MosaiX“ und „Mark & Find“ von Bedeutung. Mit dem Modul „MosaiX“ und dem motorisierten xyz-Tisch kann der gesamte TMA dargestellt werden. Er wird großflächig abgescannt, um ein großes zusammengesetztes Bild zu erzeugen. Dieses elektronisch erzielte Präparatbild dient als Orientierungshilfe zur Navigation auf dem Objektträger.

Das Modul „Mark & Find“ dient der Aufzeichnung, Speicherung und dem automatischen Wiederfinden verschiedener Positionen auf dem Tissue *Microarray*.

3) ApoTome Mikroskopeinschub und Kontrollbox

Im ApoTome Modus wird eine Gitterstruktur in die Ebene der Leuchtfeldblende des Auflichtstrahlengangs eingebracht. Die Gitterstruktur wird in der Objektebene scharf abgebildet - deutlich sichtbar beim Blick durch das Okular und im Livebild. Im zweiten Schritt sorgt ein hochgenauer Scanning-Mechanismus für einen definierten Versatz der Gitterstruktur in der Präparatebene. Als nächstes werden in jeder Gitterposition drei Bilder aufgenommen. Da-

raufhin werden diese drei Rohbilder zu einem Ergebnisbild verrechnet. Als Resultat bekommt man einen präzisen optischen Schnitt durch das Präparat indem die Information einer Schnittebene der Gewebeprobe aufgenommen wurde (siehe Abbildung 4).



Abbildung 4: Darstellung des Lichtweges im im ApoTome: Trifft das Anregungslicht auf die Glasplatte, wird die Gitterstruktur in den Anregungsstrahlengang "eingepägt" und in die Fokusebene des verwendeten Objektivs projiziert. Abbildung aus (INTERNETLINK_1).

Mithilfe des ApoTome Imaging Systems ist es möglich verschiedene Fokusebenen eines Präparates als Bilderstapel (Z-Stapel) anzulegen. Dadurch kann auch von dicken Gewebeproben durch Verrechnung der Einzelbilder eine 3D Ansicht generiert werden.

2.2.3.2. Versuchsaufbau und Ablauf des Experiments

Zunächst erfolgte die Kalibrierung der Nullposition in x-, y-, und z-Richtung auf dem Scanningtisch mit Hilfe eines Kalibrierungsslides. Anschließend wurde mit dem Modul „MosaiX“ in 2,5-facher Vergrößerung ein Mosaikbild des TMAs angefertigt, auf dem die Stanzen des gesamten Objektträgers abgebildet waren. Dann wurden pro Tumor 3-7 Blickfelder ausgesucht, in denen mit Sicherheit hauptsächlich invasives Karzinom zu sehen war. Diese Positionen wurden in x- und y- Position in chronologischer Reihenfolge im Modul „Mark & Find“ gespeichert. Es folgte die Einstellung der Belichtungszeiten für die drei verwendeten Kanäle und die Bestimmung der Mitte der z-Ebene der einzelnen Blickfelder. Hierzu wurden im DAPI Kanal die einzelnen Positionen in 63-facher Vergrößerung in z-Richtung „durchfokussiert“. Die Mitte in der z-Ebene wurde in „Mark & Find“ automatisch angezeigt und manuell in die Positionsliste eingetragen. Pro Blickfeld wurden dadurch nicht so viele Einzelbilder angefertigt, was Festplattenspeicherplatz sparte. Zuletzt wurde die Zahl (ca. 50) und Dicke ($0,6 \mu\text{m}$) der Einzelbilder pro Position festgelegt und das Experiment gestartet.

Das System fuhr nun mit dem 63x/NA 1,2 Wasser-Objektiv die einzelnen Positionen in chronologischer Reihenfolge an. Pro Blickfeld wurde ein Bilderstapel angelegt, wobei jedes Einzelbild durch jeden der drei Kanäle belichtet und daraus ein Gesamtbild errechnet wurde.

2.2.3.3. Auswertung, Signalinterpretation und Kontrollen

Die Signalausählung erfolgte bildbasiert mit Hilfe der AxioVision-Software, indem pro Tumor 50 Zellen ausgezählt wurden. In jeder Zelle wurden die Anzahl der roten Signale (*EGFR*) und der grünen Signale (Zentromer 7) gezählt. Das geschah, indem die einzelnen Zellen in den optischen Schichten in der AxioVision Software durchgescrollt wurden. Somit war eine genauere Zählung als in der konventionellen 2D- FISH Darstellung möglich.

Erfasst wurden nur durch die DAPI Kernfärbung morphologisch abgrenzbare Tumorzellen, welche mit Hilfe der 3D Auflösung als einzelne Zellen erkennbar waren. Für die Signalevaluierung wurden die von Hopman et al. etablierten Kriterien angewendet (HOPMAN *et al.* 1988): (a) die ausgewerteten Zellkerne sollten sich nicht überschneiden, bzw. klar voneinander abzutrennen sein, (b) die Zellen sollten nicht durch Zytoplasma überlagert sein, (c) die Fluoreszenzsignale sollten eine weitgehend homogene Intensität haben, (d) fluoreszierende Flecken, welche kleiner sind als die eigentlichen FISH Signale, sollen nicht gewertet werden, (e) nur FISH Signale, die voneinander getrennt sind, sollen gewertet werden und (f) Signale, die als Paare angeordnet sind und sich berühren (gespaltene Signale), sollen als ein Signal gewertet werden. Unter Berücksichtigung dieser Kriterien werden untersucherabhängige Abweichungen als minimal angesehen. Ferner wurden nur Zellen gezählt, die mindestens ein Signal enthielten.

Die Signalinterpretation wurde nach (SAUTER *et al.* 1993a; WALCH *et al.* 2001) durchgeführt (siehe Abbildung 5). Ein Normalbefund wird bei FISH Ergebnissen mit einem Verhältnis von Zentromer und lokusspezifischer Sonde von 1:1 und zugleich ≤ 2 Signale für die Sonde pro Zelle erhoben. Genkopienzahlen von ≥ 2 bis ≤ 4 und < 4 bis ≤ 6 wurden dem „*low-copy*“ Bereich zugeordnet. Ein Gen wurde als amplifiziert gewertet, wenn doppelt so viele aber mindestens ≥ 6 lokusspezifische Signale wie Zentromer Signale vorhanden waren (Ratio ≥ 2). Um starke Amplifikation handelt es sich, wenn mehr als zehn genspezifische Signale vorhanden sind, die sich einzeln oder als so genannte Cluster darstellen (WALCH *et al.* 2001). Die Signale dieser Cluster sind optisch nicht trennbar und somit nicht genau evaluierbar und wurden deshalb in der Statistik als 20 Signale gewertet (ISHIKAWA *et al.* 1997).

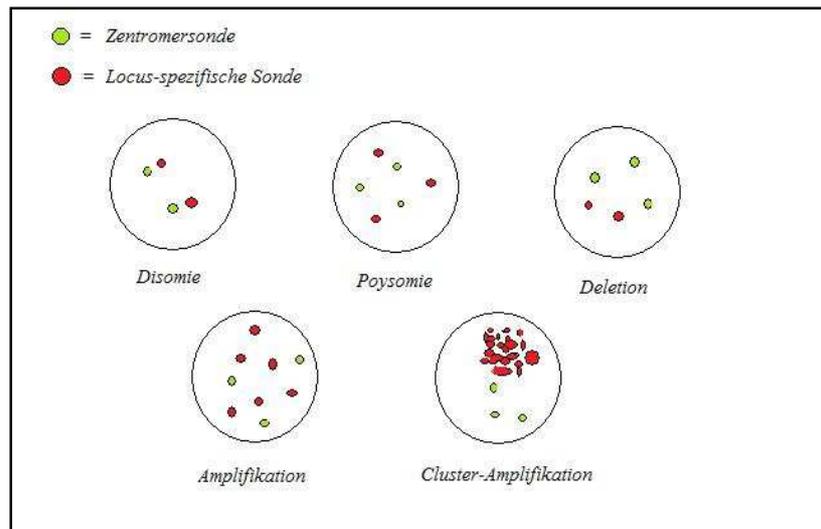


Abbildung 5: Schematische Darstellung der quantitativen Auswertungskriterien der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (modifiziert nach (SAUTER *et al.* 1993b))

Als interne Kontrolle der Effektivität der Hybridisierung wurden Zellkerne von Stromazellen (Lymphozyten und Fibrozyten), die in der Umgebung der Tumorzellen vorlagen, zum Vergleich herangezogen.

Mikroskopie und Auswertung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von *EGFR* und Zentromer 7 erfolgten durch den Doktoranden Botho Hilber.

2.2.4. LSAB-Methode der Immunhistochemie

In dieser Arbeit wurde die LSAB (Labeled Strept Avidin Biotin)-Methode der Immunhistochemie angewendet. Hierbei bindet sich ein biotinylierter Brückenantikörper an den Fc-Teil des Erstantikörpers. Dem Fc-Teil des mit Biotin gekoppelten Zweitantikörpers lagert sich Streptavidin an, an das die Peroxidase direkt gebunden ist. Durch die direkte Anlagerung bleiben alle vier Bindungsstellen des Streptavidins für das am Brückenantikörper vorhandene Biotin frei. Die Peroxidase ruft durch Konversion des Chromogens Diaminobenzidin (DAB) eine Braunfärbung hervor. Die Braunfärbung tritt überall dort auf, wo sich der spezifische Erstantikörper an die antigene Struktur des Proteins gebunden hat.

2.2.4.1. Die immunhistochemische Färbung von EGFR

Die immunhistochemische Färbung von EGFR wurde mit dem EGFR pharmDx™ Kit for Manual Use von DAKO durchgeführt.

2.2.4.2. Die immunhistochemische Färbung von pEGFR, pAkt und pMAPK

1) Vorbehandlung der Schnitte:

Zur Vorbereitung wurden die Schnitte über Nacht in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Es folgte die Entparaffinierung für je zwei mal zehn Minuten in Xylol und anschließend für zwei Minuten in Isopropanol. Als nächstes wurde in absteigender Ethanolreihe (jeweils fünf Minuten in 96%, 70% Ethanol) rehydriert. Mit destilliertem Wasser wurden zuletzt die Alkoholreste entfernt.

Hierauf erfolgte die Antigendemaskierung, um die verlorengegangene Immunreaktivität, der in paraffineingebetteten Gewebe teilweise wieder herzustellen. Durch die Fixierung der Gewebeproben in Paraffin werden Proteine in Zellen zum Teil miteinander quervernetzt. Dadurch können einige Epitope von dem zugehörigen Antikörper nicht mehr erkannt werden. Die "Antigenität" des Proteins wird durch den Fixierungsprozess also geschädigt. Die Quervernetzungen (Maskierungen) können durch die Antigendemaskierung zum Teil wieder rückgängig gemacht werden.

Zur Demaskierung der Präparate für die immunhistochemische Färbung von pEGFR wurden die Objektträger für zwei mal zehn Minuten in 10mM Citratpuffer (pH 6,0) bei 900W in der Mikrowelle gekocht. Die Demaskierung für pAkt und pMAPK erfolgte im Schnellkochtopf für sieben Minuten in 10mM Citratpuffer (pH 6,0). Nach Abkühlen und Spülen aller Präparate mit Trispuffer erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase in 3% H₂O₂ für 15 Minuten. Nach erneutem Spülen mit Trispuffer wurde mit dem Avidin/Biotin-Blockierungs-Kit für jeweils 15 Minuten bei RT inkubiert, um endogen vorhandenes Biotin zu blockieren. Um unspezifischen Bindungen vorzubeugen, wurde das Präparat dann in 5% Ziegen Serum, gelöst in Antikörperverdünnungslösung von DAKO für 60 Minuten bei Raumtemperatur geblockt.

2) Antigen-Antikörperreaktion

Mit der Mischung aus Primärantikörper und Antikörperverdünnungslösung von DAKO (pEGFR 1:100, pAkt 1:250, pMAPK 1:100) wurde für eine Stunde inkubiert und anschließend mit Trispuffer gespült.

3) Antikörpernachweis und Färbereaktion mit REAL-KIT von DAKO:

Mit dem biotinylierten Zweitantikörper (Bottle A) aus dem REAL-Detection-Kit wurde für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach Spülen mit Trispuffer wurde die Streptavidinperoxidase (Bottle B) aus dem REAL-Detection-Kit für 30 Minuten bei RT aufgebracht. Auf erneutes Spülen mit Trispuffer folgte die DAB-Färbung aus dem Real-Kit für sieben Minuten bei RT und erneutes Spülen mit Trispuffer.

4) Gegenfärbung:

Die Gegenfärbung der Präparate erfolgte mit Haemalaun für eine Minuten bei RT woraufhin mit Leitungswasser gespült wurde bis das Wasser klar war. Danach durchliefen die Objektträger die Alkoholreihe in aufsteigender Reihenfolge und wurden eingedeckelt.

Die immunhistochemische Färbung von EGFR, pEGFR, pAkt und pMAPK erfolgte durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. rer. nat. Birgit Luber am Institut für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie der Technischen Universität München.

2.2.4.3. Auswertung der Immunhistochemie

EGFR

Die membranständige Färbung von EGFR wurde folgendermaßen ausgewertet (siehe Abbildung 9):

- Score 0: keine membranständige Färbung
- Score 1+: schwache membranständige Färbung
- Score 2+: moderate membranständige Färbung
- Score 3+: starke membranständige Färbung

pEGFR

Bei pEGFR wurde das Färbeverhalten der Zytoplasmamembran und des Zytoplasmas untersucht, da der verwendete Antikörper Tyr 1086 den phosphorylierten/aktivierten, und damit auch im Zytoplasma lokalisierten Rezeptor nachweist (ENDO *et al.* 2009; NANNINI *et al.* 2011). Die membranständige und/oder zytoplasmatische Färbung wurde folgendermaßen ausgewertet (siehe Abbildung 10):

- Score 0: keine membranständige und/oder zytoplasmatische Färbung
- Score 1+: schwache membranständige und/oder zytoplasmatische Färbung
- Score 2+: moderate membranständige und/oder zytoplasmatische Färbung
- Score 3+: starke membranständige und/oder zytoplasmatische Färbung

pAKT

Die Auswertung der zytoplasmatischen und/oder nukleären Färbung von pAkt in neoplastischen Zellen erfolgte nach einem von Freitas *et al.* vorgeschriebenen Scoringssystem (FREITAS *et al.* 2003) (siehe Abbildung 11):

- Score 0: keine zytoplasmatische und/oder nukleäre Färbung
- Score 1+: schwache zytoplasmatische und/oder nukleäre Färbung
- Score 2+: moderate zytoplasmatische und/oder nukleäre Färbung
- Score 3+: starke zytoplasmatische und/oder nukleäre Färbung

Zum Zwecke der statistischen Analyse wurden Fälle mit Score 0 und 1+ als pAkt-negativ und Fälle mit Score 2+ und 3+ als pAkt-positiv zusammengefasst.

pMAPK

Die zytoplasmatische und/oder nukleäre Färbung von pMAPK in neoplastischen Zellen wurde folgendermaßen ausgewertet (siehe Abbildung 12):

Score 0: keine zytoplasmatische und/oder nukleäre Färbung

Score 1+: schwache zytoplasmatische und/oder nukleäre Färbung

Score 2+: moderate zytoplasmatische und/oder nukleäre Färbung

Score 3+: starke zytoplasmatische und/oder nukleäre Färbung

Zum Zwecke der statistischen Analyse wurden Fälle mit Score 0 und 1+ als pMAPK-negativ und Fälle mit Score 2+ und 3+ als pMAPK-positiv zusammengefasst.

Allgemein wurde bei heterogenen Färbebildern die am stärksten ausgeprägte Tumorkomponente als Grundlage für die Klassifikation verwendet. Als positiv-Kontrollen dienten für alle vier Antikörper histologische Schnitte eines primär resezierten Magenkarzinoms. Als negativ-Kontrollen dienten Schnitte des Barrett-Karzinom-Kollektivs, welchen kein Antikörper zugefügt worden war.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte durch den Doktoranden Botho Hilber nach ausführlicher Einarbeitung durch Prof. Dr. med. Axel Walch, Leiter der Abteilung für Analytische Pathologie des Helmholtzzentrums München

2.2.5. Statistik

Die Korrelationen zwischen den Variablen wurde mit Hilfe des Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten ermittelt. Der zugehörige p-Wert entscheidet, ob die errechnete Korrelation statistisch signifikant ist. Bei einem $p < 0,05$ ist dies der Fall.

Der Einfluss der molekularpathologischen Parameter und klinisch-pathologischen Parameter auf Überlebensdaten wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse ermittelt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Log-Rank-Tests miteinander verglichen. Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand bei $p < 0,05$.

Der Einfluss der klinisch-pathologischen Parameter auf das Gesamt- bzw. rezidivfreie Überleben wurde mithilfe des univariaten Cox-Regressionsmodells berechnet. Auch die multivariaten Analysen wurden mit dem Cox-Regressions-Modell berechnet. Dabei wurden die signifikanten Variablen der univariaten Analyse in das Modell eingeschlossen, wobei die Variablen berücksichtigt wurden, die einen p Wert von $\leq 0,10$ haben. Sowohl bei uni- als auch bei multivariater Analyse wurden p- Werte von $< 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS durch den Doktoranden Botho Hilber in Kooperation mit den Mathematikern Frau Uta Jütting, Mitarbeiterin des Instituts für Biomathematik und Biometrie des Helmholtzzentrums München sowie Herbert Braselmann, Mitarbeiter der Abteilung für Strahlenzytogenetik des Helmholtzzentrums München.

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung der Genkopienzahlen von *EGFR* und Zentromer 7 durch dreidimensionale Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung im Bartrt-Karzinom

3.1.1. Häufigkeitsverteilung der *EGFR*-Genkopienzahlen ($< 2,5$ bis ≥ 6) in der TNM-Klassifikation

Am häufigsten, nämlich in 47,5% der Fälle, weisen Tumoren durchschnittlich $\geq 2,5 - < 4,0$ *EGFR*-Genkopien von pro Zelle auf, was auch in den Kategorien pT1 (58,7%), pT2 (44,0%), pN0 (50,8%), pN1 (43,6%) und M0 (50,0%) der Fall ist. Am zweithäufigsten sind Tumoren mit $\geq 4,0 - < 6,0$ Genkopien (30,5%). Auffallend ist, dass in der Kategorie pT3, also bei fortgeschrittener Ausdehnung des Primärtumors, am häufigsten (42,6%) $\geq 4,0 - < 6,0$ *EGFR*-Genkopien vorkommen, und dass die mit Abstand meisten Tumoren (62,5%), die schon fernmetastasiert haben (Klasse M1) die erhöhte Genkopienzahl von $\geq 4,0 - < 6,0$ *EGFR*-Genkopien aufweisen. Insgesamt weisen nur wenige Tumoren $\geq 6,0$ Genkopien (7,6%) (siehe Abbildung 6) oder $< 2,5$ Genkopien (14,4%) pro Zelle auf (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Ergebnisse der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von *EGFR* an 16 μm dicken Gewebeschnitten mit dreidimensionaler Signalerfassung und einzelbildbasierter Auswertung. Darstellung der Resultate in vier Gruppen ($< 2,5$, $\geq 2,5$ bis $< 4,0$, $\geq 4,0$ bis $< 6,0$, $\geq 6,0$) und deren Verteilung in der TNM-Klassifikation.

Durchschnittliche <i>EGFR</i> -Genkopienzahl					
Genkopienzahl	$< 2,5$	$\geq 2,5 - < 4,0$	$\geq 4,0 - < 6,0$	$\geq 6,0$	total
Anzahl der Patienten (%)	17 (14,4%)	56 (47,5%)	36 (30,5%)	9 (7,6%)	118
Ausdehnung des Primärtumors					
pT1	6 (13,0%)	27 (58,7%)	9 (19,6%)	4 (8,7%)	46
pT2	6 (24,0%)	11 (44,0%)	7 (28,0%)	1 (4,0%)	25
pT3	5 (10,6%)	18 (38,3%)	20 (42,6%)	4 (8,5%)	47
Lymphknotenmetastasen					
pN0	9 (14,3%)	32 (50,8%)	16 (25,4%)	6 (9,5%)	63
pN1	8 (14,5%)	24 (43,6%)	20 (36,4%)	3 (5,5%)	55
Fernmetastasen					
M0	16 (14,5%)	55 (50,0%)	31 (28,2%)	8 (7,3%)	110
M1	1 (12,5%)	1 (12,5%)	5 (62,5%)	1 (12,5%)	8

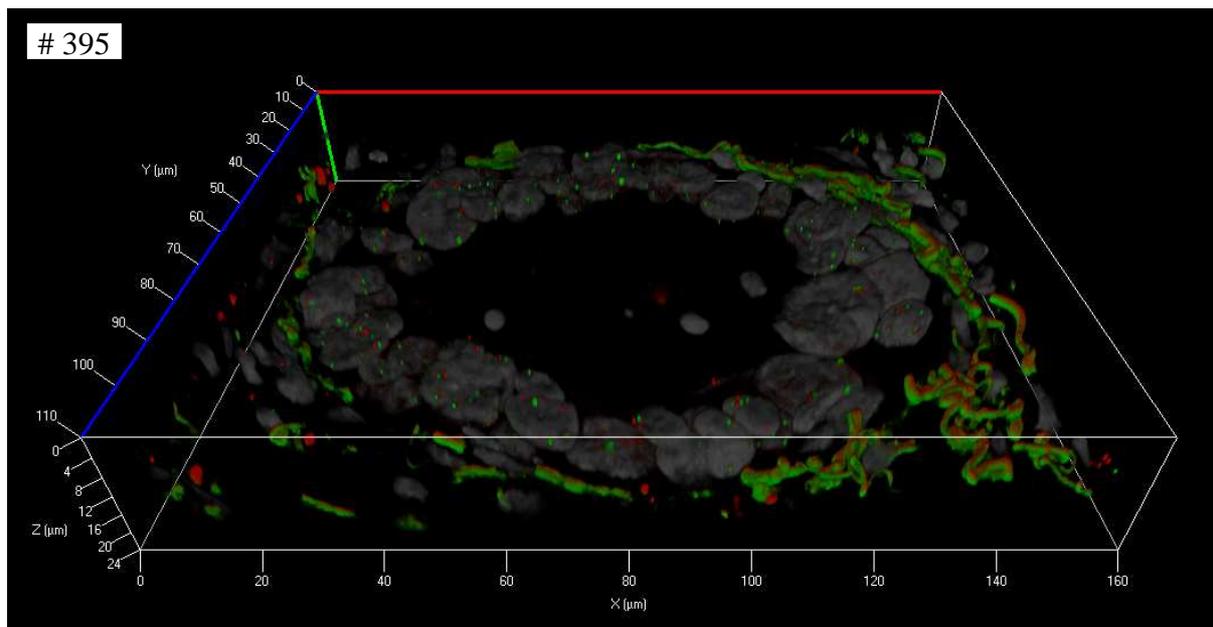


Abbildung 6: Dreidimensionale Projektion eines mikroskopisch generierten Bilderstapels von einem Blickfeld des Falles # 395. Es zeigt sich eine Polysomie von durchschnittlich 9,24 *EGFR*-(rot)- und 7,06 Zentromer 7-(grün)-Signalen pro Zelle. Die im Barrett-Karzinom häufig vorkommende Anordnung der Tumorzellen in runder Drüsenform ist gut zu erkennen.

3.1.2. Häufigkeitsverteilung der Zentromer 7-Genkopiezahlen ($< 2,5$ bis ≥ 6) in der TNM-Klassifikation

Am häufigsten, nämlich in 51,3% der Fälle, weisen die Tumoren durchschnittlich $\geq 2,5 - < 4,0$ Zentromer 7-Genkopien pro Zelle auf, was auch in den Kategorien pT1 (52,2%), pT2 (64,0%), pT3 (43,5%) sowie pN0 (50,8%), pN1 (51,9%) und M0 (54,1%) der Fall ist. Einzig die Tumoren, die schon fernmetastasiert haben (M1), haben am häufigsten $\geq 4,0 - < 6,0$ Zentromer 7- Genkopien pro Zelle (62,5%). Auffällig ist außerdem, dass in pT3 im Vergleich zu den anderen Kategorien der TNM-Klassifikation mehr Fälle (8,7%) mit erhöhter Genkopiezahl zu finden sind (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Ergebnisse der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von Zentromer 7 an 16 µm dicken Gewebeschnitten bei dreidimensionaler Signalerfassung und einzelbildbasierter Auswertung. Darstellung der Resultate in vier Gruppen ($< 2,5$, $\geq 2,5$ bis $< 4,0$, $\geq 4,0$ bis $< 6,0$, $\geq 6,0$) und deren Verteilung in der TNM-Klassifikation.

Durchschnittliche Zentromer 7-Genkopienzahl					
Genkopienzahl	$< 2,5$	$\geq 2,5 - < 4,0$	$\geq 4,0 - < 6,0$	$\geq 6,0$	total
Anzahl der Patienten	21	60	31	5	117
(%)	(17,9%)	(51,3%)	(26,5%)	(4,3%)	
Ausdehnung des Primärtumors					
pT1	8	24	13	1	46
	(17,4%)	(52,2%)	(28,3%)	(2,2%)	
pT2	5	16	4	0	25
	(20,0%)	(64,0%)	(16,0%)	(0,0%)	
pT3	8	20	14	4	46
	(17,4%)	(43,5%)	(30,4%)	(8,7%)	
Lymphknotenmetastasen					
pN0	11	32	18	2	63
	(17,5%)	(50,8%)	(28,6%)	(3,2%)	
pN1	10	28	13	3	54
	(18,5%)	(51,9%)	(24,1%)	(5,6%)	
Fernmetastasen					
M0	19	59	26	5	109
	(17,4%)	(54,1%)	(23,9%)	(4,6%)	
M1	2	1	5	0	8
	(25,0%)	(12,5%)	(62,5%)	(0,0%)	

3.1.3. Häufigkeitsverteilung der Ratio aus *EGFR*- und Zentromer 7-Genkopienzahl in der TNM-Klassifikation

Die Ratio entspricht dem Quotient aus der Anzahl der *EGFR*- und der Zentromer 7-Genkopienzahlen. Ist diese gleich eins entspricht sich die Anzahl der Genkopien. Ist sie größer eins, liegen mehr *EGFR*- als Zentromer 7-Genkopien vor, ist sie kleiner eins liegen weniger *EGFR*- als Zentromer 7-Genkopien vor. Aus der Ratio geht nicht hervor, ob es sich um einen diploiden oder polyploiden Chromosomensatz handelt. So gibt es Fälle in denen pro Zelle zum Beispiel jeweils fünf *EGFR*- und Zentromer 7-Genkopien vorliegen und viele Fälle in denen zwei Signale beider Genloki zu finden sind (siehe Abbildung 7). Die Ratio macht eine Aussage darüber, ob ein Ungleichgewicht zwischen den Genkopienzahlen vorliegt, ob mehr *EGFR*-Signale als Zentromer 7-Signale vorliegen oder umgekehrt. Sie gibt allerdings keine Auskunft über die genaue Signalzahl. Eine Ratio von $\geq 2,0$ wurde als Amplifikation gewertet.

In diesem Patientenkollektiv liegen die meisten Fälle bei einer Ratio von $< 1,1$ (77,8%). Auch in der gesamten TNM-Klassifikation haben die meisten Tumoren diese Ratio. Nur in pT3 zeigen sich größere Genkopienzahl-Unregelmäßigkeiten. Hier haben im Vergleich zu den anderen Kategorien der TNM-Klassifikation prozentual mehr Fälle eine Ratio von $\geq 1,1$

(19,6% mit Ratio $\geq 1,1$ - $< 1,5$, 8,7% mit Ratio $\geq 1,5$ - $< 2,0$ und 4,3% mit Ratio $\geq 2,0$) (siehe Tabelle 11). Eine Clusteramplifikation mit $>>10$ *EGFR*-Genkopien pro Zellkern kommt im gesamten Kollektiv nur einmal vor (siehe Abbildung 8 A und B).

Tabelle 11: Ergebnisse der Ratio aus *EGFR*-/Zentromer 7-Genkopienzahl in vier Gruppen ($< 1,1$ $\geq 1,1$ bis $< 1,5$, $\geq 1,5$ bis $< 2,0$, $\geq 2,0$) und deren Verteilung in der TNM-Klassifikation. Eine Ratio $\geq 2,0$ wurden als Amplifikation gewertet.

Durchschnittliche Ratio aus <i>EGFR</i> und Zentromer 7					
Ratio	< 1,1	$\geq 1,1$ - $< 1,5$	$\geq 1,5$ - $< 2,0$	$\geq 2,0$	total
Zahl der Patienten	91	17	6	3	117
(%)	(77,8%)	(14,5%)	(5,1%)	(2,6%)	
Ausdehnung des Primärtumors					
pT1	38	7	0	1	46
	(82,6%)	(15,2%)	(0,0%)	(2,2%)	
pT2	22	1	2	0	25
	(88,0%)	(4,0%)	(8,0%)	(0,0%)	
pT3	31	9	4	2	46
	(67,4%)	(19,6%)	(8,7%)	(4,3%)	
Lymphknotenmetastasen					
pN0	51	9	2	1	63
	(81,0%)	(14,3%)	(3,2%)	(1,6%)	
pN1	40	8	4	2	54
	(74,1%)	(14,8%)	(7,4%)	(3,7%)	
Fernmetastasen					
M0	86	15	6	2	109
	(78,9%)	(13,8%)	(5,5%)	(1,8%)	
M1	5	2	0	1	8
	(62,5%)	(25,0%)	(0,0%)	(12,5%)	

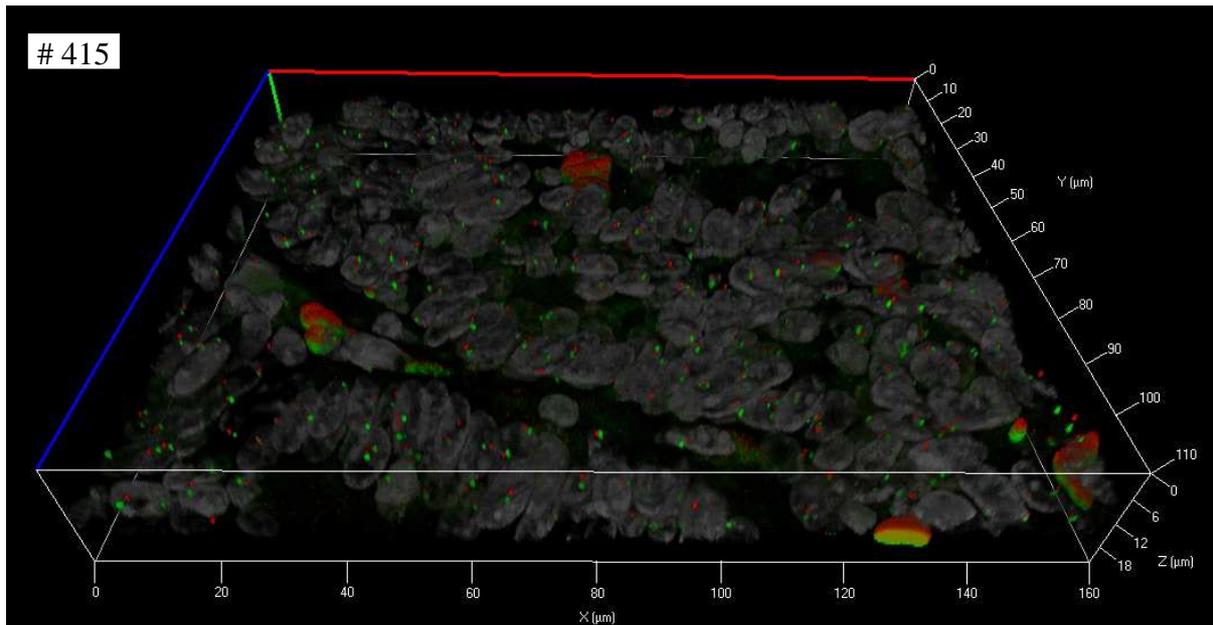


Abbildung 7: Dreidimensionale Projektion eines mikroskopisch generierten Bilderstapels von einem Blickfeld des Falles # 415. Es zeigt sich eine Disomie mit durchschnittlich zwei *EGFR*-(rot)- und zwei Zentromer 7-(grün)-Signalen pro Zelle (Ratio = 1).

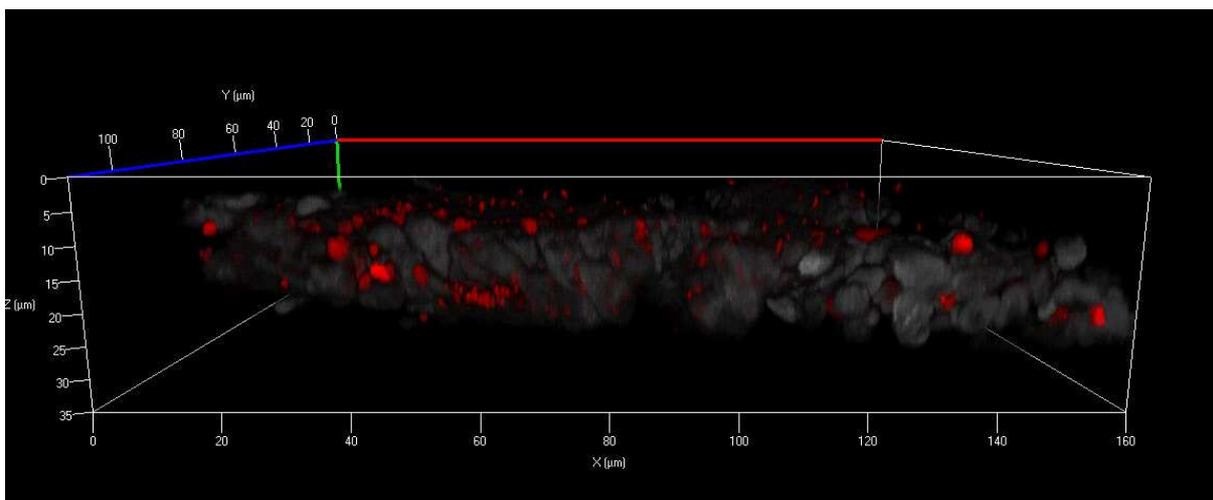


Abbildung 8 A: Dreidimensionale Projektion eines mikroskopisch generierten Bilderstapels von einem Blickfeld des Falles # 376. Es zeigt sich die in diesem Kollektiv nur einmal vorkommende Clusteramplifikation mit $\gg 10$ *EGFR*-(rot)-Signalen pro Zelle. Die Zentromer 7-Signale sind zur besseren Darstellbarkeit ausgeblendet. Die optisch nicht trennbaren *EGFR*-Signale bilden Cluster und wurden in der Auswertung als 20 Signale pro Zelle gewertet. In der Abbildung ist erkennbar, dass der gesamte Gewebeschnitt mit einer Dicke von 16 μm erfasst ist.

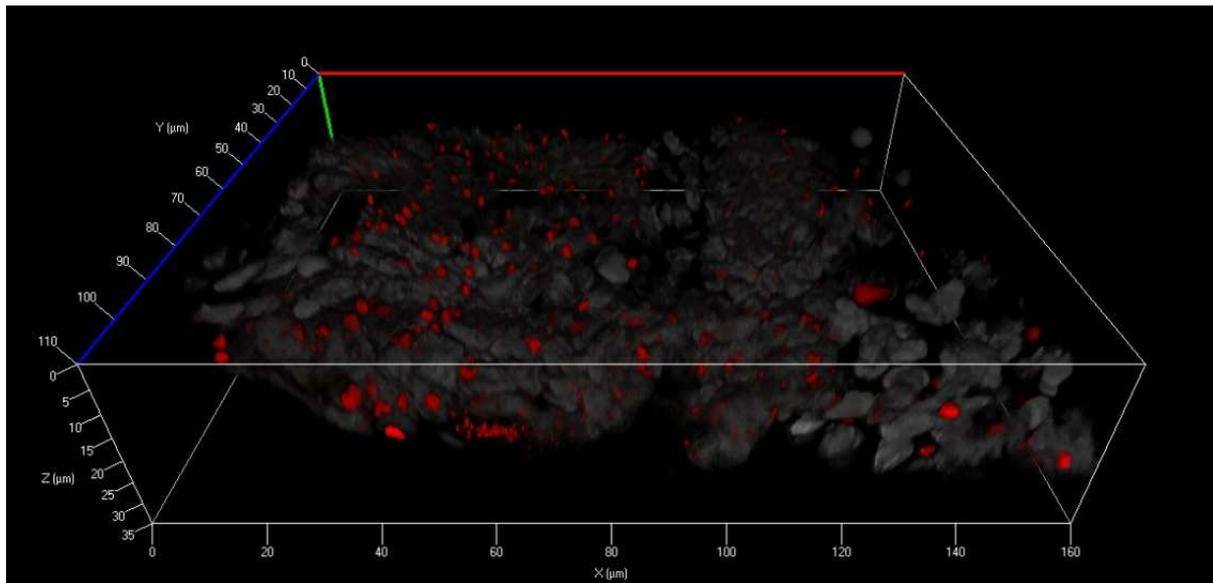


Abbildung 8 B: Dreidimensionale Projektion eines mikroskopisch generierten Bilderstapels von einem Blickfeld des Falles # 376. Es zeigt sich die in diesem Kollektiv nur einmal vorkommende Clusteramplifikation mit $\gg 10$ *EGFR*-(rot)-Signalen pro Zelle. Die Zentromer 7-Signale sind zur besseren Darstellbarkeit ausgeblendet. Die optisch nicht trennbaren *EGFR*-Signale bilden Cluster und wurden in der Auswertung als 20 Signale pro Zelle gewertet. Abbildung 8B zeigt dasselbe Blickfeld wie Abbildung 8A aber aus der Sicht von vorne oben.

3.2. Häufigkeitsverteilung des Expressionsstatus von EGFR, pEGFR, pAkt und pMAPK in der TNM-Klassifikation

3.2.1. Häufigkeitsverteilung des Expressionsstatus von EGFR in der TNM-Klassifikation

Die Proteinexpression von EGFR wurde per Immunhistochemie (IHC) bei 111 Fällen gemessen und ausgewertet. Dabei wurde jedem Tumor ein Expressionsscore zugeordnet (Score 0, 1+, 2+, 3+) (siehe Abbildung 9). Die meisten Tumoren haben einen IHC-Score 0 (80,2%). Auch in allen Kategorien der TNM-Klassifikation haben die meisten Tumoren den IHC-Score 0. Allerdings ist auffällig, dass in pT3 jeweils 6,4% der Fälle einen mit IHC-Score von 2+ und 3+ haben, und dass 21,3% der Fälle den IHC-Score von 1+ aufweisen. Von den Tumoren mit Lymphknotenmetastasierung haben 5,5% den IHC-Score von 2+ und 3+ und 25% der Tumoren mit Fernmetastasen haben den IHC-Score 3+ (siehe Tabelle12).

Tabelle 12: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von EGFR (aufgeteilt in Expressionsscores 0, 1+, 2+, 3+) und deren Verteilung in der TNM-Klassifikation

Durchschnittlicher Proteinexpressions-Score von EGFR					
Score	0	1+	2+	3+	total
Anzahl der Patienten	89	16	3	3	111
(%)	(80,2%)	(14,4%)	(2,7%)	(2,7%)	
Ausdehnung des Primärtumors					
pT1	38	3	0	0	41
	(92,7%)	(7,3%)	(0,0%)	(0,0%)	
pT2	20	3	0	0	23
	(87,0%)	(13,0%)	(0,0%)	(0,0%)	
pT3	31	10	3	3	47
	(66,0%)	(21,3%)	(6,4%)	(6,4%)	
Lymphknotenmetastasen					
pN0	48	8	0	0	56
	(85,7%)	(14,3%)	(0,0%)	(0,0%)	
pN1	41	8	3	3	55
	(74,5%)	(14,5%)	(5,5%)	(5,5%)	
Fernmetastasen					
M0	84	15	3	1	103
	(81,6%)	(14,6%)	(2,9%)	(1,0%)	
M1	5	1	0	2	8
	(62,5%)	(12,5%)	(0,0%)	(25,0%)	

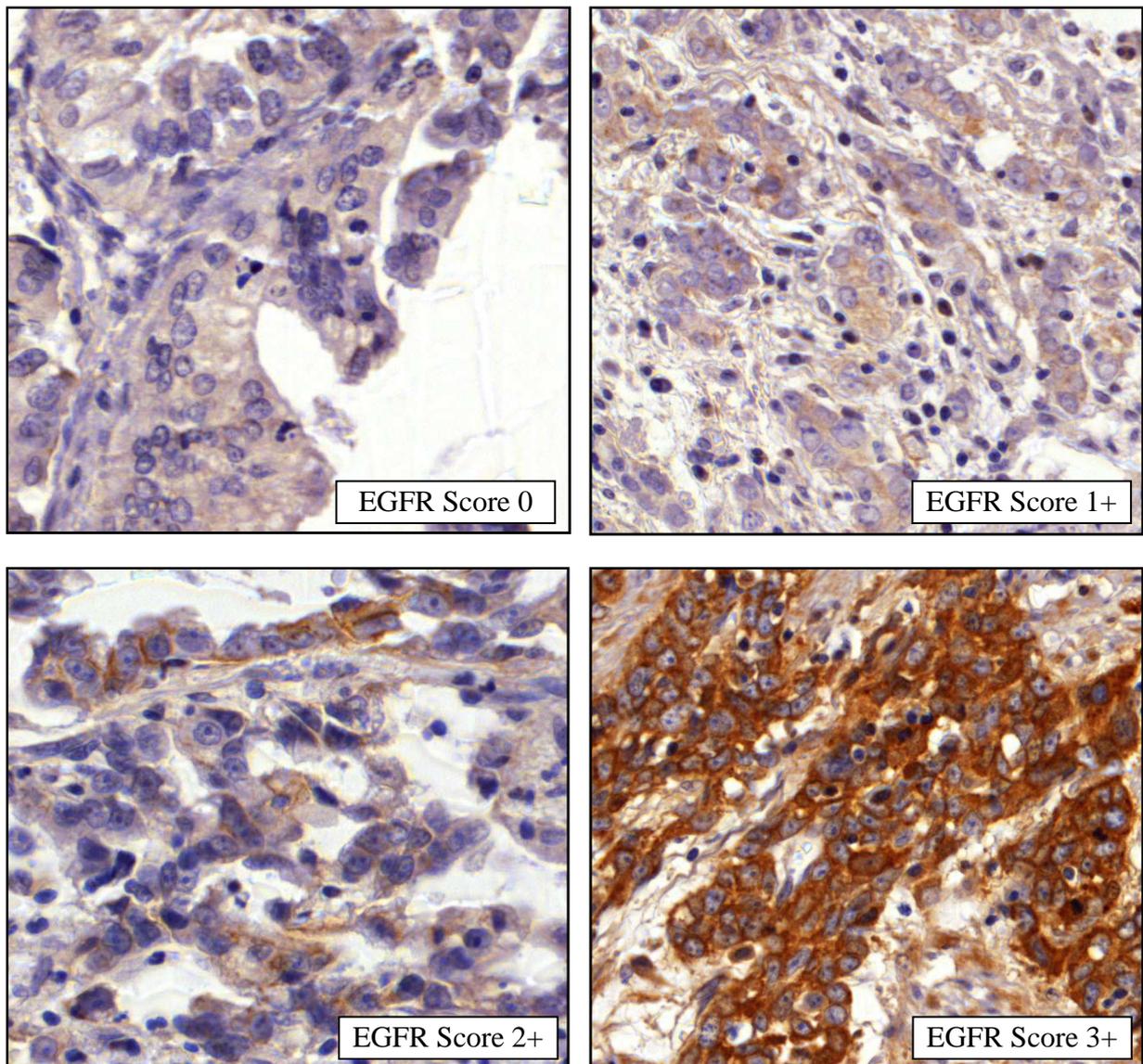


Abbildung 9: vier exemplarische Blickfelder für EGFR-Expressionsscores 0, 1+, 2+, 3+. Die Aufnahmen wurden mit einem Durchlichtmikroskop bei 63-facher Vergrößerung angefertigt.

3.2.2. Häufigkeitsverteilung des Expressionsstatus von pEGFR in der TNM-Klassifikation

Die Auswertung erfolgte an insgesamt 98 Fällen. In fast allen Kategorien der TNM Klassifikation haben die meisten Tumoren einen Expressionsscore von 0. Nur in pT1(46,9%) und pN0 (53,3%) entspricht die größte Gruppe Score 1+ (siehe Tabelle 13 und Abbildung 10).

Tabelle 13: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von pEGFR (aufgeteilt in Expressionsscores 0, 1+, 2+, 3+) und deren Korrelation zu den Parametern der pTNM-Klassifikation

Durchschnittlicher Proteinexpressions-Score von pEGFR					
Score	0	1+	2+	3+	total
Anzahl der Patienten	41	36	16	5	98
(%)	(41,8%)	(36,7%)	(16,3%)	(5,1%)	
Ausdehnung des Primärtumors					
pT1	8 (25,0%)	15 (46,9%)	7 (21,9%)	2 (6,3%)	32
pT2	12 (57,1%)	4 (19,0%)	4 (19,0%)	1 (4,8%)	21
pT3	21 (46,7%)	17 (37,8%)	5 (11,1%)	2 (4,4%)	45
Lymphknotenmetastasen					
pN0	11 (24,4%)	24 (53,3%)	8 (17,8%)	2 (4,4%)	45
pN1	30 (56,6%)	12 (22,6%)	8 (15,1%)	3 (5,7%)	53
Fernmetastasen					
M0	37 (41,1%)	35 (38,9%)	14 (15,6%)	4 (4,4%)	90
M1	4 (50,0%)	1 (12,5%)	2 (25,0%)	1 (12,5%)	8

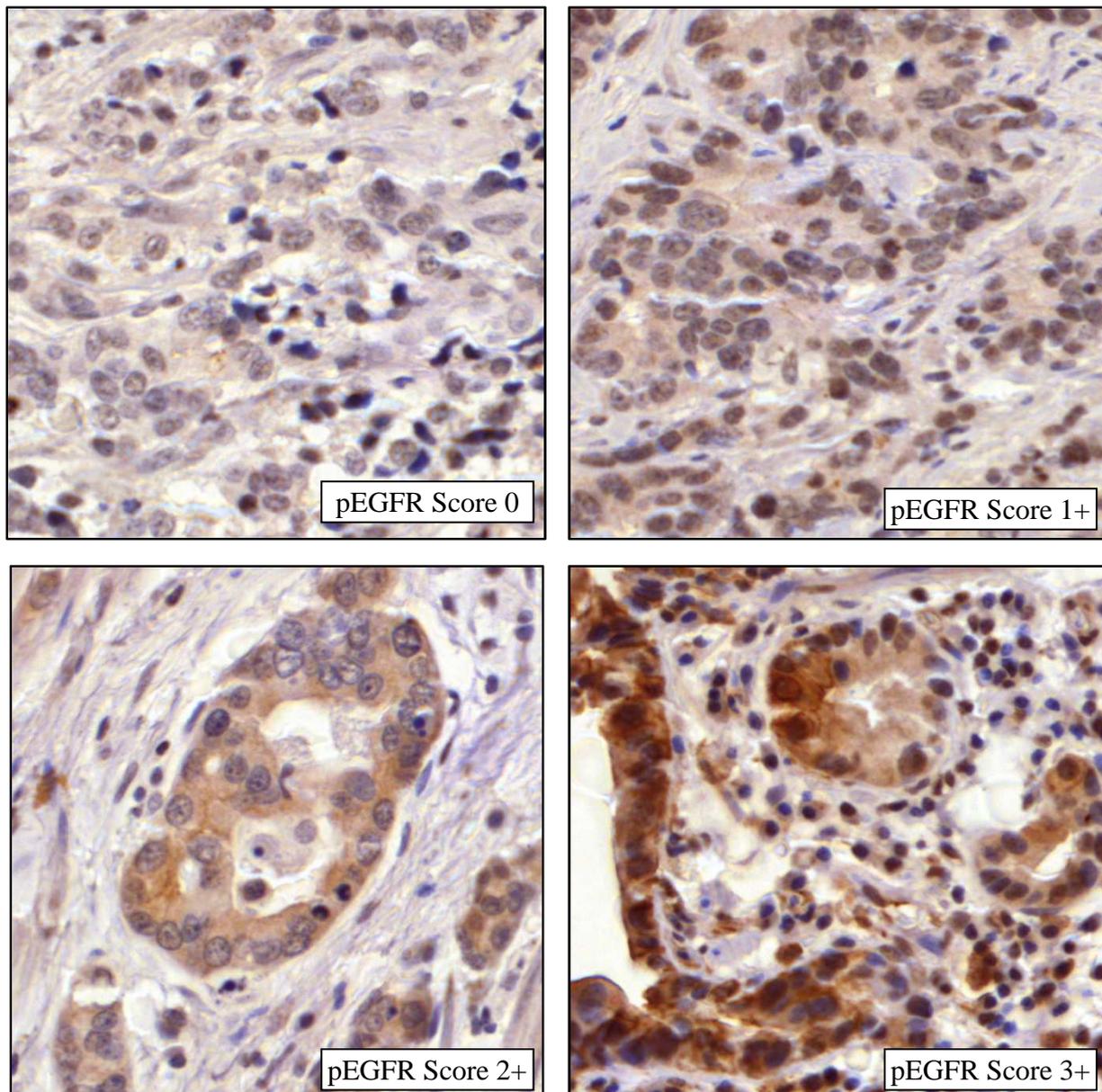


Abbildung 10: vier exemplarische Blickfelder für die pEGFR-Expressionsscores von 0, 1+, 2+, 3+. Die Aufnahmen wurden mit einem Durchlichtmikroskop bei 63-facher Vergrößerung angefertigt.

3.2.3. Häufigkeitsverteilung des Expressionsstatus von pAkt in der TNM-Klassifikation

Bei den insgesamt 102 ausgewerteten Barrett-Karzinomen fällt auf, dass die Tumoren im Vergleich zu EGFR und pEGFR mehr pAkt exprimieren. So haben 45,1% der Tumoren einen IHC-Score von 2+ und 9,8% einen Score von 3+. In pT1 haben 63,6% einen IHC-Score von 2+. 50,2% aus pT2 und 19 aus 42,2% aus pT3 wurden Score 1+ zugeordnet. Tumore, die noch keine Lymphknotenmetastasen abgesetzt hatten, haben in der Mehrzahl der Fälle (53,1%) einen Score von 2+ und sowohl die Fälle mit, als auch ohne Fernmetastasen haben in der Mehrzahl der Fälle einen Score von 2+ (M0 43,6%; M1 62,5%) (Siehe Tabelle 14 und Abbildung 11).

Tabelle 14: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von pAkt (aufgeteilt in vier Scores: 0, 1+, 2+, 3+) und deren Korrelation zu den Parametern der pTNM-Klassifikation.

Durchschnittlicher Proteinexpressions-Score von pAkt					
Score	0	1+	2+	3+	total
Anzahl der Patienten	8	38	46	10	102
(%)	(7,8%)	(37,3%)	(45,1%)	(9,8%)	
Ausdehnung des Primärtumors					
pT1	2 (6,1%)	7 (21,2%)	21 (63,6%)	3 (9,1%)	33
pT2	1 (4,2%)	12 (50,0%)	9 (37,5%)	2 (8,3%)	24
pT3	5 (11,1%)	19 (42,2%)	16 (35,6%)	5 (11,1%)	45
Lymphknotenmetastasen					
pN0	4 (8,2%)	14 (28,6%)	26 (53,1%)	5 (10,2%)	49
pN1	4 (7,5%)	24 (45,3%)	20 (37,7%)	5 (9,4%)	53
Fernmetastasen					
M0	8 (8,5%)	35 (37,2%)	41 (43,6%)	10 (10,6%)	94
M1	0 (0,0%)	3 (37,5%)	5 (62,5%)	0 (0,0%)	8

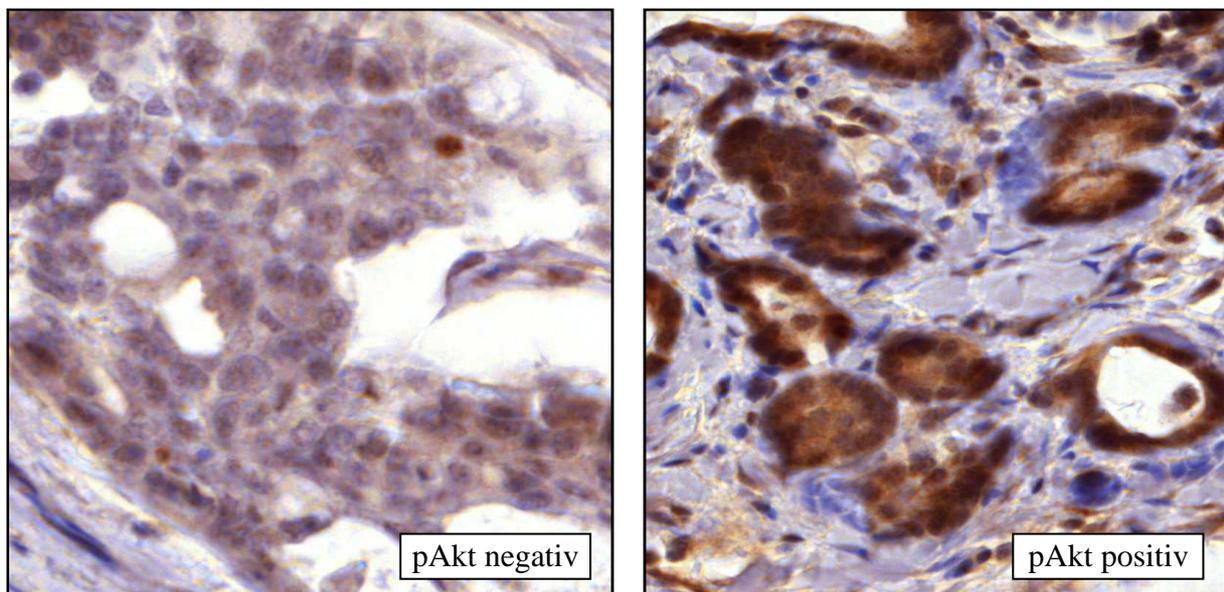


Abbildung 11: Beispiele für ein pAkt-negatives (Score 0 und 1+) und ein pAkt-positives (Score 2+ und 3+) Barrett-Karzinom (entsprechend der Darstellung in den Kaplan-Maier-Kurven siehe Abbildung 18 und 19). Die Aufnahmen wurden mit einem Durchlichtmikroskop in 63-facher Vergrößerung angefertigt.

3.2.4. Häufigkeitsverteilung des Expressionsstatus von pMAPK in der TNM-Klassifikation

In den insgesamt 100 ausgewerteten Fällen wird die pMAPK-Expression in allen Kategorien der pTNM-Klassifikation am häufigsten Score 1+ zugeordnet (siehe Tabelle 15 und Abbildung 12).

Tabelle 15: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von pMAPK (aufgeteilt in Expressionsscores 0, 1+, 2+, 3+) in Korrelation zu den Parametern der pTNM-Klassifikation.

Durchschnittlicher Proteinexpressions-Score von pMAPK					
Score	0	1+	2+	3+	total
Anzahl der Patienten (%)	31 (31,0%)	46 (46,0%)	18 (18,0%)	5 (5,0%)	100
Ausdehnung des Primärtumors					
pT1	10 (30,3%)	12 (36,4%)	10 (30,3%)	1 (3,0%)	33
pT2	6 (27,3%)	11 (50,0%)	3 (13,6%)	2 (9,1%)	22
pT3	15 (33,3%)	23 (51,1%)	5 (11,1%)	2 (4,4%)	45
Lymphknotenmetastasen					
pN0	14 (29,2%)	22 (45,8%)	10 (20,8%)	2 (4,2%)	48
pN1	17 (32,7%)	24 (46,2%)	8 (15,4%)	3 (5,8%)	52
Fernmetastasen					
M0	30 (32,6%)	40 (43,5%)	17 (18,5%)	5 (5,4%)	92
M1	1 (12,5%)	6 (75,0%)	1 (12,5%)	0 (0,0%)	8

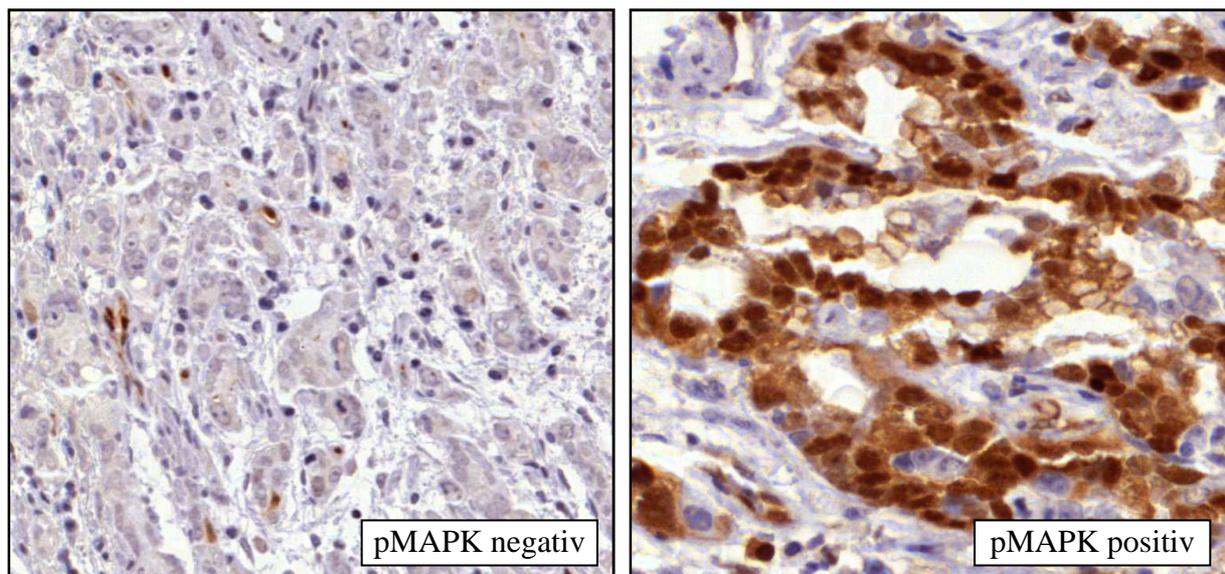


Abbildung 12: Beispiele für ein pMAPK-positives und ein pMAPK-negatives Barrett-Karzinom. Die Aufnahmen wurden mit einem Durchlichtmikroskop in 63-facher Vergrößerung angefertigt.

3.3. Korrelationen zwischen molekularpathologischen und klinisch-pathologischen Parametern

3.3.1. Korrelationen von *EGFR*- und Zentromer 7-Genkopienzahlen sowie der Ratio der beiden mit klinisch-pathologischen Parametern

Es zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen der *EGFR*-Genkopienzahl und der Ausdehnung des Primärtumors ($p = 0,0193$), dem Auftreten von Fernmetastasen ($p = 0,0058$) und dem Resektionsstatus ($p = 0,0177$) (siehe Tabelle 16). Je mehr *EGFR*-Genkopienzahlen demnach durchschnittlich pro Tumorzelle zu finden sind, desto weiter war das Karzinom in seiner Ausdehnung vorangeschritten, hatte mit erhöhter Wahrscheinlichkeit fernmetastasiert und war häufiger nicht R0 reseziert worden. Kein Zusammenhang besteht zwischen *EGFR*-Genkopienzahlen und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, dem Differenzierungsgrad des Tumors (Grading) und der UICC Klassifikation.

Zwischen der Anzahl der Zentromer 7-Genkopienzahlen und klinisch-pathologischen Parametern besteht keine Korrelation (siehe Tabelle 16).

Eine signifikante Korrelation besteht zwischen der Ratio aus *EGFR*- und Zentromer 7-Genkopienzahlen und dem Auftreten von Fernmetastasen ($p = 0,0014$) sowie dem Resektionsstatus ($p = 0,0211$). Patienten, deren Primärtumoren eine *EGFR*/Zentromer 7-Ratio von $>1,1$ aufweisen, hatten demnach mit größerer Wahrscheinlichkeit schon Fernmetastasen abgesetzt und waren mit größerer Wahrscheinlichkeit nicht R0 reseziert worden (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Korrelationen zwischen Genkopienzahlen von *EGFR* und Zentromer 7 und deren Ratio mit klinisch-pathologischen Parametern

CC = Korrelationskoeffizient p = p-Wert		<i>EGFR</i>	Zentromer 7	Ratio <i>EGFR/Zentromer 7</i>
Ausdehnung des Primärtumors				
pT	CC	0,21516	0,12041	0,15001
	p	0,0193	0,1959	0,1064
Lymphknotenmetastasen				
pN	CC	0,10381	-0,00496	0,12429
	p	0,2633	0,9577	0,1818
Fernmetastasen				
M	CC	0,23247	0,01161	0,29254
	p	0,0058	0,9011	0,0014
Resektionsstatus				
R	CC	0,21893	0,03001	0,21393
	p	0,0177	0,7491	0,0211
Grading				
G	CC	-0,02537	0,02154	-0,04355
	p	0,7860	0,8184	0,6425
UICC Stadium				
UICC	CC	0,1799	0,03847	0,17981
	p	0,0512	0,6805	0,0524

3.3.2. Korrelationen zwischen der Proteinexpression von EGFR, pEGFR, pMAPK und pAkt und klinisch-pathologischen Parametern

Eine signifikante positive Korrelation ergibt sich zwischen der EGFR-Proteinexpression und der Ausdehnung des Primärtumors ($p = 0,0009$), dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen ($p = 0,0318$), dem Auftreten von Fernmetastasen ($p = 0,0058$), dem Resektionsstatus ($p < 0,0001$) und dem UICC-Stadium ($p = 0,0055$). Einzig mit dem Grad der Differenzierung des Gewebes besteht keine Korrelation ($p=0,2372$) (siehe Tabelle 17).

Weder die Proteinexpression von pEGFR, noch von pAkt (aufgeteilt in Score 0, 1+, 2+, 3+) oder pMAPK korreliert mit einem der klinisch-pathologischen Parameter.

Tabelle 17: Korrelation zwischen EGFR-, pEGFR-, pAkt- und pMAPK-Proteinexpression und klinisch-pathologischen Parametern

CC = Korrelationskoeffizient p = p-Wert		EGFR	pEGFR	pAkt	pMAPK
Ausdehnung des Primärtumors					
pT	CC	0,31142	-0,17349	-0,15883	-0,10518
	p	0,0009	0,0876	0,112	0,2976
Lymphknotenmetastasen					
pN	CC	0,20492	-0,18499	-0,10496	-0,03472
	p	0,0318	0,0682	0,2938	0,7316
Fernmetastasen					
M	CC	0,26135	0,05227	0,02126	0,01066
	p	0,0058	0,6093	0,832	0,9162
Resektionsstatus					
R	CC	0,44896	-0,04492	0,0715	0,01079
	p	< 0,0001	0,6622	0,4774	0,9156
Grading					
G	CC	0,11415	0,04977	-0,00323	0,11473
	p	0,2372	0,6283	0,9744	0,2582
UICC Stadium					
UICC	CC	0,26299	-0,15881	-0,09577	-0,0386
	p	0,0055	0,1183	0,3383	0,703

3.3.3. Korrelationen von pAkt-Proteinexpressionen in zwei Gruppen mit klinisch-pathologischen Parametern

Als Berechnungsgrundlage dienten hier die Expressionsscores von pAkt in zwei Gruppen. pAkt negativ (Gruppe 1) entspricht den IHC-Scores von 0 und 1+ und pAkt positiv (Gruppe 2) entspricht den IHC-Scores 2+ und 3+. Bei dieser Einteilung ergibt sich eine negative Korrelation zwischen pAkt-Expression und der Ausdehnung des Primärtumors ($p = 0,0277$) (siehe Tabelle 18). Ein Tumor mit geringer Tumorausdehnung exprimiert demnach mehr pAkt, als einer, der in seiner Ausdehnung schon weiter fortgeschritten ist.

Tabelle 18: Korrelation von pAkt-Proteinexpression in zwei Gruppen (Gruppe 1: Score 0 und 1+; Gruppe 2: Score 2+ und 3+) mit klinisch-pathologischen Parametern

CC = Korrelationskoeffizient p = p-Wert		pAkt-IHC			
Ausdehnung des Primärtumors			Resektionsstatus		
pT	CC	-0,21801	R	CC	0,02862
	p	0,0277		p	0,7763
Lymphknotenmetastasen			Grading		
pN	CC	-0,16161	G	CC	-0,05755
	p	0,1046		p	0,5676
Fernmetastasen			UICC Stadium		
M	CC	0,04455	UICC	CC	-0,14115
	p	0,6566		p	0,1571

3.3.4. Korrelationen der klinisch-pathologischen Parameter untereinander

Es liegt eine Korrelation der einzelnen klinisch-pathologischen Parameter untereinander vor. Einzig der Grad der Tumordifferenzierung (G) und Auftreten von Fernmetastasen (M) korrelieren nicht miteinander ($p = 0,2479$) (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter untereinander.

CC = Korrelationskoeffizient p = p-Wert		pT	pN	M	R	G	UICC
Ausdehnung des Primärtumors							
pT	CC	-	0,62719	0,22616	0,48540	0,34295	0,72040
	p		< 0,0001	0,0051	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Lymphknotenmetastasen							
pN	CC	0,62719	-	0,27872	0,35335	0,32020	0,92165
	p	< 0,0001		0,0005	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Fernmetastasen							
M	CC	0,22616	0,27872	-	0,34740	0,09492	0,51961
	p	0,0051	0,0005		< 0,0001	0,2479	< 0,0001
Resektionsstatus							
R	CC	0,48540	0,35335	0,34740	-	0,22247	0,42906
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001		0,0064	< 0,0001
Grading							
G	CC	0,34295	0,32020	0,09492	0,22247	-	0,33621
	p	< 0,0001	< 0,0001	0,2479	0,0064		< 0,0001
UICC Stadium							
UICC	CC	0,72040	0,92165	0,51961	0,42906	0,33621	-
	p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	

3.3.5. Korrelationen der Parameter *EGFR*-Genkopienzahl, Zentromer 7-Genkopienzahl, *EGFR*-, *pEGFR*-, *pAkt*- und *pMAPK*-Proteinexpression untereinander

Die Genkopienzahlen von *EGFR* korrelieren mit den Zahlen von Zentromer 7 ($p < 0,0001$), der Ratio aus *EGFR* und Zentromer 7 ($p < 0,0001$) sowie dem Expressionsstatus von *EGFR* ($p < 0,0001$). Die Ratio aus *EGFR* und Zentromer 7 korreliert mit der Expression von *EGFR* ($p < 0,0001$) und *pEGFR* ($p = 0,0450$) (siehe Tabelle 20).

Zwischen der Expression von *EGFR* und der Expression der nachgeschalteten Proteine liegt einzig eine negative Korrelation zu *pAkt* vor ($p = 0,0048$). Allerdings besteht ein Zusammenhang zwischen *pEGFR* und *pAkt* ($p = 0,0013$) sowie *pMAPK* ($p < 0,0001$). Auch die Expressionen von *pAkt* und *pMAPK* ($p < 0,0001$) korrelieren miteinander (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Korrelation der molekularpathologischen Parameter untereinander

CC = Korrelationskoeffizient p = p-Wert		CEP 7-FISH	EGFR/CEP 7-FISH	pAkt-IHC	pMAPK-IHC	pEGFR-IHC	EGFR-IHC	EGFR-FISH
CEP 7-FISH	CC		-0,17886	0,05712	0,06429	-0,11675	0,08254	0,45483
	p	-	0,0537	0,5705	0,5272	0,2548	0,3958	< 0,0001
EGFR/CEP 7-FISH	CC	-0,17886		-0,08876	-0,02674	0,20403	0,42313	0,78303
	p	0,0537	-	0,3774	0,7928	0,0450	< 0,0001	< 0,0001
pAkt-IHC	CC	0,05712	-0,08876		0,46018	0,32244	-0,20211	-0,02883
	p	0,5705	0,3774	-	< 0,0001	0,0013	0,0448 n.K.	0,7736
pMAPK-IHC	CC	0,06429	-0,02674	0,46018		0,41997	-0,01406	0,02337
	p	0,5272	0,7928	< 0,0001	-	< 0,0001	0,8907	0,8175
pEGFR-IHC	CC	-0,11675	0,20403	0,32244	0,41997		0,07992	0,13319
	p	0,2548	0,0450	0,0013	< 0,0001	-	0,4389	0,1911
EGFR-IHC	CC	0,08254	0,42313	-0,20211	-0,01406	0,07992		0,46428
	p	0,3958	< 0,0001	0,0448 n.K.	0,8907	0,4389	-	< 0,0001
EGFR-FISH	CC	0,45483	0,78303	-0,02883	0,02337	0,13319	0,46428	
	p	< 0,0001	< 0,0001	0,7736	0,8175	0,1911	< 0,0001	-

n.K. = negative Korrelation

3.4. Uni- und multivariate Analyse bezüglich des Einflusses von klinisch- und molekular-pathologischen Parametern auf das Überleben der Patienten

3.4.1. Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten

Gemäß der univariaten Analyse korrelieren die Ausdehnung des Primärtumors ($p < 0,0001$), das Auftreten von Lymphknotenmetastasen ($p < 0,0001$), das Auftreten von Fernmetastasen ($p = 0,0016$), der Resektionsstatus ($p < 0,0001$), die UICC-Klassifikation ($p < 0,0001$), die pAkt-Proteinexpression ($p = 0,0329$) sowie die EGFR-Proteinexpression ($p < 0,0001$) mit dem Gesamtüberleben der Patienten. Gemäß der multivariaten Analyse sind neben der UICC-Klassifikation ($p < 0,0001$) auch EGFR-Proteinexpression ($p < 0,0001$) und *EGFR*-Genkopienzahlen ($p = 0,0180$) unabhängige Variablen zur Abschätzung des Gesamtüberlebens (siehe Tabelle 21).

3.4.2. Einfluss auf das rezidivfreie Überleben der Patienten

Gemäß der univariaten Analyse korrelieren die Ausdehnung des Primärtumors ($p < 0,0001$), das Auftreten von Lymphknotenmetastasen ($p < 0,0001$), das Auftreten von Fernmetastasen ($p < 0,0008$), der Resektionsstatus ($p < 0,0001$), die UICC-Klassifikation ($p < 0,0001$), die

pAkt-Proteinexpression ($p = 0,0274$) sowie die EGFR-Proteinexpression ($p < 0,0001$) mit dem rezidivfreiem Überleben der Patienten. Gemäß der multivariaten Analyse ist neben der UICC-Klassifikation ($p < 0,0001$) auch die EGFR-Proteinexpression ($p = 0,002$) eine unabhängige Variable zur Abschätzung des rezidivfreien Überlebens der Patienten. Die *EGFR*-Genkopienzahl zeigt grenzwertige Signifikanz bezüglich der Dienlichkeit als unabhängige Variable zur Abschätzung des rezidivfreien Überlebens ($p = 0,06$) (siehe Tabelle 21). Die identischen klinisch-pathologischen Parameter beeinflussen demnach sowohl das Gesamt-, als auch das rezidivfreie Überleben der Patienten.

Tabelle 21: Einfluss von klinisch-pathologischen Parametern der TNM-Klassifikation, Genkopienzahl von *EGFR* und Zentromer 7 sowie des Expressionsstatus von EGFR, pEGFR, pMAPK und pAkt auf das Überleben der Patienten

Univariate Analyse	Rezidivfreies Überleben			Gesamtüberleben			
	Variable	p-Wert	HR	95% CI	p-Wert	HR	95% CI
	pT	<0,0001	2,0	1,5-2,7	<0,0001	2,1	1,5-2,8
	pN	<0,0001	3,5	2,1-5,9	<0,0001	3,6	2,1-6,0
	M	<0,0008	4,1	1,8-9,2	0,0016	3,7	1,6-8,2
	G	0,0762	1,5	1,0-2,4	0,0834	1,5	0,9-2,4
	R	<0,0001	3,8	2,2-6,6	<0,0001	4,2	2,4-7,2
	UICC	<0,0001	2,0	1,5-2,5	<0,0001	1,9	1,5-2,5
	EGFR-FISH	0,5156	1,0	0,9-1,2	0,7792	1,0	0,9-1,2
	CEP 7	0,6019	0,9	0,8-1,2	0,3499	0,9	0,7-1,1
	EGFR/CEP 7	0,1976	1,2	0,9-1,5	0,2486	1,1	0,9-1,4
	pAkt-IHC	0,0274	0,6	0,3-0,9	0,0329	0,6	0,3-1,0
	pMAPK-IHC	0,4673	0,8	0,4-1,5	0,2120	0,6	0,3-1,3
	pEGFR-IHC	0,9303	1,0	0,5-1,9	0,9474	1,0	0,5-2,0
	EGFR-IHC	<0,0001	2,3	1,6-3,2	<0,0001	2,1	1,5-3,0
Multivariate Analyse							
	UICC	<0,0001	1,9	1,5-2,5	<0,0001	2,0	1,5-2,6
	EGFR-IHC	0,002	1,8	1,3-2,6	<0,0001	2,4	1,6-3,6
	EGFR-FISH	0,06	0,9	0,8-1,0	0,0180	0,9	0,8-1,0

3.5. Einfluss von *EGFR*-Genkopienzahl, EGFR-, pAkt- sowie pEGFR-Proteinexpression auf das Überleben der Patienten; Kaplan Meier-Analyse

Mit Kaplan Meier-Überlebensanalysen wurden die Zusammenhänge zwischen *EGFR*-, Zentromer 7 Genkopienzahl, EGFR-, pAkt-, pMAPK- sowie pEGFR- Proteinexpression mit

dem Gesamtüberleben (*Overall survival time (OS)*) und dem rezidivfreien Überleben (*Disease free survival time (DFS)*) untersucht. Relevante Ergebnisse sind mittels Kaplan-Meier-Kurven aufgeführt.

3.5.1. Korrelation zwischen *EGFR*-Genkopienzahlen und Gesamt- bzw. rezidivfreiem Überleben

Es ergibt sich keine Korrelation zwischen Genkopienzahl und Gesamtüberleben (siehe Abbildung 13).

Bei Patienten mit durchschnittlich ≥ 6 *EGFR*-Genkopien pro Tumorzelle dauerte es postoperativ am längsten bis zum Auftreten eines Rezidivs. Bei Patienten mit durchschnittlich $\geq 4 - < 6$ *EGFR*-Genkopien pro Zelle dauerte es am kürzesten bis zum Rezidivaufreten. In der Mitte bezüglich der Dauer bis zum Auftreten eines Rezidivs liegt die Gruppe mit < 4 Genkopien (siehe Abbildung 14). Damit ist der p-Wert von 0,0302 aus Abbildung 14 ohne klinische Aussagekraft.

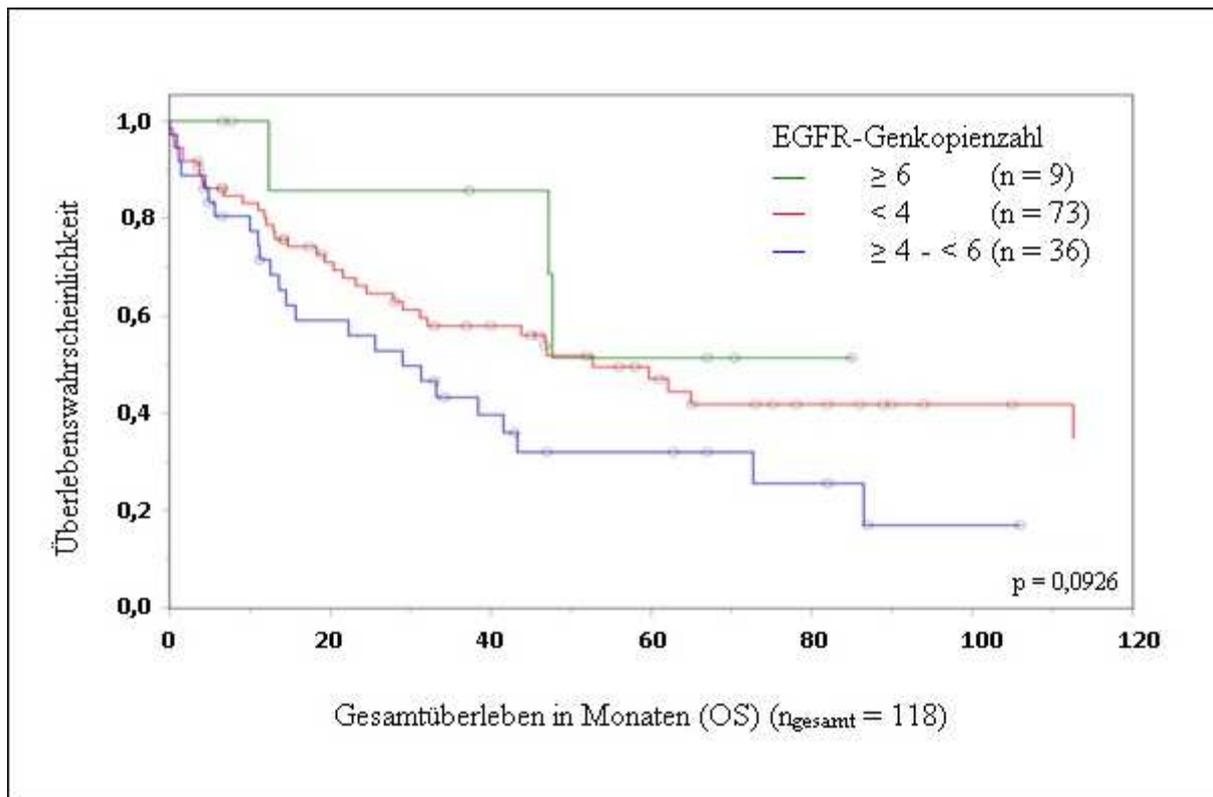


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Darstellung der Korrelation von *EGFR*-Genkopienzahl und Gesamtüberleben

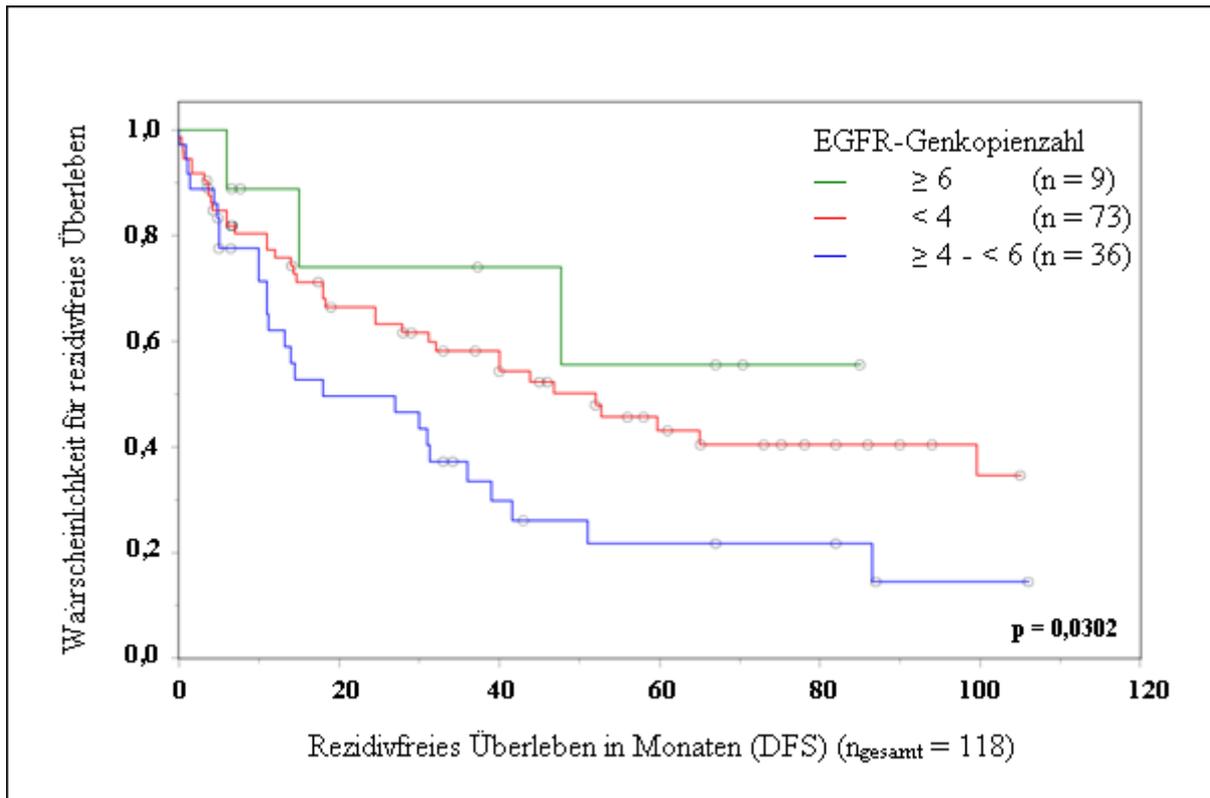


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Darstellung der Korrelation von *EGFR*-Genkopienzahl und rezidivfreiem Überleben

3.5.2. Korrelation zwischen *EGFR*- und pAkt-Proteinexpression mit Gesamt- bzw. rezidivfreiem Überleben

3.5.2.1. *EGFR*-Proteinexpression korreliert eng mit Gesamt- und rezidivfreiem Überleben der Patienten

Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Proteinexpression von *EGFR* und dem Gesamt- ($p < 0,0001$) bzw. rezidivfreien ($p < 0,0001$) Überleben. So hatten Patienten, deren Tumor kein *EGFR* exprimiert (Score 0) die beste Prognose. Es folgt die Gruppe der Erkrankten, deren Tumoren *EGFR* gering exprimierten (Score 1+). Patienten, deren Tumoren eine starke *EGFR*-Expression (Score 3+) aufwiesen, lebten postoperativ am kürzesten. Gleichzeitig trat bei einem Score von 3+ ein Rezidiv in der kürzesten Zeit auf. Fast parallel dazu verläuft die Kurve der dem Expressions-Score 2+ zugeordneten Patienten. Ihr postoperativer Verlauf war fast identisch mit dem der Patienten mit Score 3+ (siehe Abbildungen 15 und 16).

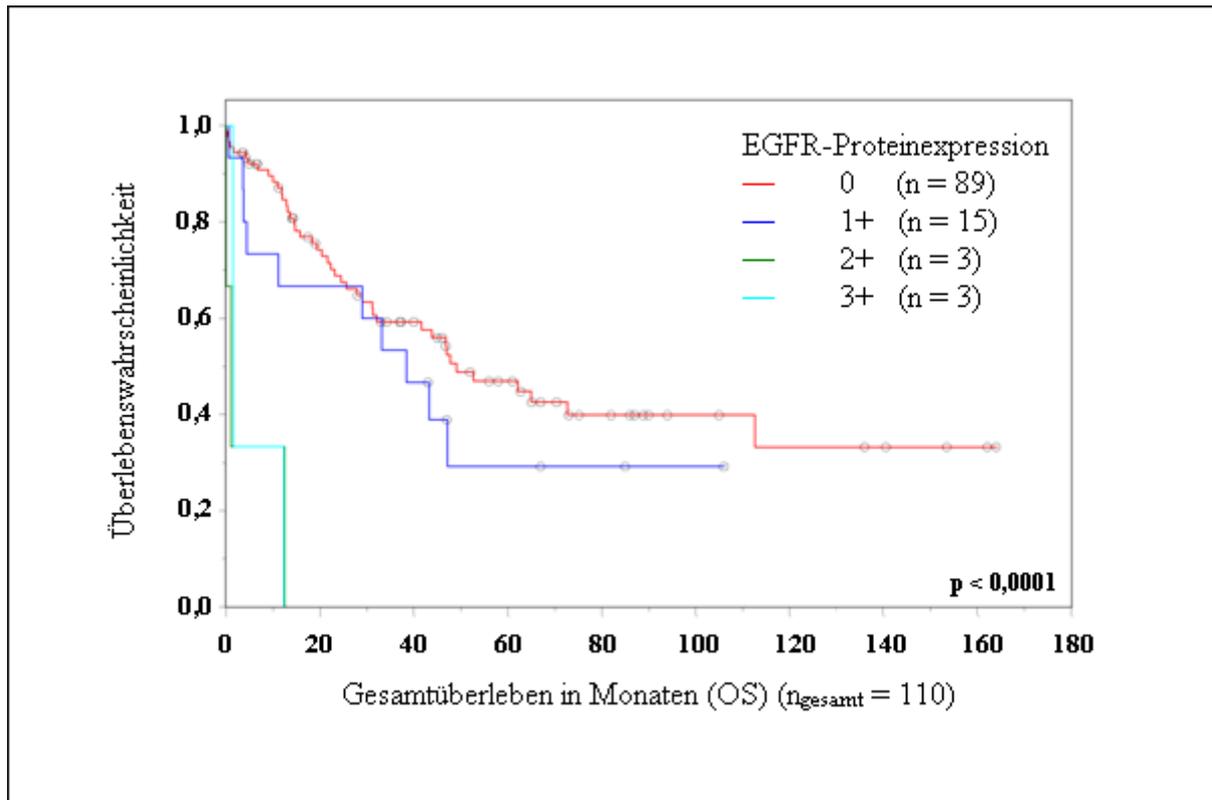


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Darstellung des Zusammenhangs von EGFR-Proteinexpression und Gesamtüberleben

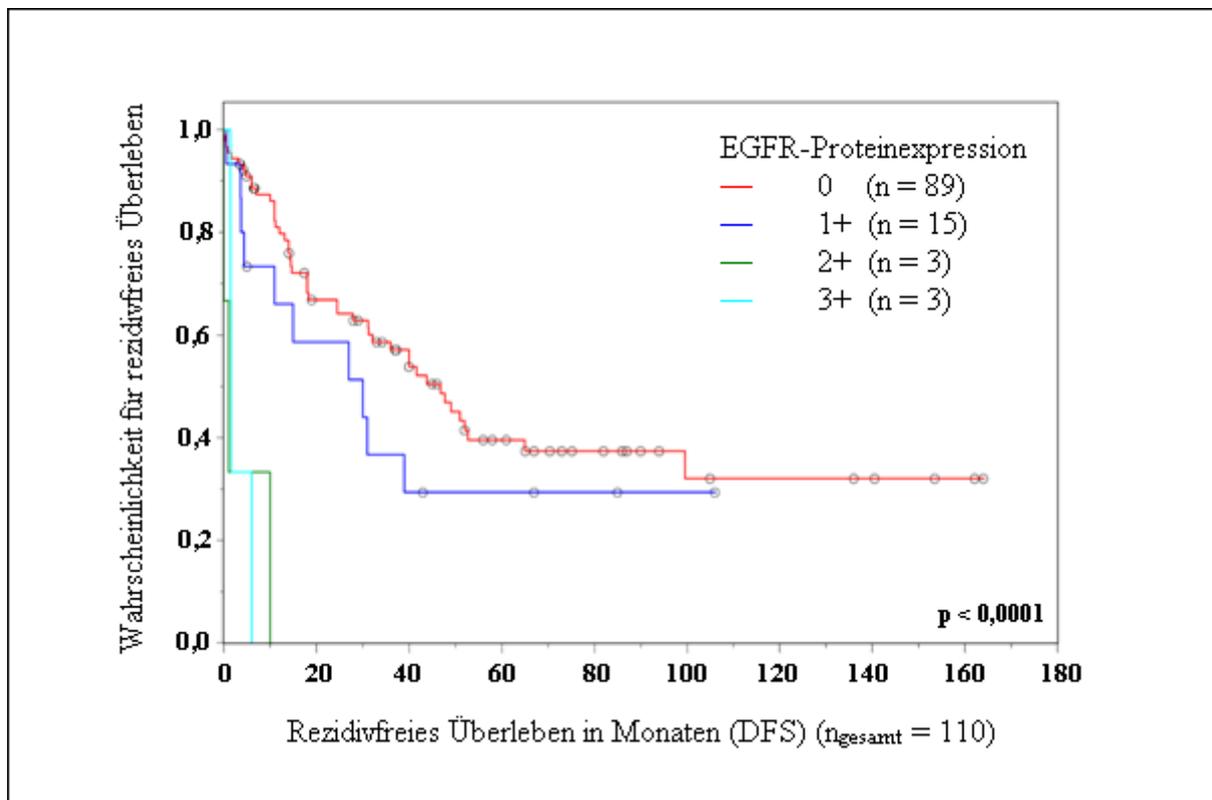


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Darstellung des Zusammenhangs von EGFR-Proteinexpression und rezidivfreiem Überleben

3.5.2.2. Patienten mit starker Proteinexpression von pAkt haben eine bessere Prognose als Patienten mit geringer pAkt-Proteinexpression

Ein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen dem pAkt-Proteinexpressionscore und dem Gesamt- ($p = 0,0305$) bzw. dem rezidivfreien Überleben ($p = 0,0246$) (siehe Abbildungen 17 und 18). Es zeigte sich, dass die Patienten, deren Tumoren eine vermehrte Expression von pAkt (Score 2+ und 3+) aufwiesen, eine bessere Prognose hatten als diejenigen mit geringer Expression (Score 0 und 1+).

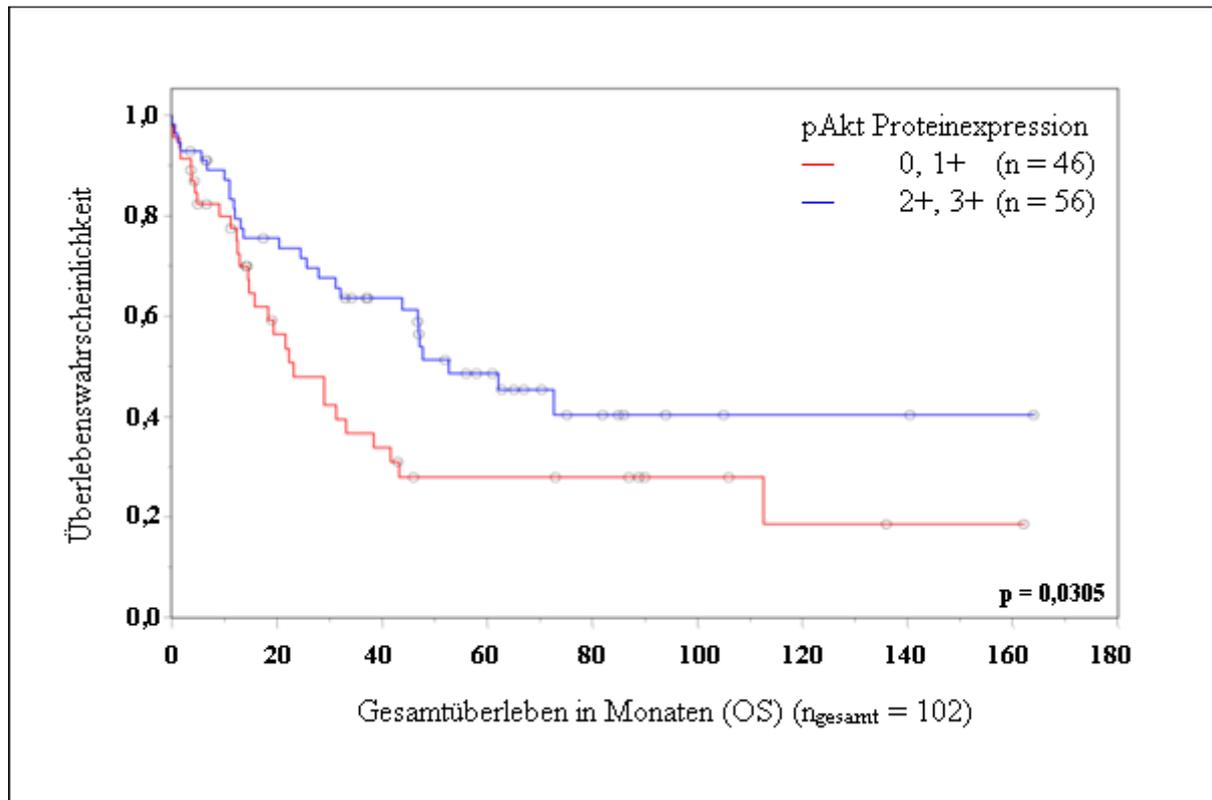


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Darstellung des Zusammenhangs von pAkt-Proteinexpression - in zwei Gruppen aufgeteilt - und Gesamtüberleben

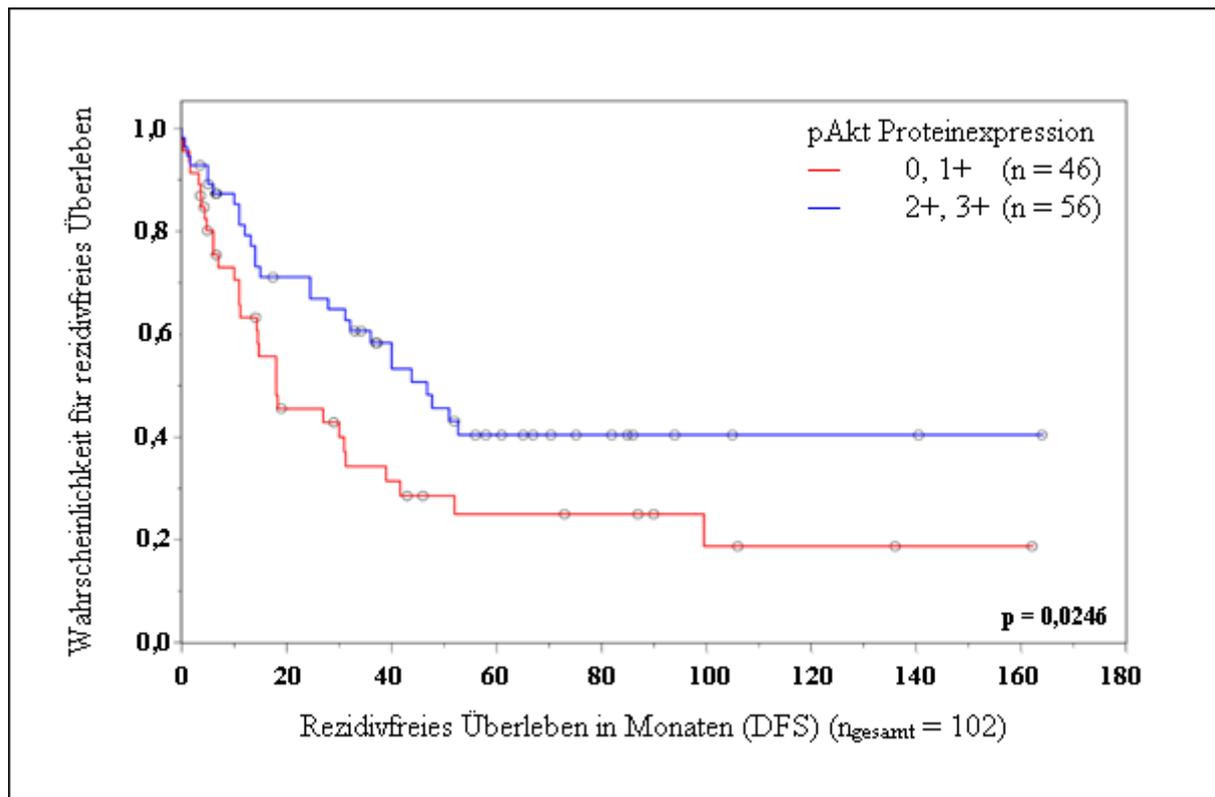


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Darstellung des Zusammenhangs von pAkt-Proteinexpression - in zwei Gruppen aufgeteilt - und rezidivfreiem Überleben

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden im Barrett-Karzinom die genauen Genkopienzahlen von *EGFR* und Zentromer 7 mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung bei dreidimensionaler-Signalzahlerfassung bestimmt. Die Genkopienzahlen sowie die Ratio aus *EGFR* und Zentromer 7 wurden mit klinisch-pathologischen Variablen der TNM-Klassifikation sowie Überlebensdaten korreliert.

Des Weiteren wurde die Proteinexpression von EGFR, pEGFR, pAkt und pMAPK mittels Immunhistochemie bestimmt und in vier Scores aufgeteilt (Score 0, 1+, 2+, 3+). Anschließend wurden die Expressionsscores der vier Proteine mit klinisch-pathologischen Parametern der TNM-Klassifikation sowie Überlebensdaten korreliert.

Außerdem wurden die Genkopienzahlen von *EGFR* und Zentromer 7 sowie die Proteinexpression von EGFR, pEGFR, pAkt und pMAPK untereinander korreliert.

Im Folgenden wird zuerst auf die Vorteile der dreidimensionalen FISH-Signalzahlerfassung gegenüber der zweidimensionalen FISH-Signalerfassung der *EGFR*-Genkopien eingegangen. Daraufhin werden die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit den Resultaten ähnlicher Studien verglichen. Am Ende wird die klinisch-pathologische Relevanz der Ergebnisse diskutiert.

4.1. Etablierung und Optimierung der dreidimensionalen FISH-Signalerfassung von *EGFR* in Gewebeproben des Barrett-Karzinoms

Ein Nachteil der zweidimensionalen gegenüber der dreidimensionalen-FISH-Signalerfassung liegt darin, dass nur Aufnahmen von vier μm dicken Schnitten gemacht werden können. In diesen dünnen Präparaten liegen Zellkerne, deren durchschnittlicher Kerndurchmesser acht bis zehn μm beträgt, angeschnitten vor, wodurch in der Zellkernperipherie gelegene Signale der Erfassung entgehen können. Des Weiteren ist auf Grund der Überlagerung der Zellen und Zellkerne in der zweidimensionalen Auswertung keine exakte Bestimmung der Genkopienzahlen möglich. Vielmehr wird nur festgestellt, ob ein Gen stark vermehrt, das heißt amplifiziert vorliegt oder nicht. Schwankungen im niedrigen Genkopienzahlbereich sind auf diese Weise nicht zu detektieren. Ob der jeweilige Tumor durchschnittlich drei, vier oder sechs Genkopien pro Zelle aufweist, oder ob in diesem „*low-copy-number*“-Bereich ein heterogenes Bild vorliegt, kann mit dieser Methode nicht festgestellt werden. Rauser et al. verdeutlichten diesen methodischen Nachteil, indem sie mittels dreidimensionaler Signalerfassung und einzelbildbasierter Auswertung von HER2/neu an 16 μm dicken Gewebeschnitten des Barrett-Karzinoms eine klinisch-pathologisch relevante Gruppe mit durchschnittlich $\geq 2,5 - < 4$ Genkopien pro Zelle fanden, die mittels zweidimensionaler Signalerfassung an vier μm dicken Schnitten nicht abzugrenzen war (RAUSER *et al.* 2007).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit die FISH-Signale von *EGFR* dreidimensional erfasst und ausgewertet. Ziel war es auch hier, klinisch-pathologisch relevante Genkopiezahlgruppen (auch im niedrigen Genkopiezahlbereich) zu finden. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob bei einer exakten Bestimmung der *EGFR*-Genkopiezahlen eine bessere Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern und Überlebensdaten vorläge als bei Untersuchungen mittels zweidimensionaler Signalzahlerfassung an vier μm Gewebeschnitten.

4.2. Die Genkopiezahl von *EGFR* in Tumorzellen des Barrett-Karzinoms korreliert mit klinischen Daten der Patienten

Die exakte *EGFR*-Genkopiezahl in Tumorzellen des primär resezierten Barrett-Karzinoms korreliert mit der Ausdehnung des Primärtumors, dem Auftreten von Fernmetastasen, und dem Resektionsstatus (siehe Tabelle 16). Eine Analyse nach der Kaplan-Meier-Methode erbrachte einen signifikanten Zusammenhang zwischen Genkopiezahl und rezidivfreiem Überleben (siehe Abbildung 14). Gemäß der multivariaten Analyse ist die *EGFR*-Genkopiezahl ein unabhängiger Parameter zur Abschätzung des Gesamtüberlebens der Patienten mit Tendenz zum signifikanten Zusammenhang zum rezidivfreien Überleben (siehe Tabelle 21). Die Ratio aus *EGFR* und Zentromer 7 korreliert mit dem Auftreten von Fernmetastasen und dem Resektionsstatus (siehe Tabelle 16).

Eine Amplifikation von *EGFR* mit einer Ratio aus *EGFR* und Zentromer 7 von > 2 wurde nur bei drei Fällen (2,6%), gefunden (siehe Tabelle 11), wobei bei diesen drei Fällen keine Korrelation mit einer Proteinüberexpression besteht.

Aktuell existieren keine weiteren Studien, die die dreidimensional erfasste *EGFR*-Genkopiezahl im Barrett-Karzinom mit klinisch-pathologischen Variablen korreliert. Allerdings gibt es eine Studie aus dem Jahr 2010 an 112 Barrett-Karzinomen in der vier μm dicke Gewebeschnitte auf das Auftreten von Amplifikation hin untersucht wurden. Dabei wurde bei sieben (6,25%) der Fälle eine *EGFR* Amplifikation festgestellt, welche mit der Ausdehnung des Primärtumors, dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen und einer schlechten Prognose assoziiert war. Von einer Amplifikation wurde hier ab einer Ratio aus *EGFR* und Zentromer 7 von > 3 von ausgegangen (MARX *et al.* 2010).

Andere Studien, die die Zusammenhänge zwischen *EGFR*-Genkopiezahl und klinisch-pathologischen Variablen bei anderen Tumoren untersuchten, erbrachten weniger Korrelationen als in der vorliegenden Arbeit. Suzuki *et al.* fanden beim Adenokarzinom der Lunge eine Korrelation zwischen *EGFR*-Amplifikation und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen sowie der Ausdehnung des Primärtumors (SUZUKI *et al.* 2005). Eine andere Studie zeigte am Plattenepithelkarzinom der Lunge einen Zusammenhang zwischen *EGFR*-Genkopiezahl und geringerem Gesamtüberleben. Diese Korrelation bestand beim Adenokarzinom nicht. Korrelationen zu klinisch-pathologischen Parametern wurden nicht gefunden (JEON *et al.* 2006). Auch Hirsch *et al.* konnten beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom weder Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern noch mit Überlebensdaten aufzeigen (HIRSCH *et al.*

2003). Auch beim kolorektalen Karzinom (ZENG *et al.* 2007) und beim hepatozellulären Karzinom bestanden keine Korrelationen (BUCKLEY *et al.* 2008). Beim Magenkarzinom fand sich eine Korrelation zum Auftreten von Lymphknotenmetastasen (SUZUKI *et al.* 2005; KIM *et al.* 2008b) und beim Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches korrelierte die *EGFR*-Genkopienzahl mit dem Gesamt- und rezidivfreien Überleben der Patienten (CHUNG *et al.* 2006).

Zusammengefasst wurden bei anderen Studien zwar vereinzelt Korrelationen zwischen *EGFR*-Genkopienzahl und klinisch-pathologischen Parametern und Überlebensdaten gefunden, in der vorliegenden Arbeit jedoch korrelierte die *EGFR*-Genkopienzahl mit mehr klinisch-pathologischen Variablen. Des Weiteren ist nach der multivariaten Analyse die exakte *EGFR*-Genkopienzahl als unabhängiger Parameter zur Abschätzung der Prognose zu werten.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse können sicherlich durch die andersartige Molekularbiologie der verschiedenen Tumoren und durch die methodischen Nachteile der zweidimensionalen gegenüber der dreidimensionalen FISH-Signalerfassung erklärt werden. In den Studien, in denen die herkömmliche FISH an vier bis sechs μm dicken Schnitten durchgeführt wurde, wurden meist nur die Genkopienzahlgruppen Disomie, Trisomie, höhergradige Polysomie und Amplifikation zur Kategorisierung verwendet (HIRSCH *et al.* 2003; JEON *et al.* 2006). Die Genkopienzahlen im niedrigen Genkopienzahlbereich konnten im Vergleich zu der vorliegenden Untersuchung nicht genau quantifiziert werden. Die wenig exakte Quantifizierung der Genkopien könnte ein Grund für fehlende Korrelationen zu klinisch-pathologischen Parametern und Überlebensdaten sein. Rauser *et al.* fanden mit Hilfe der dreidimensionalen FISH-Signalerfassung der HER2/neu-Genkopien im Barrett-Karzinom eine Kohorte von Tumoren mit $\geq 2,5 - < 4$ Genkopienzahlen pro Zelle. Diese leichte Genkopienzahlvermehrung kam häufig vor und die Patienten hatten in Bezug auf das rezidivfreie Überleben eine vergleichbar schlechte Prognose wie jene mit ausgeprägter HER2/neu Genkopienzahlvermehrung. Die meisten der Tumoren mit einer durchschnittlichen Genkopienzahl von $\geq 2,5 - < 4$ Kopien pro Zelle waren jedoch mit der herkömmlichen Methode nicht identifizierbar gewesen und deshalb als normal eingestuft worden (RAUSER *et al.* 2007).

4.3. Der Expressionsstatus von EGFR in Tumorzellen des Barrett-Karzinoms korreliert mit klinischen Daten sowie mit den *EGFR*-Genkopienzahlen

Die *EGFR*-Proteinexpression korreliert – genauso wie die *EGFR*-Genkopienzahl – mit der Ausdehnung des Primärtumors, dem Vorhandensein von Fernmetastasen und dem Resektionsstatus allerdings zusätzlich mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen und dem UICC-Stadium (siehe Tabelle 17). Die Analyse nach der Kaplan-Meier-Methode bestätigt nicht nur den Zusammenhang mit dem rezidivfreien Überleben (wie bei den Genkopienzahlen) sondern auch mit dem Gesamtüberleben (siehe Abbildungen 15 und 16). Und neben der multivariaten Analyse (wie bei den Genkopienzahlen) beweist auch die univariate Analyse einen Zusammenhang zwischen *EGFR*-Expressionsstatus und rezidivfreien bzw. Gesamtüberleben der Patienten (siehe Tabelle 21). Die *EGFR*-

Proteinexpression könnte demnach ein valider unabhängiger Marker zur Abschätzung der Prognose sowie des klinischen Verlaufes der Patienten sein.

Es gibt einige Studien, die die EGFR-Expression im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus untersuchen (OZAWA *et al.* 1989; MUKAIDA *et al.* 1991; YANO *et al.* 1991; HICKEY *et al.* 1994; ITAKURA *et al.* 1994; KITAGAWA *et al.* 1996; ALOIA *et al.* 2001; GIBAULT *et al.* 2005), aber nur wenige, die sich mit der Rolle von EGFR beim Adenokarzinom des Ösophagus beschäftigen (YACOUB *et al.* 1997; GIBSON *et al.* 2003; WILKINSON *et al.* 2004; WANG *et al.* 2007). Wang *et al.* fanden bei 33 von 103 Adenokarzinomen des gastroösophagealen Übergangs EGFR-Positivität. Dabei wurde von einer positiven EGFR-Expression ausgegangen wenn >5% der Tumorzellen EGFR exprimierten (vergleichbar mit Score 2+ und 3+ nach (BHARGAVA *et al.* 2005)). Wenn weniger als 5% der Zellen EGFR Färbung aufwiesen, wurden die Tumoren als EGFR negativ gewertet (vergleichbar mit Score 0 und 1+ nach (BHARGAVA *et al.* 2005)). Hier korrelierte die EGFR-Proteinexpression mit der Ausdehnung des Primärtumors, dem Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie in der univariaten Analyse mit dem Gesamt- und rezidivfreiem Überleben. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit war die EGFR-Expression allerdings nach der multivariaten Analyse kein unabhängiger prognostischer Parameter (WANG *et al.* 2007). In einer Studie an 38 Patienten mit Adenokarzinom des Ösophagus, von welchen einige eine neoadjuvante Radiochemotherapie erhalten hatten, war die EGFR-Expression mit schlechter Gewebedifferenzierung, aber nicht mit Überlebensdaten korreliert (WILKINSON *et al.* 2004). In einer anderen Studie war die EGFR-Expression nur bei Patienten im UICC-Stadium II mit kürzerem Gesamtüberleben korreliert (YACOUB *et al.* 1997). Gibson *et al.* zeigte, dass bei Patienten, die eine neoadjuvante Radiochemotherapie erhalten hatten, die EGFR-Expression mit einer schlechteren Prognose korreliert war (GIBSON *et al.* 2003).

Studien, die oben genannte Korrelationen bei anderen Tumoren untersuchten fanden weniger Zusammenhänge zwischen EGFR-Proteinexpression und klinisch-pathologischen Parametern sowie Überlebensdaten. Suzuki *et al.* fanden beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zwar einen höheren Prozentsatz von Tumoren mit starker EGFR-Expression als in der vorliegenden Studie am Barrett-Karzinom (nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom: 34%), allerdings korrelierte diese Expression nur mit der *EGFR*-Genkopienzahl, dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen sowie einer fortgeschrittenen Tumorausdehnung (SUZUKI *et al.* 2005). Zwei andere Studien am nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom fanden auch einen erhöhten Prozentsatz an Tumoren mit EGFR-Überexpression, welche zwar mit der *EGFR*-Genkopienzahl, allerdings weder mit Überlebensdaten noch mit klinisch-pathologischen Parametern assoziiert war (HIRSCH *et al.* 2003; JEON *et al.* 2006). Auch die von Nakamura *et al.* durchgeführte Metaanalyse an achtzehn Studien mit insgesamt 2972 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom kam zu dem Ergebnis, dass kein Zusammenhang zwischen EGFR-Expression und Gesamtüberleben bestehe (NAKAMURA *et al.* 2006). Laut Arteaga *et al.* ist die EGFR-Überexpression beim kolorektalen Karzinom mit einer schlechteren Prognose im Sinne eines kürzeren rezidivfreien und Gesamtüberlebens verbunden (ARTEAGA 2002). Dem widerspricht eine Untersuchung an 150 Patienten mit kolorektalem Karzinom, in der bei 118 Patienten (80%) eine erhöhte EGFR-Expression gefunden wurde, die auch mit der Ausdehnung des

Primärtumors assoziiert war. Allerdings korrelierte der Grad der Expression nicht mit dem Gesamtüberleben (SPANO *et al.* 2005). Im Magenkarzinom besteht laut Kim *et al.* eine Korrelation zwischen EGFR-Expression, *EGFR*-Genkopienzahl und Überleben (KIM *et al.* 2008b). Anders verhält es sich beim hepatozellulären Karzinom. Die Mehrzahl der Fälle zeigt eine starke Überexpression von EGFR. Allerdings besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen EGFR-Expression, Genkopienzahl und Überleben (BUCKLEY *et al.* 2008).

Nicolson *et al.* verschaffte sich 2001 in einer Metaanalyse einen Überblick über mehr als 200 Studien der Jahrgänge 1985 bis 2000 mit insgesamt mehr als 20 000 Krebspatienten, die sich mit der Korrelation zwischen der EGFR-Expression verschiedener Karzinomformen und dem Gesamt- bzw. rezidivfreien Überleben befasste. Die Arbeit zeigte, dass beim Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches, dem Ovarial-, Zervikal-, Harnblasen- und Ösophaguskarzinom eine starke Korrelation zwischen EGFR Proteinexpression und Überlebensdaten besteht. Bei diesen Krebsformen war in 70% (53/74) der Studien die erhöhte EGFR-Expression mit erniedrigtem Gesamt- und rezidivfreiem Überleben assoziiert. Beim Magen-, Mamma-, Endometrium- und kolorektalen Karzinom war der EGFR-Expressionsstatus prognostisch weniger aussagekräftig. So fanden sich nur bei 52% (13/25) der Studien schlechtere Überlebensdaten bei Patienten mit erhöhter EGFR-Expression. Bei dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom war die Assoziation am schwächsten. Nur 30% (3/10) Studien zeigten hier diesen Zusammenhang. Nicholson relativiert allerdings seine Ergebnisse indem er erwähnt, dass bei allen Untersuchungen immer alle Rezeptoren der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGFR) und nicht nur die aktivierten Rezeptoren gemessen wurden, und dass die Patientenpopulationen und EGFR-Bestimmungsmethoden nicht standardisiert waren. Die prognostische Signifikanz könnte demnach um einiges höher liegen. (NICHOLSON *et al.* 2001).

4.4. *EGFR*-Genkopienzahl korreliert mit EGFR-Proteinexpression

EGFR-Proteinexpression und *EGFR*-Genkopienzahl korrelieren nicht nur mit klinisch-pathologischen Parametern und Überlebensdaten, sondern auch untereinander (siehe Tabelle 20). Tumoren mit geringen Genkopienzahlen hatten demnach wenig, Tumoren mit erhöhten Genkopienzahlen viel EGFR exprimiert. Es kann somit angenommen werden, dass im Barrett-Karzinom auch in malignen Zellen beim Vorliegen von partieller oder vollständiger Polysomie die Translation größtenteils stattfindet. Aus dem Vorliegen der signifikanten Korrelation kann aber nicht geschlossen werden, dass tatsächlich jede Genkopie translatiert wird und dass alle Translationsvorgänge fehlerfrei ablaufen. Teile oder Anteile der Rezeptoren könnten fehlerhaft ausgebildet bzw. mutiert sein. Sollten einige EGF-Rezeptoren fehlerhaft gebildet werden, könnte dies eine tumorstimulierende Wirkung ausüben. Dies könnte auch erklären, warum die EGFR-Proteinexpression mit mehr klinisch-pathologischen Variablen korreliert, als die *EGFR*-Genkopienzahl.

Normalerweise werden EGFR-Rezeptoren rasch in Endosomen inkorporiert und zu Lysosomen transportiert, wo sie abgebaut werden. Mutierte EGFR-Proteine wandern dagegen

nur langsam in Endosomen. Anstelle des Abbaus in Lysosomen kommt es zum Recycling der Rezeptorkomponenten mit Wiedereinbau in die Zellmembran (YARDEN 2005). Das unterschiedliche Schicksal von *EGFR* und seinen Mutanten in der Zelle wird durch das Proteinprodukt des c-Cbl-Protoonkogens beeinflusst (Cbl = casitas b-lineage lymphoma) (YARDEN 2005). Das c-Cbl-Protein bindet an den phosphorylierten *EGFR* und führt ihn damit der Ubiquitinierung zu. Ein so markiertes Protein wird in das Endosom transportiert und danach im Lysosom selektiv durch ubiquitinabhängige Proteasen degradiert. Ist diese Ubiquitinierung von *EGFR*, die in normalen Zellen sehr schnell abläuft gestört, kommt es zum vermehrten Einbau von *EGFR* in die Zellmembran und damit zu einer vermehrten tumorstimulierenden Wirkung (YARDEN 2005). Eine Inhibition der Ubiquitinierung und Degradation findet durch den Austausch eines Tyrosinrests im *EGFR* durch Phenylalanin statt. Dadurch werden die Bindung des c-Cbl-Proteins an den Rezeptor und der anschließende Abbau verhindert (VOLDBORG *et al.* 1997). Häufig sind auch Deletionen im Bereich der *EGFR*-Ligandenbindungsstelle, wie bei EGFRvIII. Dieser mutierte Rezeptor ist durch eine ständig aktivierte Tyrosinkinase trotz fehlender Ligandenbindung charakterisiert (MOSCATELLO *et al.* 1998; PEDERSEN *et al.* 2001). Weitere Mutationen betreffen die Tyrosinkinase-Domäne des EGFR, die bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen nachgewiesen wurden (LYNCH *et al.* 2004; PAEZ *et al.* 2004). Es handelt sich in der Regel um Punktmutationen mit Deletionen oder Austausch nur einer Aminosäure, durch die einerseits die Aktivität der Tyrosinkinase verstärkt wird und andererseits die Sensitivität der Tyrosinkinase gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Gefitinib oder Erlotinib erhöht wird (PAEZ *et al.* 2004).

Die beschriebenen Mutationen auf Genom- und Proteinebene sind im Adenokarzinom des Ösophagus bislang nicht nachgewiesen worden. In einer Studie wurden die Exons 19 und 21, die für die Rezeptor-Tyrosinkinase des Epidermalen Wachstumsfaktors kodieren, im Barrett-Karzinom untersucht. Dabei fand man nur eine Mutation im Exon 19 von Adenin zu Guanin im Codon 754. Eine solche Mutation, die im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zu einer besseren Sensitivität gegenüber Gefitinib führt, konnte beim Barrett-Karzinom nicht nachgewiesen werden (PUHRINGER-OPPERMANN *et al.* 2007). Weitere Studien, die Mutationen von EGFR im Barrett-Karzinom auf Genom- und Proteinebene untersuchen sind notwendig, um mehr Klarheit über die tumorstimulierende Wirkung von *EGFR* zu erlangen.

4.5. pAkt-Proteinexpression korreliert invers mit der Ausdehnung des Primärtumors sowie Überlebensdaten

Aktiviertes Akt (pAkt) reguliert grundlegende Zellfunktionen wie Transkription, Translation, Proliferation, Wachstum und Apoptose (DATTA *et al.* 1999; VIVANCO and SAWYERS 2002). Ist der PI3K-Akt-Signaltransduktionsweg gestört, kommt es deshalb zu unkontrollierter Zellproliferation (TESTA and BELLACOSA 2001; HILL and HEMMINGS 2002; VIVANCO and SAWYERS 2002).

In dieser Arbeit wurde die Expression von pAkt gemessen. Hierbei stellte sich die Frage, ob die pAkt-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern und Überlebensdaten der Patien-

ten mit Barrett-Karzinom korreliert ist und ob der pAkt-Expressionsstatus damit als prognostischer Marker zu verwenden ist.

Es zeigt sich, dass der Expressionsstatus von pAkt invers mit der Ausdehnung des Primärtumors korreliert ist. Tumoren im Stadium pT1 exprimierten demnach mehr pAkt als Karzinome, die schon in die Adventitia eingewachsen waren (pT3) (siehe Tabelle 18). Gleichzeitig haben nach der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse und der univariaten Analyse Patienten mit vermehrter pAkt-Expression eine bessere Prognose, als solche mit geringer pAkt-Expression (siehe Abbildungen 17 und 18 und Tabelle 21). Außerdem korreliert die Protein-Expression von pAkt mit der Expression von pEGFR und pMAPK (siehe Tabelle 20).

Ähnliches fanden Dai et al. in einer Studie an 292 Melanomen in verschiedenen Stadien. Hier stieg zwar im Gegensatz zur aktuellen Arbeit die pAkt-Expression parallel zu Wachstumstiefe und Stadium des Melanoms stark an, allerdings hatten die Patienten mit pAkt-Überexpression eine günstigere Prognose als die Vergleichsgruppe mit geringer pAkt-Expression (DAI *et al.* 2005). Auch in einer Studie am nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom im Stadium I-IIIa war die pAkt-Überexpression (gemessen mit einem Western-Blot) mit einer günstigen Prognose korreliert. Mittels Immunhistochemie konnte dieser Zusammenhang nicht gezeigt werden (SHAH *et al.* 2005).

Beim Cholangiokarzinom korrelierte die Überexpression von nicht phosphoryliertem Akt mit einer verbesserten Prognose, gleichzeitig korrelierten auch die Expression von Akt und pAkt (JAVLE *et al.* 2006).

Dem widersprechen Ergebnisse von Lim et al., die bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom im Stadium IV zeigten, dass sowohl pAkt-Überexpression und/oder PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) Unterexpression (PTEN = Inhibitor des PI3K/Akt-Signalweges) mit einer ungünstigen Prognose bezüglich Gesamt- und rezidivfreiem Überleben korreliert ist (LIM *et al.* 2007). Auch beim Weichteilsarkom wurde pAkt als ungünstiger prognostischer Faktor bezüglich Gesamt- und rezidivfreiem Überleben identifiziert (TOMITA *et al.* 2006). Gleiches zeigte sich beim duktalem Pankreaskarzinom (YAMAMOTO *et al.* 2004) und beim Magenkarzinom (MURAKAMI *et al.* 2007).

Was könnten nun die Ursachen für die inverse Korrelation sein? Bei einigen Tumoren fand man eine Assoziation zwischen erhöhter pAkt-Expression und gut differenziertem Tumorgewebe (MUKOHARA *et al.* 2003; SHAH *et al.* 2005). Diese Befunde legen nahe, dass die Tumoren mit einer hohen pAkt-Expression gut differenziert bleiben und langsamer wachsen, wobei solche, die unabhängig von Akt-Aktivität wachsen, schlecht differenziertes Tumorgewebe mit einer erhöhten Proliferationsrate bilden. Zwar sehen einige Studien Akt als wichtigen Faktor des Wachstumszyklus (SUN *et al.* 1999; LIANG *et al.* 2002), aber bei Untersuchungen an menschlichen Tumoren besteht keine Korrelation zwischen Akt und den Substraten des Zellzyklus (ERMOIAN *et al.* 2002; PEREZ-TENORIO and STAL 2002). Darüber hinaus wirkt sich eine geringe Expression von Akt weniger auf die Induktion des Zellzyklus, als auf den Zelltod aus (WENG *et al.* 2001). Daher besteht die Möglichkeit, dass eine erhöhte Akt-Aktivität zu verringertem zellulärem Wachstum führen könnte (PEREZ-TENORIO and STAL 2002).

Welche klinische Relevanz könnten nun die vorliegenden Ergebnisse haben? Tumoren hatten in pT1 mehr pAkt exprimiert als in pT3. Gleichzeitig hatten Patienten mit vermehrter pAkt-Expression eine bessere postoperative Prognose. pAkt könnte demnach präoperativ bestimmt werden, um Patienten zu selektieren, die gerade bei geringer Ausdehnung des Primärtumors von einer Operation bezüglich der postoperativen Prognose profitieren könnten. Gleichzeitig könnte eine Aussage über die Aggressivität des Tumorgewebes getroffen werden, da Tumoren mit wenig pAkt-Expression in ihrer Ausdehnung schon weiter fortgeschritten waren, was den Rückschluss zulässt, dass pAkt-negative Tumoren invasiver wachsen. Warum pAkt-Proteinexpression in diesem Zusammenhang nicht auch mit weiteren prognostisch wichtigen klinisch-pathologischen Parametern wie Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen, sowie UICC-Stadium korreliert bleibt unklar.

4.6. pMAPK-Expressionsstatus korreliert nicht mit klinisch-pathologischen Parametern und Überlebensdaten

Die aktivierte MAPK (pMAPK, ERK 2) erfuhr in letzter Zeit großes Interesse in der Tumorforschung, da sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und des Zellüberlebens spielt (LEFLOCH *et al.* 2008). Des Weiteren moduliert der MAPK-Signaltransduktionsweg Embryonalentwicklung und Zelldifferenzierung, sodass die Substrate dieses Signalweges ideale Kandidaten für neuartige antineoplastische Chemotherapie bieten (LEE and MCCUBREY 2002). In dieser Studie wurde die Expression von pMAPK mit klinisch-pathologischen Parametern und Überlebensdaten korreliert. Dabei stellte sich die Frage, ob pMAPK ähnlich wie EGFR als prognostischer Marker beim Barrett-Karzinom einsetzbar wäre.

Allerdings finden sich in der vorliegenden Arbeit keine Korrelationen von pMAPK-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern oder Überlebensdaten (siehe Tabelle 17 und 21). Es besteht allerdings ein signifikanter Zusammenhang zwischen pMAPK-Expression und Expression von pEGFR und pAkt (siehe Tabelle 20).

Bei anderen Tumoren fanden sich unterschiedliche Ergebnisse. So korrelierte in einer Studie an Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom die Expression von ERK1/MAPK mit den Kategorien der TNM-Klassifikation (ZHANG *et al.* 2005). In resezierten Pankreas-Karzinomen fand sich eine ausgeprägte Proteinexpression von EGFR, pMAPK und pAkt, wobei hier die Expression von pMAPK und pAkt mit Gesamt- und rezidivfreien Überleben korrelierte (CHADHA *et al.* 2006). In einer Studie an nasopharyngealen Karzinomen korrelierte die pMAPK-Überexpression mit schlechterem Gesamt- und rezidivfreiem Überleben und mit EGFR Überexpression (WANG *et al.* 2006). Mawrin *et al.* fanden eine signifikante Korrelation zwischen pMAPK-Expression und Überleben von Patienten mit Glioblastoma multiforme (MAWRIN *et al.* 2003).

Im Gegensatz zu anderen Tumoren, in denen eine Korrelation zwischen pMAPK-Expression und klinisch-pathologischen Parametern sowie Überlebensdaten gefunden wurde, eignet sich

nach der vorliegenden Datenlage pMAPK nicht als prognostischer Marker im Barrett-Karzinom. Das liegt sicherlich auch daran, dass das ursprüngliche Konzept einer Kaskade als einem einfachen linearen Weg von den Plasma-Membran-assoziierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen bis in den Zellkern nicht mit der Realität übereinstimmt, da offensichtlich signifikant viele andere Moleküle anderer zum Teil noch unbekannter Signalkaskaden interagieren und dabei verschiedene noch unbekannte Effekte induzieren.

Gleichzeitig sind verschiedene Substrate dieses Signaltransduktionsweges Zielmoleküle für zielgerichtete Krebstherapien. Jede dieser Kinasen (Raf, MEK 1/2, ERK 1/2) eröffnet nun neue therapeutische Möglichkeiten für die Entwicklung antitumorale Substanzen, die als spezifische Enzyminhibitoren möglicherweise weniger toxisch als konventionelle zytotoxische Chemotherapeutika sind. Eine Anzahl von Inhibitoren für Ras, Raf und MEK befinden sich in der klinischen Prüfung (HILGER *et al.* 2002).

4.7. Zielgerichtete Therapie gegen EGFR bei verschiedenen Tumoren

Von den 111 Tumoren, die auf EGFR-Proteinexpression hin untersucht wurden, weisen jeweils drei einen Score von 2+ und 3+ auf (siehe Tabelle 12). Es stellt sich die Frage, ob Patienten mit Barrett-Karzinom von zielgerichteten Therapieansätzen gegen EGFR profitieren könnten. Dies ist derzeit Inhalt einiger Studien, die im Folgenden kurz vorgestellt werden

4.7.1. Cetuximab in der Therapie des ösophagogastralen Karzinoms

Es existieren Phase II Studien, in welchen die Wirkung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab alleine oder in Kombination mit Chemotherapie bei Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom des Ösophagus untersucht wurde. In einer Untersuchung an 55 Patienten, in der, nach einem Regime Chemotherapie Cetuximab alleine eingesetzt wurde, lag das mittlere Gesamtüberleben bei vier Monaten und nur drei Patienten zeigten ein teilweises Ansprechen, weshalb eine alleinige Therapie mit Cetuximab nicht empfohlen wird (GOLD *et al.* 2010). In einer weiteren Studie an acht Irinotecan/Cisplatin-refraktären Patienten zeigte bei einer zusätzlichen Therapie mit Cetuximab nur ein Patient ein teilweises Ansprechen (G. Y. KU 2008). Vielversprechender sind die Ergebnisse der Studien, die die Wirkung von Cetuximab in Kombination mit Chemotherapie untersuchen.

Da beim Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches (VERMORKEN *et al.* 2008), sowie beim kolorektalen Karzinom (BOKEMEYER *et al.* 2009) die Wirkung platin-basierter Chemotherapie durch die zusätzliche Gabe von Cetuximab verbessert werden konnte, und da im Magenkarzinom häufig eine Überexpression von EGFR vorliegt (GAMBOA-DOMINGUEZ *et al.* 2004; DRAGOVICH *et al.* 2006), wurde in einer Studie die Wirkung von Cetuximab in Kombination mit platin-basierter Chemotherapie beim 52 Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom untersucht (LORDICK *et al.* 2010). Hierbei zeigte sich eine Ansprechrate von 65% (CI 95%: 50 – 79%), wobei bei vier Patienten eine komplette Remission auftrat, was

einer deutlichen klinischen Verbesserung gegenüber der alleinigen Therapie mit platinbasierter Chemotherapie entspricht (LORDICK *et al.* 2005).

Diese Ergebnisse reihen sich in die Resultate anderer Studien ein, die die Wirkung von Cetuximab in Kombination mit Radiochemotherapie beim lokal fortgeschrittenen Ösophaguskarzinomen bzw. in Kombination mit Irinotecan/5-Fluoruracil beim nicht resektablen bzw. metastasierten Magenkarzinom untersuchten (PINTO *et al.* 2007). Eine neuere Phase II Studie der- selben Autoren, in der zur Therapie des fortgeschrittenen Magenkarzinoms Cetuximab in Kombination mit Cisplatin und Doxetaxel eingesetzt wurde erbrachte eine Ansprechrate von 41% (CI 95%: 29% - 53%), wobei die mediane Zeit bis zum Fortschritt der Erkrankung bei 8 Monaten lag (PINTO *et al.* 2009). Diese mediane progressionsfreie Zeit war länger als bei Studien mit Irinotecan und 5-Fluoruracil alleine (POZZO *et al.* 2004; DANK *et al.* 2008). In der aktuellen Studie von Lordick *et al.* lag die mediane progressionsfreie Überlebenszeit bei 7,6 Monaten (CI 95%: 5,0 – 10,1 Monate). Eine Überexpression von EGFR wurde hier bei 60% gefunden, wobei sich keine Korrelation zwischen EGFR-Expression und Therapieansprechen ergab. Eine *KRAS*-Mutation, die im kolorektalen Karzinom die Sensitivität gegen EGFR-Antikörpertherapie herabsetzt (AMADO *et al.* 2008; KARAPETIS *et al.* 2008), wurde nur bei einem Fall gefunden (LORDICK *et al.* 2010). Auch in anderen Studien wurde bei Magenkarzinomen nur selten eine *KRAS* Mutation gefunden (KIM *et al.* 2003; LEE *et al.* 2003; ZHAO *et al.* 2004). Auf Grund der oben genannten Ergebnisse von Lordick *et al.* aus dem Jahre 2010 wurde von der Arbeitsgemeinschaft internistischer Onkologie (AIO) eine Phase III Studie zur Untersuchung des monoklonalen Antikörpers Erbitux in Kombination mit der Vorstufe von 5-Fluoruracil (Xeloda) und Cisplatin zur Therapie des fortgeschrittenen ösophagoastralen Karzinoms initiiert, deren Ergebnisse in Kürze veröffentlicht werden.

4.7.2. Erlotinib in der Therapie des ösophagealen Adenokarzinoms

Es gibt desweiteren Studien, die die Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors Erlotinib beim metastasierten Adenokarzinom des Ösophagus untersuchten. In einer klinischen Studie wurden 27 Chemotherapie- refraktäre Patienten mit metastasiertem Adenokarzinom des Ösophagus nach nur einem Zyklus Chemotherapie mit 500 mg Gefitinib (Erlotinib) pro Tag behandelt. Das mediane Gesamtüberleben der Patienten betrug 4,5 Monate und das progressionsfreie Überleben 1,9 Monate. 11% der Patienten waren partielle Responder und bei 26% der Patienten stabilisierte sich die Erkrankung (FERRY *et al.* 2007). In einer anderen Studie an 46 Patienten mit Adenokarzinomen des distalen Ösophagus zeigten unter Monotherapie mit Erlotinib vier Patienten ein teilweises und ein Patient ein volles Ansprechen (DRAGOVICH *et al.* 2006). In präklinischen Studien hemmte Erlotinib das Wachstum von Ösophaguskarzinomzelllinien (sowohl Plattenepithel- als auch Adenokarzinom) *in vitro* und *in vivo* (SUTTER *et al.* 2006).

Allgemein ist es laut Dragovich *et al.* von Nöten, molekularpathologische Marker zu identifizieren, die eine bessere Aussage über die Sensitivität des gastroösophagealen Adenokarzinoms gegen EGFR-Antikörper (alleine oder in Kombination mit Chemotherapie)

ermöglichen und damit die Therapiestratifizierung bezüglich klinischem Benefits für die Patienten verbessern (DRAGOVICH and CAMPEN 2009).

4.8. Welche Rolle könnten *EGFR*-Genkopienzahl und *EGFR*-Expressionsstatus in der klinischen Praxis einnehmen?

Die ausgeprägte Korrelation des Expressionsstatus und der Genkopienzahlen von *EGFR* mit klinisch-pathologischen Parametern sowie Überlebensdaten könnten sie als molekularpathologische Marker für die klinische Praxis interessant machen.

Je weiter der Tumor in seiner Ausdehnung vorangeschritten war desto mehr *EGFR* hatte er exprimiert und desto mehr *EGFR*-Genkopien waren in seinen Tumorzellen zu finden (siehe Tabellen 16 und 17). Ein Tumor, der schon in die Adventitia (pT3) oder in benachbarte Strukturen (pT4) ein gewachsen war, war auch schwieriger R0 zu resezierern gewesen. Gleichzeitig wurden bei fortgeschrittener Tumorausdehnung Lymphbahnen und Blutgefäße infiltriert, was lymphogen zur Bildung von Lymphknotenmetastasen (pN1) und hämatogen zur Bildung von Fernmetastasen (pM1) führte. Diese klinischen Zusammenhänge werden durch die Korrelationen der einzelnen Parameter der TNM-Klassifikation verdeutlicht (siehe Tabelle 19). Patienten, deren Tumor präoperativ in seiner Ausdehnung schon weit vorangeschritten war und bei welchen Fernmetastasen diagnostiziert worden waren wurden seltener R0 reseziert, bekamen postoperativ schneller ein Rezidiv und hatten eine schlechtere Prognose (siehe Tabelle 21).

Die enge Korrelation der *EGFR*- Proteinexpression und Genkopienzahlen mit den Parametern der TNM-Klassifikation, UICC-Stadium und Gesamt- bzw. rezidivfreiem Überleben sprechen, vor allem nach im vorherigen Absatz genanntem, für deren klinische Relevanz (siehe Tabelle 16, 17, 21).

Die Bestimmung des immunhistochemischen Scores und/oder der genauen Genkopienzahl aus präoperativ bioptisch, intra- oder postoperativ gewonnenem Gewebe könnte also helfen, den Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs sowie die Prognose der Patienten mit Barrett-Karzinom besser abzuschätzen. Damit könnte die Bestimmung von *EGFR*- Proteinexpression und/oder genauer -Genkopienzahl auch zur präoperativen Therapiestratifizierung bezüglich konservativ palliativem und operativem Procedere beitragen.

Für die tägliche Routine wäre die exakte Genkopienzahlbestimmung wohl zu aufwendig, denn neben der im Vergleich zur Immunhistochemie aufwendigeren Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nimmt die exakte dreidimensionale Signalzahlauswertung viel Zeit und Arbeitskapazität in Anspruch. Schneller durchführbar und nach den Daten der vorliegenden Arbeit auch von vorrangiger klinischer Relevanz wäre die immunhistochemische Bestimmung der *EGFR*-Expression im Adenokarzinom des gastroösophagealen Übergangs Typ I.

Zur besseren Therapiestratifizierung bezüglich des Einsatzes von monoklonalen Antikörpern oder Tyrosinkinaseinhibitoren gegen EGFR scheint die Genkopienzahl und/oder Proteinexpression von EGFR nach der aktuellen Studienlage nicht beizutragen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde in Tumorzellen des primär resezierten Adenokarzinoms des gastroösophagealen Übergangs Typ I die genaue Genkopienzahl von *EGFR* an 16 µm dicken Gewebeschnitten mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung bei dreidimensionaler Signalauswertung erfasst. Des Weiteren wurde in den Barrett-Karzinomen die Proteinexpression von EGFR, pEGFR, pAKT und pMAPK mittels Immunhistochemie gemessen. Die *EGFR*-Genkopienzahl sowie die Proteinexpression von EGFR, pEGFR, pAKT und pMAPK wurden mit klinisch-pathologischen Parametern sowie untereinander korreliert. Dabei wurde der Frage nachgegangen, welche klinisch-pathologische Bedeutung der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors mit seinen nachgeschalteten Signalwegen für das Barrett-Karzinom hat.

Die genaue *EGFR*-Genkopienzahl korreliert mit der Ausdehnung des Primärtumors, dem Auftreten von Fernmetastasen und dem Resektionsstatus. Nach der multivariaten Überlebensanalyse erweist sich die *EGFR*-Genkopienzahl als unabhängiger prognostischer Faktor. Bei anderen Studien an epithelialen Tumoren, die die Genkopienzahl von *EGFR* an vier µm dicken Gewebeschnitten bei zweidimensionaler Signalauswertung erfassten, wurden weniger Korrelationen zu klinisch-pathologischen Parametern gefunden, weshalb die dreidimensionale Bestimmung der *EGFR*-Genkopienzahl der zweidimensionalen Bestimmung bezüglich klinisch-pathologischer Relevanz überlegen scheint. Auch die EGFR-Proteinexpression korreliert mit der Ausdehnung des Primärtumors, dem Auftreten von Fernmetastasen, dem Resektionsstatus und dem Gesamt- und rezidivfreien Überleben, allerdings (im Vergleich zu den Genkopienzahlen) zusätzlich mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen und dem UICC-Stadium. Die EGFR-Proteinexpression erweist sich in der multivariaten Überlebensanalyse als unabhängiger Prognosefaktor und als unabhängige Variable zur Abschätzung des Zeitraums bis zum Rezidivaufreten. *EGFR*-Genkopienzahl und EGFR-Proteinexpression korrelieren miteinander. Zusätzlich besteht eine signifikante *inverse* Korrelation zwischen pAkt-Proteinexpression und der Ausdehnung des Primärtumors sowie dem Überleben. Eine vermehrte EGFR-Proteinexpression von EGFR (Score 2+ und 3+) lag bei 5,4% der Tumoren vor.

Nach oben genannten Ergebnissen könnten die *EGFR*-Genkopienzahl und -Proteinexpression sowie die pAkt-Proteinexpression als molekulare Marker für die klinische Praxis zu einer verbesserten Abschätzung der postoperativen Prognose und dem Zeitraum bis zum Rezidivaufreten dienlich sein. Damit könnten sie auch als Marker zur Therapiestratifizierung bezüglich konservativ palliativem oder operativem Therapieansatz dienen.

Zur besseren Therapiestratifizierung bezüglich des Einsatzes von monoklonalen Antikörpern oder Tyrosinkinaseinhibitoren gegen EGFR scheint die Genkopienzahl und/oder Proteinexpression von EGFR nach der aktuellen Studienlage nicht beizutragen. Aktuelle Studien beschäftigen sich damit, molekularpathologische Marker zu identifizieren, die die Entscheidungsfindung zum Einsatz von monoklonalen Antikörpern oder Tyrosinkinaseinhibitoren gegen EGFR erleichtern.

6. Literatur-Verzeichnis

- ALOIA, T. A., D. H. HARPOLE, JR., C. E. REED, C. ALLEGRA, M. B. MOORE, J. E. HERNDON, 2ND and T. A. D'AMICO, 2001 Tumor marker expression is predictive of survival in patients with esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* **72**: 859-866.
- ALTOMARE, D. A., S. TANNO, A. DE RIENZO, A. J. KLEIN-SZANTO, K. L. SKELE, J. P. HOFFMAN and J. R. TESTA, 2002 Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J Cell Biochem* **87**: 470-476.
- AMADO, R. G., M. WOLF, M. PEETERS, E. VAN CUTSEM, S. SIENA, D. J. FREEMAN, T. JUAN, R. SIKORSKI, S. SUGGS, R. RADINSKY, S. D. PATTERSON and D. D. CHANG, 2008 Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **26**: 1626-1634.
- ARTEAGA, C. L., 2002 Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol* **29**: 3-9.
- AUBELE, M., H. ZITZELSBERGER, S. SZUCS, M. WERNER, H. BRASELMANN, P. HUTZLER, K. RODENACKER, L. LEHMANN, G. MINKUS and H. HOFLE, 1997 Comparative FISH analysis of numerical chromosome 7 abnormalities in 5-micron and 15-micron paraffin-embedded tissue sections from prostatic carcinoma. *Histochem Cell Biol* **107**: 121-126.
- AZUMA, K., I. OKAMOTO, A. KAWAHARA, T. TAIRA, K. NAKASHIMA, S. HATTORI, T. KINOSHITA, M. TAKEDA, K. NAKAGAWA, S. TAKAMORI, M. KUWANO, M. ONO and M. KAGE, 2011 Association of the Expression of Mutant Epidermal Growth Factor Receptor Protein as Determined with Mutation-Specific Antibodies in Non-small Cell Lung Cancer with Progression-Free Survival after Gefitinib Treatment. *J Thorac Oncol*.
- BASELGA, J., 2001 The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**: S16-22.
- BASELGA, J., L. NORTON, H. MASUI, A. PANDIELLA, K. COPLAN, W. H. MILLER, JR. and J. MENDELSON, 1993 Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst* **85**: 1327-1333.
- BAUMAN, J. G., J. WIEGANT, P. BORST and P. VAN DUIJN, 1980 A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res* **128**: 485-490.
- BERRA, E., J. MILANINI, D. E. RICHARD, M. LE GALL, F. VINALS, E. GOTHIE, D. ROUX, G. PAGES and J. POUYSSEGUR, 2000 Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol* **60**: 1171-1178.
- BHARGAVA, R., W. L. GERALD, A. R. LI, Q. PAN, P. LAL, M. LADANYI and B. CHEN, 2005 EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod Pathol* **18**: 1027-1033.

- BIAN, Y. S., M. C. OSTERHELD, F. T. BOSMAN, C. FONTOLLIET and J. BENHATTAR, 2000 Nuclear accumulation of beta-catenin is a common and early event during neoplastic progression of Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol* **114**: 583-590.
- BOKEMEYER, C., I. BONDARENKO, A. MAKHSON, J. T. HARTMANN, J. APARICIO, F. DE BRAUD, S. DONEA, H. LUDWIG, G. SCHUCH, C. STROH, A. H. LOOS, A. ZUBEL and P. KORALEWSKI, 2009 Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **27**: 663-671.
- BOLLSCHWEILER, E., E. WOLFGARTEN, C. GUTSCHOW and A. H. HOLSCHER, 2001 Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males. *Cancer* **92**: 549-555.
- BOTTERWECK, A. A., L. J. SCHOUTEN, A. VOLOVICS, E. DORANT and P. A. VAN DEN BRANDT, 2000 Trends in incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in ten European countries. *Int J Epidemiol* **29**: 645-654.
- BOURHIS, J., F. RIVERA, R. MESIA, A. AWADA, L. GEOFFROIS, C. BOREL, Y. HUMBLET, A. LOPEZ-POUSA, R. HITT, M. E. VEGA VILLEGAS, L. DUCK, D. ROSINE, N. AMELLAL, A. SCHUELER and A. HARSTRICK, 2006 Phase I/II study of cetuximab in combination with cisplatin or carboplatin and fluorouracil in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* **24**: 2866-2872.
- BROGNARD, J., A. S. CLARK, Y. NI and P. A. DENNIS, 2001 Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* **61**: 3986-3997.
- BUCKLEY, A. F., L. J. BURGART, V. SAHAI and S. KAKAR, 2008 Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in conventional hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* **129**: 245-251.
- CAMERON, A. J., J. LAGERGREN, C. HENRIKSSON, O. NYREN, G. R. LOCKE, 3RD and N. L. PEDERSEN, 2002 Gastroesophageal reflux disease in monozygotic and dizygotic twins. *Gastroenterology* **122**: 55-59.
- CANAGARAJAH, B. J., A. KHOKHLATCHEV, M. H. COBB and E. J. GOLDSMITH, 1997 Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**: 859-869.
- CHADHA, K. S., T. KHOURY, J. YU, J. D. BLACK, J. F. GIBBS, B. W. KUVSHINOFF, D. TAN, M. G. BRATTAIN and M. M. JAVLE, 2006 Activated Akt and Erk expression and survival after surgery in pancreatic carcinoma. *Ann Surg Oncol* **13**: 933-939.
- CHO, S. Y., and R. L. KLEMKE, 2000 Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *J Cell Biol* **149**: 223-236.
- CHUNG, C. H., K. ELY, L. MCGAVRAN, M. VARELLA-GARCIA, J. PARKER, N. PARKER, C. JARRETT, J. CARTER, B. A. MURPHY, J. NETTERVILLE, B. B. BURKEY, R. SINARD, A. CMELAK, S. LEVY, W. G. YARBROUGH, R. J. SLEBOS and F. R. HIRSCH, 2006 Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol* **24**: 4170-4176.

- CIARDIELLO, F., and G. TORTORA, 2001 A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* **7**: 2958-2970.
- CLARK, A. S., K. WEST, S. STREICHER and P. A. DENNIS, 2002 Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **1**: 707-717.
- COENRAAD, M., A. A. MASCLÉE, J. W. STRAATHOF, S. GANESH, G. GRIFFIOEN and C. B. LAMERS, 1998 Is Barrett's esophagus characterized by more pronounced acid reflux than severe esophagitis? *Am J Gastroenterol* **93**: 1068-1072.
- COPPOLA, D., R. H. SCHREIBER, L. MORA, W. DALTON and R. C. KARL, 1999 Significance of Fas and retinoblastoma protein expression during the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* **6**: 298-304.
- CORN, P. G., E. I. HEATH, R. HEITMILLER, F. FOGT, A. A. FORASTIERE, J. G. HERMAN and T. T. WU, 2001 Frequent hypermethylation of the 5' CpG island of E-cadherin in esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **7**: 2765-2769.
- CRONIN, J., E. MCADAM, A. DANIKAS, C. TSELEPIS, P. GRIFFITHS, J. BAXTER, L. THOMAS, J. MANSON and G. JENKINS, 2011 Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in high-grade dysplasia and adenocarcinoma of the esophagus and may represent a biomarker of histological progression in Barrett's esophagus (BE). *Am J Gastroenterol* **106**: 46-56.
- CUNNINGHAM, D., Y. HUMBLET, S. SIENA, D. KHAYAT, H. BLEIBERG, A. SANTORO, D. BETS, M. MUESER, A. HARSTRICK, C. VERSLYPE, I. CHAU and E. VAN CUTSEM, 2004 Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **351**: 337-345.
- DAI, D. L., M. MARTINKA and G. LI, 2005 Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol* **23**: 1473-1482.
- DANK, M., J. ZALUSKI, C. BARONE, V. VALVERE, S. YALCIN, C. PESCHEL, M. WENCZL, E. GOKER, L. CISAR, K. WANG and R. BUGAT, 2008 Randomized phase III study comparing irinotecan combined with 5-fluorouracil and folinic acid to cisplatin combined with 5-fluorouracil in chemotherapy naive patients with advanced adenocarcinoma of the stomach or esophagogastric junction. *Ann Oncol* **19**: 1450-1457.
- DATTA, S. R., A. BRUNET and M. E. GREENBERG, 1999 Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* **13**: 2905-2927.
- DEI TOS, A. P., and I. ELLIS, 2005 Assessing epidermal growth factor receptor expression in tumours: what is the value of current test methods? *Eur J Cancer* **41**: 1383-1392.
- DEMEESTER, T. R., 2001 Clinical biology of the Barrett's metaplasia, dysplasia to carcinoma sequence. *Surg Oncol* **10**: 91-102.
- DEVESA, S. S., W. J. BLOT and J. F. FRAUMENI, JR., 1998 Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* **83**: 2049-2053.
- DHANASEKARAN, N., and E. PREMKUMAR REDDY, 1998 Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* **17**: 1447-1455.

- DI CRISTOFANO, A., P. KOTSI, Y. F. PENG, C. CORDON-CARDO, K. B. ELKON and P. P. PANDOLFI, 1999 Impaired Fas response and autoimmunity in Pten^{+/-} mice. *Science* **285**: 2122-2125.
- DRAGOVICH, T., and C. CAMPEN, 2009 Anti-EGFR-Targeted Therapy for Esophageal and Gastric Cancers: An Evolving Concept. *J Oncol* **2009**: 804108.
- DRAGOVICH, T., S. MCCOY, C. M. FENOGLIO-PREISER, J. WANG, J. K. BENEDETTI, A. F. BAKER, C. B. HACKETT, S. G. URBA, K. S. ZANER, C. D. BLANKE and J. L. ABBRUZZESE, 2006 Phase II trial of erlotinib in gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: SWOG 0127. *J Clin Oncol* **24**: 4922-4927.
- EADS, C. A., R. V. LORD, K. WICKRAMASINGHE, T. I. LONG, S. K. KURUMBOOR, L. BERNSTEIN, J. H. PETERS, S. R. DEMEESTER, T. R. DEMEESTER, K. A. SKINNER and P. W. LAIRD, 2001 Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* **61**: 3410-3418.
- ENDO, H., Y. ISHIBASHI, E. YAMAKI, T. YOSHIDA, T. YAJIMA, H. KIMURA, T. KOSAKA, R. ONOZATO, S. TANAKA, T. MITSUDOMI and H. KUWANO, 2009 Immunohistochemical analysis of phosphorylated epidermal growth factor receptor might provide a surrogate marker of EGFR mutation. *Lung Cancer* **63**: 241-246.
- ERMOIAN, R. P., C. S. FURNISS, K. R. LAMBORN, D. BASILA, M. S. BERGER, A. R. GOTTSCHALK, M. K. NICHOLAS, D. STOKOE and D. A. HAAS-KOGAN, 2002 Dysregulation of PTEN and protein kinase B is associated with glioma histology and patient survival. *Clin Cancer Res* **8**: 1100-1106.
- FARROW, D. C., T. L. VAUGHAN, C. SWEENEY, M. D. GAMMON, W. H. CHOW, H. A. RISCH, J. L. STANFORD, P. D. HANSTEN, S. T. MAYNE, J. B. SCHOENBERG, H. ROTTERDAM, H. AHSAN, A. B. WEST, R. DUBROW, J. F. FRAUMENI, JR. and W. J. BLOT, 2000 Gastroesophageal reflux disease, use of H2 receptor antagonists, and risk of esophageal and gastric cancer. *Cancer Causes Control* **11**: 231-238.
- FERRY, D. R., M. ANDERSON, K. BEDDARD, S. TOMLINSON, P. ATHERFOLD, J. OBSZYNSKA, R. HARRISON and J. JANKOWSKI, 2007 A phase II study of gefitinib monotherapy in advanced esophageal adenocarcinoma: evidence of gene expression, cellular, and clinical response. *Clin Cancer Res* **13**: 5869-5875.
- FITZGERALD, R. C., I. T. SAEED, D. KHOO, M. J. FARTHING and W. R. BURNHAM, 2001 Rigorous surveillance protocol increases detection of curable cancers associated with Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* **46**: 1892-1898.
- FOLPRECHT, G., M. T. SEYMOUR, L. SALTZ, J. Y. DOUILLARD, H. HECKER, R. J. STEPHENS, T. S. MAUGHAN, E. VAN CUTSEM, P. ROUGIER, E. MITRY, U. SCHUBERT and C. H. KOHNE, 2008 Irinotecan/fluorouracil combination in first-line therapy of older and younger patients with metastatic colorectal cancer: combined analysis of 2,691 patients in randomized controlled trials. *J Clin Oncol* **26**: 1443-1451.
- FREITAS, S., D. H. MOORE, H. MICHAEL and M. R. KELLEY, 2003 Studies of apurinic/aprimidinic endonuclease/ref-1 expression in epithelial ovarian cancer: correlations with tumor progression and platinum resistance. *Clin Cancer Res* **9**: 4689-4694.

- G. Y. KU, M. A. S., L. H. TANG, ET AL., 2008 "Cetuximab (C225) plus irinotecan/cisplatin (CPT/Cis) for CPT/Cis-refractory esophageal cancer,". Proceedings of the American Society of Clinical Oncology Annual Meeting.
- GAMBOA-DOMINGUEZ, A., C. DOMINGUEZ-FONSECA, L. QUINTANILLA-MARTINEZ, E. REYES-GUTIERREZ, D. GREEN, A. ANGELES-ANGELES, R. BUSCH, C. HERMANNSTADTER, J. NAHRIG, K. F. BECKER, I. BECKER, H. HOFER, F. FEND and B. LUBER, 2004 Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in gastric adenocarcinoma from Mexican patients: a multivariate analysis using a standardized immunohistochemical detection system. *Mod Pathol* **17**: 579-587.
- GIBALT, L., J. P. METGES, V. CONAN-CHARLET, P. LOZAC'H, M. ROBASZKIEWICZ, C. BESSAGUET, N. LAGARDE and A. VOLANT, 2005 Diffuse EGFR staining is associated with reduced overall survival in locally advanced oesophageal squamous cell cancer. *Br J Cancer* **93**: 107-115.
- GIBSON, M. K., S. C. ABRAHAM, T. T. WU, B. BURTNES, R. F. HEITMILLER, E. HEATH and A. FORASTIERE, 2003 Epidermal growth factor receptor, p53 mutation, and pathological response predict survival in patients with locally advanced esophageal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* **9**: 6461-6468.
- GOLD, P. J., B. GOLDMAN, S. IQBAL, L. P. LEICHMAN, W. ZHANG, H. J. LENZ and C. D. BLANKE, 2010 Cetuximab as second-line therapy in patients with metastatic esophageal adenocarcinoma: a phase II Southwest Oncology Group Study (S0415). *J Thorac Oncol* **5**: 1472-1476.
- GOLDSTEIN, N. I., M. PREWETT, K. ZUKLYS, P. ROCKWELL and J. MENDELSON, 1995 Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* **1**: 1311-1318.
- GRAY, J. W., D. PINKEL and J. M. BROWN, 1994 Fluorescence in situ hybridization in cancer and radiation biology. *Radiat Res* **137**: 275-289.
- GRUNWALD, V., and M. HIDALGO, 2003 Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* **95**: 851-867.
- GUO, M., S. LIU and F. LU, 2006 Gefitinib-sensitizing mutations in esophageal carcinoma. *N Engl J Med* **354**: 2193-2194.
- HAMAD, N. M., J. H. ELCONIN, A. E. KARNOUB, W. BAI, J. N. RICH, R. T. ABRAHAM, C. J. DER and C. M. COUNTER, 2002 Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev* **16**: 2045-2057.
- HARARI, P. M., 2004 Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* **11**: 689-708.
- HICKEY, K., D. GREHAN, I. M. REID, S. O'BRIAIN, T. N. WALSH and T. P. HENNESSY, 1994 Expression of epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen predicts response of esophageal squamous cell carcinoma to chemoradiotherapy. *Cancer* **74**: 1693-1698.
- HILGER, R. A., M. E. SCHEULEN and D. STRUMBERG, 2002 The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* **25**: 511-518.

- HILL, M. M., and B. A. HEMMINGS, 2002 Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther* **93**: 243-251.
- HIRSCH, F. R., R. S. HERBST, C. OLSEN, K. CHANSKY, J. CROWLEY, K. KELLY, W. A. FRANKLIN, P. A. BUNN, JR., M. VARELLA-GARCIA and D. R. GANDARA, 2008 Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *J Clin Oncol* **26**: 3351-3357.
- HIRSCH, F. R., M. VARELLA-GARCIA, P. A. BUNN, JR., M. V. DI MARIA, R. VEVE, R. M. BREMMES, A. E. BARON, C. ZENG and W. A. FRANKLIN, 2003 Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* **21**: 3798-3807.
- HOLBRO, T., and N. E. HYNES, 2004 ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 195-217.
- HOPMAN, A. H., F. C. RAMAEKERS, A. K. RAAP, J. L. BECK, P. DEVILEE, M. VAN DER PLOEG and G. P. VOOIJS, 1988 In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochemistry* **89**: 307-316.
- HUMPHREY, P. A., A. J. WONG, B. VOGELSTEIN, M. R. ZALUTSKY, G. N. FULLER, G. E. ARCHER, H. S. FRIEDMAN, M. M. KWATRA, S. H. BIGNER and D. D. BIGNER, 1990 Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4207-4211.
- HUYNH, H., T. T. NGUYEN, K. H. CHOW, P. H. TAN, K. C. SOO and E. TRAN, 2003 Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol* **3**: 19.
- INTERNETLINK_1, <http://www.zeiss.de/C12567BE0045ACF1/Contents-Frame/5526047F488326CDC1256CB5003AC1B5>.
- ISHIKAWA, T., M. KOBAYASHI, M. MAI, T. SUZUKI and A. OOI, 1997 Amplification of the c-erbB-2 (HER-2/neu) gene in gastric cancer cells. Detection by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* **151**: 761-768.
- ITAKURA, Y., H. SASANO, C. SHIGA, Y. FURUKAWA, K. SHIGA, S. MORI and H. NAGURA, 1994 Epidermal growth factor receptor overexpression in esophageal carcinoma. An immunohistochemical study correlated with clinicopathologic findings and DNA amplification. *Cancer* **74**: 795-804.
- JANKOWSKI, J. A., D. PROVENZALE and P. MOAYYEDI, 2002 Esophageal adenocarcinoma arising from Barrett's metaplasia has regional variations in the west. *Gastroenterology* **122**: 588-590.
- JANKOWSKI, J. A., N. A. WRIGHT, S. J. MELTZER, G. TRIADAFILOPOULOS, K. GEBOES, A. G. CASSON, D. KERR and L. S. YOUNG, 1999 Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* **154**: 965-973.
- JAVLE, M. M., J. YU, T. KHOURY, K. S. CHADHA, R. V. IYER, J. FOSTER, B. W. KUVSHINOFF, J. F. GIBBS, J. GERADTS, J. D. BLACK and M. G. BRATTAIN, 2006 Akt expression may predict favorable prognosis in cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* **21**: 1744-1751.

- JENKINS, G. J., S. H. DOAK, J. M. PARRY, F. R. D'SOUZA, A. P. GRIFFITHS and J. N. BAXTER, 2002 Genetic pathways involved in the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma. *Br J Surg* **89**: 824-837.
- JEON, Y. K., S. W. SUNG, J. H. CHUNG, W. S. PARK, J. W. SEO, C. W. KIM and D. H. CHUNG, 2006 Clinicopathologic features and prognostic implications of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number and protein expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **54**: 387-398.
- KARAPETIS, C. S., S. KHAMBATA-FORD, D. J. JONKER, C. J. O'CALLAGHAN, D. TU, N. C. TEBBUTT, R. J. SIMES, H. CHALCHAL, J. D. SHAPIRO, S. ROBITAILLE, T. J. PRICE, L. SHEPHERD, H. J. AU, C. LANGER, M. J. MOORE and J. R. ZALCBERG, 2008 K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* **359**: 1757-1765.
- KERBEL, R., and J. FOLKMAN, 2002 Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* **2**: 727-739.
- KHOKHLATCHEV, A. V., B. CANAGARAJAH, J. WILSBACHER, M. ROBINSON, M. ATKINSON, E. GOLDSMITH and M. H. COBB, 1998 Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* **93**: 605-615.
- KIM, D. W., H. S. MIN, K. H. LEE, Y. J. KIM, D. Y. OH, Y. K. JEON, S. H. LEE, S. A. IM, D. H. CHUNG, Y. T. KIM, T. Y. KIM, Y. J. BANG, S. W. SUNG, J. H. KIM and D. S. HEO, 2008a High tumour islet macrophage infiltration correlates with improved patient survival but not with EGFR mutations, gene copy number or protein expression in resected non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* **98**: 1118-1124.
- KIM, I. J., J. H. PARK, H. C. KANG, Y. SHIN, H. W. PARK, H. R. PARK, J. L. KU, S. B. LIM and J. G. PARK, 2003 Mutational analysis of BRAF and K-ras in gastric cancers: absence of BRAF mutations in gastric cancers. *Hum Genet* **114**: 118-120.
- KIM, M. A., H. S. LEE, H. E. LEE, Y. K. JEON, H. K. YANG and W. H. KIM, 2008b EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathology* **52**: 738-746.
- KITAGAWA, Y., M. UEDA, N. ANDO, S. OZAWA, N. SHIMIZU and M. KITAJIMA, 1996 Further evidence for prognostic significance of epidermal growth factor receptor gene amplification in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **2**: 909-914.
- KOAK, Y., and M. WINSLET, 2002 Changing role of in vivo models in columnar-lined lower esophagus. *Dis Esophagus* **15**: 271-277.
- KOLCH, W., 2000 Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* **351 Pt 2**: 289-305.
- KONONEN, J., L. BUBENDORF, A. KALLIONIEMI, M. BARLUND, P. SCHRAML, S. LEIGHTON, J. TORHORST, M. J. MIHATSCH, G. SAUTER and O. P. KALLIONIEMI, 1998 Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* **4**: 844-847.
- KROLL, J., and J. WALTENBERGER, 1997 The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* **272**: 32521-32527.

- KROLL, J., and J. WALTENBERGER, 2000 [Regulation of the endothelial function and angiogenesis by vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)]. *Z Kardiol* **89**: 206-218.
- KYRIAKIS, J. M., and J. AVRUCH, 2001 Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**: 807-869.
- LAGERGREN, J., R. BERGSTROM, A. LINDGREN and O. NYREN, 1999 Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* **340**: 825-831.
- LEE, J. T., JR., and J. A. MCCUBREY, 2002 The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia* **16**: 486-507.
- LEE, S. H., J. W. LEE, Y. H. SOUNG, H. S. KIM, W. S. PARK, S. Y. KIM, J. H. LEE, J. Y. PARK, Y. G. CHO, C. J. KIM, S. W. NAM, S. H. KIM, J. Y. LEE and N. J. YOO, 2003 BRAF and KRAS mutations in stomach cancer. *Oncogene* **22**: 6942-6945.
- LEFLOCH, R., J. POUYSSEGUR and P. LENORMAND, 2008 Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol Cell Biol* **28**: 511-527.
- LEWIS, T. S., P. S. SHAPIRO and N. G. AHN, 1998 Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* **74**: 49-139.
- LIANG, J., J. ZUBOVITZ, T. PETROCELLI, R. KOTCHETKOV, M. K. CONNOR, K. HAN, J. H. LEE, S. CIARALLO, C. CATZAVELOS, R. BENISTON, E. FRANSSSEN and J. M. SLINGERLAND, 2002 PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* **8**: 1153-1160.
- LIM, W. T., W. H. ZHANG, C. R. MILLER, J. W. WATTERS, F. GAO, A. VISWANATHAN, R. GOVINDAN and H. L. MCLEOD, 2007 PTEN and phosphorylated AKT expression and prognosis in early- and late-stage non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* **17**: 853-857.
- LOCKE, G. R., 3RD, N. J. TALLEY, S. L. FETT, A. R. ZINSMEISTER and L. J. MELTON, 3RD, 1997 Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* **112**: 1448-1456.
- LORDICK, F., S. LORENZEN, J. STOLLFUSS, U. VEHLING-KAISER, F. KULLMANN, M. HENTRICH, R. ZUMSCHLINGE, H. DIETZFELBINGER, J. THOEDTMANN, M. HENNIG, T. SERONEIT, R. BREDENKAMP, J. DUYSER and C. PESCHEL, 2005 Phase II study of weekly oxaliplatin plus infusional fluorouracil and folinic acid (FUFOX regimen) as first-line treatment in metastatic gastric cancer. *Br J Cancer* **93**: 190-194.
- LORDICK, F., B. LUBER, S. LORENZEN, S. HEGEWISCH-BECKER, G. FOLPRECHT, E. WOLL, T. DECKER, E. ENDLICHER, N. ROTHING, T. SCHUSTER, G. KELLER, F. FEND and C. PESCHEL, 2010 Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Br J Cancer* **102**: 500-505.
- LOUPAKIS, F., E. VASILE, D. SANTINI, G. MASI, A. FALCONE and F. GRAZIANO, 2008 EGF-receptor targeting with monoclonal antibodies in colorectal carcinomas: rationale for a pharmacogenomic approach. *Pharmacogenomics* **9**: 55-69.
- LYNCH, T. J., D. W. BELL, R. SORDELLA, S. GURUBHAGAVATULA, R. A. OKIMOTO, B. W. BRANNIGAN, P. L. HARRIS, S. M. HASERLAT, J. G. SUPKO, F. G. HALUSKA, D. N. LOUIS, D. C.

- CHRISTIANI, J. SETTLEMAN and D. A. HABER, 2004 Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **350**: 2129-2139.
- MAIERHOFER, C., R. GANGNUS, J. DIEBOLD and M. R. SPEICHER, 2003 Multicolor deconvolution microscopy of thick biological specimens. *Am J Pathol* **162**: 373-379.
- MALDEN, L. T., U. NOVAK, A. H. KAYE and A. W. BURGESS, 1988 Selective amplification of the cytoplasmic domain of the epidermal growth factor receptor gene in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* **48**: 2711-2714.
- MARX, A. H., M. ZIELINSKI, C. M. KOWITZ, A. M. DANCAU, S. THIELTGES, R. SIMON, M. CHOSCHZICK, E. YEKEBAS, J. T. KAIFI, M. MIRLACHER, D. ATANACKOVIC, T. H. BRUMMENDORF, W. FIEDLER, C. BOKEMEYER, J. R. IZBICKI and G. SAUTER, 2010 Homogeneous EGFR amplification defines a subset of aggressive Barrett's adenocarcinomas with poor prognosis. *Histopathology* **57**: 418-426.
- MAWRIN, C., S. DIETE, T. TREUHEIT, S. KROPF, C. K. VORWERK, C. BOLTZE, E. KIRCHES, R. FIRSCHING and K. DIETZMANN, 2003 Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme. *Int J Oncol* **23**: 641-648.
- MENGES, M., M. MULLER and M. ZEITZ, 2001 Increased acid and bile reflux in Barrett's esophagus compared to reflux esophagitis, and effect of proton pump inhibitor therapy. *Am J Gastroenterol* **96**: 331-337.
- MOODIE, S. A., and A. WOLFMAN, 1994 The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet* **10**: 44-48.
- MOSCATELLO, D. K., M. HOLGADO-MADRUGA, D. R. EMLET, R. B. MONTGOMERY and A. J. WONG, 1998 Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **273**: 200-206.
- MOTOYAMA, A. B., N. E. HYNES and H. A. LANE, 2002 The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* **62**: 3151-3158.
- MUKAIDA, H., M. TOI, T. HIRAI, Y. YAMASHITA and T. TOGE, 1991 Clinical significance of the expression of epidermal growth factor and its receptor in esophageal cancer. *Cancer* **68**: 142-148.
- MUKOHARA, T., S. KUDOH, S. YAMAUCHI, T. KIMURA, N. YOSHIMURA, H. KANAZAWA, K. HIRATA, H. WANIBUCHI, S. FUKUSHIMA, K. INOUE and J. YOSHIKAWA, 2003 Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and downstream-activated peptides in surgically excised non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* **41**: 123-130.
- MURAKAMI, D., S. TSUJITANI, T. OSAKI, H. SAITO, K. KATANO, S. TATEBE and M. Ikeguchi, 2007 Expression of phosphorylated Akt (pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy. *Gastric Cancer* **10**: 45-51.
- NAKAMURA, H., N. KAWASAKI, M. TAGUCHI and K. KABASAWA, 2006 Survival impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Thorax* **61**: 140-145.

- NAM, S. Y., H. S. LEE, G. A. JUNG, J. CHOI, S. J. CHO, M. K. KIM, W. H. KIM and B. L. LEE, 2003 Akt/PKB activation in gastric carcinomas correlates with clinicopathologic variables and prognosis. *APMIS* **111**: 1105-1113.
- NANNINI, M., M. A. PANTALEO, P. PATERINI, G. PIAZZI, C. CECCARELLI, S. LA ROVERE, A. MALEDDU and G. BIASCO, 2011 Molecular detection of epidermal growth factor receptor in colorectal cancer: does it still make sense? *Colorectal Dis* **13**: 542-548.
- NICHOLSON, K. M., and N. G. ANDERSON, 2002 The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* **14**: 381-395.
- NICHOLSON, R. I., J. M. GEE and M. E. HARPER, 2001 EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**: S9-15.
- OLAYIOYE, M. A., R. M. NEVE, H. A. LANE and N. E. HYNES, 2000 The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* **19**: 3159-3167.
- OSAKI, M., M. OSHIMURA and H. ITO, 2004 PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* **9**: 667-676.
- OZAWA, S., M. UEDA, N. ANDO, N. SHIMIZU and O. ABE, 1989 Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* **63**: 2169-2173.
- PAEZ, J. G., P. A. JANNE, J. C. LEE, S. TRACY, H. GREULICH, S. GABRIEL, P. HERMAN, F. J. KAYE, N. LINDEMAN, T. J. BOGGON, K. NAOKI, H. SASAKI, Y. FUJII, M. J. ECK, W. R. SELLERS, B. E. JOHNSON and M. MEYERSON, 2004 EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **304**: 1497-1500.
- PAGES, G., J. MILANINI, D. E. RICHARD, E. BERRA, E. GOTHIE, F. VINALS and J. POUYSSEGUR, 2000 Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade. *Ann N Y Acad Sci* **902**: 187-200.
- PARRILLA, P., L. F. MARTINEZ DE HARO, A. ORTIZ, V. MUNITIZ, J. MOLINA, J. BERMEJO and M. CANTERAS, 2003 Long-term results of a randomized prospective study comparing medical and surgical treatment of Barrett's esophagus. *Ann Surg* **237**: 291-298.
- PEARSON, G., F. ROBINSON, T. BEERS GIBSON, B. E. XU, M. KARANDIKAR, K. BERMAN and M. H. COBB, 2001 Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**: 153-183.
- PEDERSEN, M. W., M. MELTORN, L. DAMSTRUP and H. S. POULSEN, 2001 The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann Oncol* **12**: 745-760.
- PEREZ-TENORIO, G., and O. STAL, 2002 Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer* **86**: 540-545.
- PETERS, F. T., S. GANESH, E. J. KUIPERS, W. J. SLUITER, E. C. KLINKENBERG-KNOL, C. B. LAMERS and J. H. KLEIBEUKER, 1999 Endoscopic regression of Barrett's oesophagus during omeprazole treatment; a randomised double blind study. *Gut* **45**: 489-494.
- PETTIT, A. M., J. RAK, M. C. HUNG, P. ROCKWELL, N. GOLDSTEIN, B. FENDLY and R. S. KERBEL, 1997 Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro

- and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* **151**: 1523-1530.
- PINKEL, D., T. STRAUME and J. W. GRAY, 1986 Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 2934-2938.
- PINTO, C., F. DI FABIO, C. BARONE, S. SIENA, A. FALCONE, S. CASCINU, F. L. ROJAS LLIMPE, G. STELLA, G. SCHINZARI, S. ARTALE, V. MUTRI, S. GIAQUINTA, L. GIANNETTA, A. BARDELLI and A. A. MARTONI, 2009 Phase II study of cetuximab in combination with cisplatin and docetaxel in patients with untreated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (DOCETUX study). *Br J Cancer* **101**: 1261-1268.
- PINTO, C., F. DI FABIO, S. SIENA, S. CASCINU, F. L. ROJAS LLIMPE, C. CECCARELLI, V. MUTRI, L. GIANNETTA, S. GIAQUINTA, C. FUNAIOLI, R. BERARDI, C. LONGOBARDI, E. PIANA and A. A. MARTONI, 2007 Phase II study of cetuximab in combination with FOLFIRI in patients with untreated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (FOLCETUX study). *Ann Oncol* **18**: 510-517.
- POZZO, C., C. BARONE, J. SZANTO, E. PADI, C. PESCHEL, J. BUKKI, V. GORBUNOVA, V. VALVERE, J. ZALUSKI, M. BIAKHOV, E. ZUBER, C. JACQUES and R. BUGAT, 2004 Irinotecan in combination with 5-fluorouracil and folinic acid or with cisplatin in patients with advanced gastric or esophageal-gastric junction adenocarcinoma: results of a randomized phase II study. *Ann Oncol* **15**: 1773-1781.
- PREWETT, M. C., A. T. HOOPER, R. BASSI, L. M. ELLIS, H. W. WAKSAL and D. J. HICKLIN, 2002 Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res* **8**: 994-1003.
- PUHRINGER-OPPERMANN, F. A., H. J. STEIN and M. SARBIA, 2007 Lack of EGFR gene mutations in exons 19 and 21 in esophageal (Barrett's) adenocarcinomas. *Dis Esophagus* **20**: 9-11.
- RAUSER, S., R. WEIS, H. BRASELMANN, M. FEITH, H. J. STEIN, R. LANGER, P. HUTZLER, M. HAUSMANN, S. LASSMANN, J. R. SIEWERT, H. HOFER, M. WERNER and A. WALCH, 2007 Significance of HER2 low-level copy gain in Barrett's cancer: implications for fluorescence in situ hybridization testing in tissues. *Clin Cancer Res* **13**: 5115-5123.
- REDDY, K. B., S. M. NABHA and N. ATANASKOVA, 2003 Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* **22**: 395-403.
- RIEGMAN, P. H., K. J. VISSERS, J. C. ALERS, E. GEELLEN, W. C. HOP, H. W. TILANUS and H. VAN DEKKEN, 2001 Genomic alterations in malignant transformation of Barrett's esophagus. *Cancer Res* **61**: 3164-3170.
- ROBINSON, M. J., and M. H. COBB, 1997 Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 180-186.
- ROY, H. K., B. F. OLUSOLA, D. L. CLEMENS, W. J. KAROLSKI, A. RATASHAK, H. T. LYNCH and T. C. SMYRK, 2002 AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **23**: 201-205.

- SALTZ, L. B., N. J. MEROPOL, P. J. LOEHRER, SR., M. N. NEEDLE, J. KOPIT and R. J. MAYER, 2004 Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* **22**: 1201-1208.
- SAUTER, E. R., S. M. KELLER, S. ERNER and M. GOLDBERG, 1993a HER-2/neu: a differentiation marker in adenocarcinoma of the esophagus. *Cancer Lett* **75**: 41-44.
- SAUTER, G., H. MOCH, F. GUDAT, M. J. MIHATSCH, J. HALEY, T. MEECKER and F. WALDMAN, 1993b [Demonstration of gene amplification in urinary bladder cancer by fluorescent in situ hybridization (FISH)]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **77**: 247-251.
- SAUTER, G., R. SIMON and K. HILLAN, 2003 Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 962-972.
- SCHAEFFER, H. J., and M. J. WEBER, 1999 Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**: 2435-2444.
- SCHLESSINGER, J., 2000 Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**: 211-225.
- SCHRAMEK, H., 2002 MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease. *News Physiol Sci* **17**: 62-67.
- SHAH, A., W. A. SWAIN, D. RICHARDSON, J. EDWARDS, D. J. STEWART, C. M. RICHARDSON, D. E. SWINSON, D. PATEL, J. L. JONES and K. J. O'BYRNE, 2005 Phospho-akt expression is associated with a favorable outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 2930-2936.
- SHAHEEN, N. J., M. A. CROSBY, E. M. BOZYMSKI and R. S. SANDLER, 2000 Is there publication bias in the reporting of cancer risk in Barrett's esophagus? *Gastroenterology* **119**: 333-338.
- SIEWERT, J. R., 2007 [Esophageal carcinoma]. *Chirurg* **78**: 475-484; quiz 485.
- SIEWERT, J. R., A. H. HOLSCHER, K. BECKER and W. GOSSNER, 1987 [Cardia cancer: attempt at a therapeutically relevant classification]. *Chirurg* **58**: 25-32.
- SOBIN, L. H., and I. D. FLEMING, 1997 TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* **80**: 1803-1804.
- SPANO, J. P., C. LAGORCE, D. ATLAN, G. MILANO, J. DOMONT, R. BENAMOUZIG, A. ATTAR, J. BENICHOU, A. MARTIN, J. F. MORERE, M. RAPHAEL, F. PENAULT-LLORCA, J. L. BREAU, R. FAGARD, D. KHAYAT and P. WIND, 2005 Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* **16**: 102-108.
- STATISTISCHES_BUNDESAMT, 2010
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell.html?nn=50808>.
- STEIN, H. J., M. FEITH and H. FEUSSNER, 2000a The relationship between gastroesophageal reflux, intestinal metaplasia and adenocarcinoma of the esophagus. *Langenbeck's Archives of Surgery* **385**: 309-316.

- STEIN, H. J., M. FEITH and H. FEUSSNER, 2000b The relationship between gastroesophageal reflux, intestinal metaplasia and adenocarcinoma of the esophagus. *Langenbecks Arch Surg* **385**: 309-316.
- STEIN, H. J., M. FEITH, J. MUELLER, M. WERNER and J. R. SIEWERT, 2000c Limited resection for early adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Ann Surg* **232**: 733-742.
- STEIN, H. J., B. H. VON RAHDEN, H. HOFER and J. R. SIEWERT, 2003 [Carcinoma of the oesophagogastric junction and Barrett's esophagus: an almost clear oncologic model?]. *Chirurg* **74**: 703-708.
- SUN, H., R. LESCHE, D. M. LI, J. LILIENTAL, H. ZHANG, J. GAO, N. GAVRILOVA, B. MUELLER, X. LIU and H. WU, 1999 PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6199-6204.
- SUTTER, A. P., M. HOPFNER, A. HUETHER, K. MAASER and H. SCHERUBL, 2006 Targeting the epidermal growth factor receptor by erlotinib (Tarceva) for the treatment of esophageal cancer. *Int J Cancer* **118**: 1814-1822.
- SUZUKI, S., Y. DOBASHI, H. SAKURAI, K. NISHIKAWA, M. HANAWA and A. OOI, 2005 Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas. An immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Cancer* **103**: 1265-1273.
- TANNO, S., N. YANAGAWA, A. HABIRO, K. KOIZUMI, Y. NAKANO, M. OSANAI, Y. MIZUKAMI, T. OKUMURA, J. R. TESTA and Y. KOHGO, 2004 Serine/threonine kinase AKT is frequently activated in human bile duct cancer and is associated with increased radioresistance. *Cancer Res* **64**: 3486-3490.
- TESTA, J. R., and A. BELLACOSA, 2001 AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10983-10985.
- THIENELT, C. D., P. A. BUNN, JR., N. HANNA, A. ROSENBERG, M. N. NEEDLE, M. E. LONG, D. L. GUSTAFSON and K. KELLY, 2005 Multicenter phase I/II study of cetuximab with paclitaxel and carboplatin in untreated patients with stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **23**: 8786-8793.
- TOBEY, N. A., S. S. HOSSEINI, C. CAYMAZ-BOR, H. R. WYATT, G. S. ORLANDO and R. C. ORLANDO, 2001 The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol* **96**: 3062-3070.
- TOMITA, Y., T. MOROOKA, Y. HOSHIDA, B. ZHANG, Y. QIU, I. NAKAMICHI, K. HAMADA, T. UEDA, N. NAKA, I. KUDAWARA and K. AOZASA, 2006 Prognostic significance of activated AKT expression in soft-tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* **12**: 3070-3077.
- TSELEPIS, C., C. D. MORRIS, D. WAKELIN, R. HARDY, I. PERRY, Q. T. LUONG, E. HARPER, R. HARRISON, S. E. ATTWOOD and J. A. JANKOWSKI, 2003 Upregulation of the oncogene c-myc in Barrett's adenocarcinoma: induction of c-myc by acidified bile acid in vitro. *Gut* **52**: 174-180.

- TSELEPIS, C., I. PERRY, C. DAWSON, R. HARDY, S. J. DARNTON, C. MCCONKEY, R. C. STUART, N. WRIGHT, R. HARRISON and J. A. JANKOWSKI, 2002 Tumour necrosis factor-alpha in Barrett's oesophagus: a potential novel mechanism of action. *Oncogene* **21**: 6071-6081.
- VAN DEKKEN, H., and J. G. BAUMAN, 1988 A new application of in situ hybridization: detection of numerical and structural chromosome aberrations with a combination centromeric-telomeric DNA probe. *Cytogenet Cell Genet* **48**: 188-189.
- VERMORKEN, J. B., R. MESIA, F. RIVERA, E. REMENAR, A. KAWECKI, S. ROTTEY, J. ERFAN, D. ZABOLOTNYY, H. R. KIENZER, D. CUISSOL, F. PEYRADE, M. BENASSO, I. VYNNYCHENKO, D. DE RAUCOURT, C. BOKEMEYER, A. SCHUELER, N. AMELLAL and R. HITT, 2008 Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* **359**: 1116-1127.
- VIALA, E., and J. POUYSSEGUR, 2004 Regulation of tumor cell motility by ERK mitogen-activated protein kinases. *Ann N Y Acad Sci* **1030**: 208-218.
- VIVANCO, I., and C. L. SAWYERS, 2002 The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**: 489-501.
- VIZCAINO, A. P., V. MORENO, R. LAMBERT and D. M. PARKIN, 2002 Time trends incidence of both major histologic types of esophageal carcinomas in selected countries, 1973-1995. *Int J Cancer* **99**: 860-868.
- VOLDBORG, B. R., L. DAMSTRUP, M. SPANG-THOMSEN and H. S. POULSEN, 1997 Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* **8**: 1197-1206.
- WALCH, A., K. BINK, P. HUTZLER, H. HOFLE and M. WERNER, 2000 HER-2/neu gene amplification by FISH predicts poor survival in Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma. *Hum Pathol* **31**: 1332-1334.
- WALCH, A., K. BINK, P. HUTZLER, H. ZITZELSBERGER, H. BRASELMANN, M. AUBELE, H. HOFLE and M. WERNER, 2001 [Oncogene amplification and genetic heterogeneity in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett esophagus]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **85**: 257-263.
- WANG, K. L., T. T. WU, I. S. CHOI, H. WANG, E. RESETKOVA, A. M. CORREA, W. L. HOFSTETTER, S. G. SWISHER, J. A. AJANI, A. RASHID and C. T. ALBARRACIN, 2007 Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Cancer* **109**: 658-667.
- WANG, S. S., Z. Z. GUAN, Y. Q. XIANG, B. WANG, T. Y. LIN, W. Q. JIANG, L. ZHANG, H. Z. ZHANG and J. H. HOU, 2006 [Significance of EGFR and p-ERK expression in nasopharyngeal carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **28**: 28-31.
- WEBB, C. P., L. VAN AELST, M. H. WIGLER and G. F. WOUDE, 1998 Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8773-8778.
- WELLS, A., 1999 EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 637-643.
- WENG, L., J. BROWN and C. ENG, 2001 PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways. *Hum Mol Genet* **10**: 237-242.

-
- WILD, C. P., and L. J. HARDIE, 2003 Reflux, Barrett's oesophagus and adenocarcinoma: burning questions. *Nat Rev Cancer* **3**: 676-684.
- WILKINSON, N. W., J. D. BLACK, E. ROUKHADZE, D. DRISCOLL, S. SMILEY, H. HOSHI, J. GERADTS, M. JAVLE and M. BRATTAIN, 2004 Epidermal growth factor receptor expression correlates with histologic grade in resected esophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* **8**: 448-453.
- WOODBURN, J. R., 1999 The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* **82**: 241-250.
- WU, X., Z. FAN, H. MASUI, N. ROSEN and J. MENDELSON, 1995 Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest* **95**: 1897-1905.
- YACOB, L., H. GOLDMAN and R. D. ODZE, 1997 Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor receptor, and MiB-1 expression in Barrett's-associated neoplasia: correlation with prognosis. *Mod Pathol* **10**: 105-112.
- YAMAMOTO, S., Y. TOMITA, Y. HOSHIDA, T. MOROOKA, H. NAGANO, K. DONO, K. UMESHITA, M. SAKON, O. ISHIKAWA, H. OHIGASHI, S. NAKAMORI, M. MONDEN and K. AOZASA, 2004 Prognostic significance of activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **10**: 2846-2850.
- YANO, H., H. SHIOZAKI, K. KOBAYASHI, T. YANO, H. TAHARA, S. TAMURA and T. MORI, 1991 Immunohistologic detection of the epidermal growth factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* **67**: 91-98.
- YAO, R., and G. M. COOPER, 1995 Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* **267**: 2003-2006.
- YARDEN, Y., 2005 [Basic principles of signal transduction]. *Onkologie* **28 Suppl 4**: 14-17.
- YARDEN, Y., and M. X. SLIWKOWSKI, 2001 Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 127-137.
- ZENG, X., P. WANG, S. F. WU, J. GAO, Z. Y. LIANG and T. H. LIU, 2007 [Protein overexpression and gene copy number of EGFR and HER2 in colorectal carcinoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* **36**: 447-452.
- ZHANG, Z. F., J. Q. MA and L. ZHANG, 2005 [Expression and clinical significance of MAPK in non-small cell lung cancer.]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **85**: 339-342.
- ZHAO, C., G. XU, X. SHI, J. MA, S. LU and Q. YANG, 2004 Detection of K-ras exon 1 mutations by constant denaturant capillary electrophoresis. *Biomed Chromatogr* **18**: 538-541.

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei allen bedanken, die mir mit Rat und Tat bei dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gebührt Frau Professor Dr. rer. nat. Birgit Luber für ihre große Hilfsbereitschaft als betreuende Hochschullehrerin.

Weiterer herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Axel Walch für das Überlassen des Themas sowie für seine Bereitschaft zur Diskussion und Unterstützung meiner Arbeit.

Bei Herrn Professor Dr. Höfler mochte ich mich für seine freundliche und Unterstützung in dem Forschungszentrum der Pathologie der GSF bedanken.

Frau Uta Jütting und Herrn Herbert Braselmann bin ich sehr verbunden für ihren Beistand bei der Datenanalyse.

Dr. Karin Bink, Ulrike Buchholz, Dr. Sandra Rauser sowie Andreas Voss danke für ihre Geduld und ihre tatkräftige Unterstützung bei der Umsetzung meiner Arbeit.

Ihnen allen gebührt mein herzlichster Dank.

Botho Hilber

München den 23.10.2012