

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des Barrett-Karzinoms

Die Inzidenz des Adenokarzinoms des distalen Ösophagus (Barrett-Karzinom) ist in den letzten Jahren, vor allem in der westlichen Welt, so rapide angestiegen wie bei keinem anderen malignen, viszeralem Tumor (Blot et al., 1991; Pera et al., 1993; Botterweck et al., 2000). Es ist bekannt, dass viele dieser Tumoren aus einer glandulären, intestinalen Metaplasie, der sogenannten Barrett-Mukosa, entstehen und eine Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz durchlaufen (Hamilton und Smith, 1986; siehe 1.3.3, Abb. 4). Dies lässt theoretisch die Möglichkeit einer frühzeitigen Erkennung von Zellveränderungen zu, dennoch werden die meisten Tumoren erst zu einem Zeitpunkt entdeckt, wo bereits ein fortgeschrittenes Stadium vorliegt und die Prognose für die betroffenen Patienten schlecht ist (Hoff et al., 1998). Das Interesse ist deshalb darauf gerichtet, eine effektive Methode zur frühen Erkennung von dysplastischen Zellen zu entwickeln. Ein Ansatzpunkt ist in diesem Zusammenhang die Untersuchung der Tumorangio- und -lymphangiogenese, d. h. der Bildung von neuen Blut- und Lymphgefäßen für und durch den Tumor. Wie man weiß, müssen Tumoren ab einer bestimmten Größe eine ausreichende Angiogenese induzieren, um weiter zu wachsen (Algire et al., 1945; Folkman et al., 1966; Gimbrone et al., 1972 und 1974; Knighton et al., 1977), und es liegt nahe, dass bereits Vorläuferzellen von Tumoren Gefäßwachstumsfaktoren sezernieren. Schon 1971 hat Folkman darauf hingewiesen, dass die Anti-Angiogenese eine effektive Strategie der Tumorbekämpfung darstellen könnte (Folkman, 1971), vor allem, wenn der Therapiebeginn in einem frühen Stadium erfolgt, wo die Initiation der Angiogenese („angiogener Switch“) stattfindet. Mittlerweile wurden viele Faktoren, welche das Gefäßwachstum stimulieren, identifiziert. Im Hinblick auf therapeutische Möglichkeiten ist die Hemmung des zentralen angiogenen Wachstumsfaktors VEGF-A durch einen monoklonalen Antikörper (Bevacizumab) ein erster Ansatzpunkt (Graepler et al., 2005). Bei verschiedenen gastrointestinalen Tumoren mit ausgeprägter Neovaskularisierung (z. B. Plattenepithelkarzinom des Ösophagus) laufen gegenwärtig bereits erste anti-angiogene Therapieversuche und klinische Studien (Graepler et al., 2005). Beim Barrett-Karzinom hingegen sind die genauen Mechanismen, die zum Wachstum und zur Streuung der Tumorzellen führen, noch nicht hinreichend bekannt.

1.2 Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Ösophagus

Die Speiseröhre (lateinisch: Ösophagus) ist ein etwa 25 Zentimeter langer, muskulärer Schlauch, der, im hinteren Mediastinum gelegen, den Oropharynx mit dem Magen verbindet und dem peristaltischen Transport des Speisebreies dient (Lippert, 2000). Der Verschluss der Speiseröhre erfolgt durch eine Einengung des Lumens durch die in Ruhe vorhandene Längsdehnung der schraubenförmigen Muskulatur und durch einen als Schwellkörper fungierenden Venenplexus in der Lamina propria und Tela submucosa („angiomuskulärer Dehnverschluss“). Ein morphologisches Korrelat für einen Sphinkter ist nicht ausgebildet. Neben dem „angiomuskulären Dehnverschluss“ spielt auch die Druckdifferenz zwischen Brust- und Bauchraum eine wichtige Rolle bei der Verhinderung eines Refluxes von Mageninhalt in die Speiseröhre.

Die mikroskopische Betrachtung der Speiseröhre zeigt den typischen Wandaufbau des Magen-Darm-Trakts (Junqueira und Carneiro, 1996). Die Tunica mucosa setzt sich aus einem mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithel (Abb. 1, links), einer Lamina propria mit mukösen Glandulae oesophageae cardiacaе und einer deutlichen Lamina muscularis mucosae zusammen. Die Tela submucosa enthält neben lockerem Bindegewebe, Gefäßen und Nerven auch die mukösen Glandulae oesophageae propriae mit ihren großen zwei- bis mehrreihigen Ausführungsgängen. Die Tunica muscularis besteht aus einer innen liegenden Ringmuskelschicht und einer außen liegenden Längsmuskelschicht. Im oberen Drittel des Ösophagus findet sich vor allem quergestreifte Muskulatur, im mittleren Drittel eine Durchmischung von quergestreifter und glatter Muskulatur und im unteren Drittel ausschließlich glatte Muskulatur. Zwischen den beiden Muskelschichten kommen Ganglienzellen des enterischen Nervensystems (Auerbachscher Plexus = Plexus myentericus) vor. Der Meißnersche Plexus (= Plexus submucosus) ist im Ösophagus nicht ausgebildet.

1.3 Histologisch-pathologische Definitionen

1.3.1 Barrett-Mukosa

Die Barrett-Mukosa (synonym: Barrett-Ösophagus) bezeichnet den Zustand nach Umwandlung des mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithels im distalen Ösophagus (Abb. 1, links) in ein glanduläres Zylinderepithel vom spezialisierten, intestinalen Typ (= intestinale Metaplasie; Abb. 1, rechts; Faller et al., 2003). Meist zeigt sich ein abrupter

Übergang zwischen Plattenepithel und Barrett-Mukosa. Vermutlich gehen die Umwandlungsprozesse von multipotenten Zellen der Basalzellschicht aus (Boch et al., 1997). Das Vorhandensein von Becherzellen ist essentiell für die Diagnose (Weinstein und Ippoliti, 1996). Seinen Namen erhielt die Metaplasie des Ösophagusepithels von Norman Barrett, einem britischen Thoraxchirurgen (Barrett, 1950 und 1957).

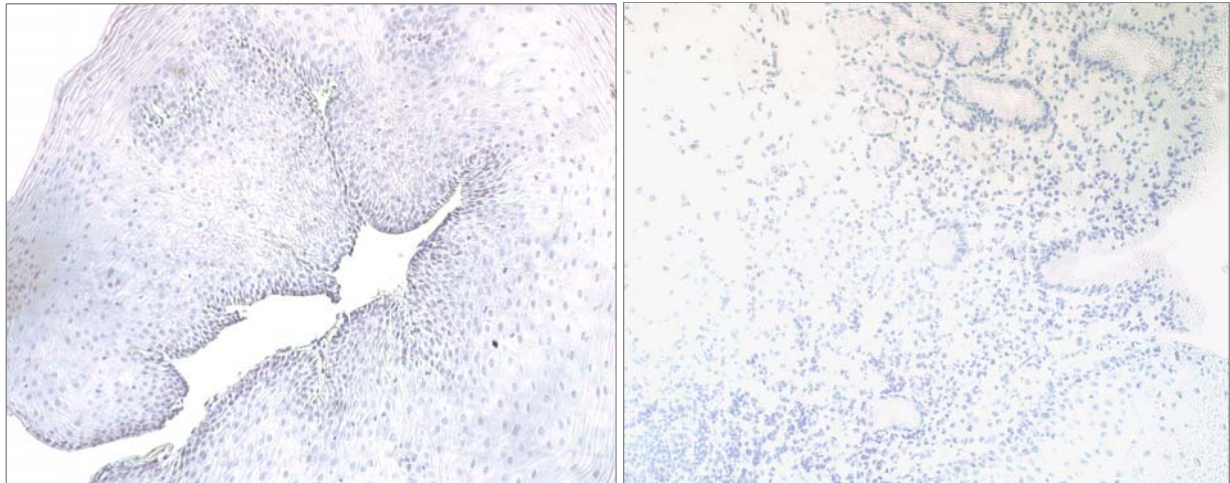


Abb. 1: Links: Mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel des Ösophagus. Rechts: Barrett-Mukosa mit spezialisierten, intestinalen Drüsenschläuchen. Am rechten, unteren Bildrand ist der Übergang zum Plattenepithel zu erkennen (Hämalaun-Färbung, Vergrößerung: 100fach).

Schon vor Barrett beschrieb der Pathologe Tileston das Vorkommen einer magenähnlichen Schleimhaut im distalen Ösophagus bei Patienten mit peptischem Ulkus, d. h. einer Schädigung der Mukosa durch ständigen Kontakt mit Magensaft (Tileston, 1906). Das große histologische Spektrum des Barrett-Ösophagus wurde 1976 von Paull demonstriert, welcher drei verschiedene Typen Säulenepithel im distalen Ösophagus fand: Magenfundus-ähnliches Epithel mit Haupt- und Belegzellen, junktionales Epithel mit mukösen Kardialdrüsen und ein spezialisiertes, hochprismatisches Epithel mit mukösen Drüsen und Becherzellen, welches die größte Prävalenz unter den untersuchten Patienten hatte (Paull et al., 1976). Seit dieser Zeit ist auch bekannt, dass es einen Unterschied gibt zwischen der Barrett-Mukosa und einer Metaplasie der gastroösophagealen Verbindungszone (Cardia Intestinal Metaplasia = CIM), welche mit *Helicobacter pylori*-Infektionen assoziiert ist und ein geringeres Risiko einer Karzinomentwicklung hat (Goldblum et al., 1998). Der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung einer Barrett-

Mukosa ist der gastroösophageale Reflux (Gastroesophageal Reflux Disease = GERD; Allison und Johnstone, 1953; Winters et al., 1987; Eisen et al., 1997), insbesondere wenn die Refluxepisoden länger als 5 Minuten dauern und die GERD-Symptome länger als 5 Jahre bestehen (Campos et al., 2001). Beim Vorliegen einer Barrett-Mukosa besteht ein deutlich erhöhtes Risiko, ein Adenokarzinom des distalen Ösophagus zu entwickeln (Naef et al., 1975; Stillman et al., 1975; Hoff et al., 1998).

1.3.2 Barrett-Dysplasie

Die Dysplasie in der Barrett-Mukosa (Barrett-Dysplasie; Abb. 2) ist gekennzeichnet durch intraepitheliale neoplastische Prozesse und ist der verlässlichste Marker für das Entstehen eines invasiven Adenokarzinoms (Saubier et al., 1985; Hamilton und Smith, 1986; Sampliner, 1998; Öberg et al., 2005). Man unterscheidet die geringgradige Dysplasie (Low Grade Dysplasia = LGD) von der hochgradigen Dysplasie (High Grade Dysplasia = HGD). Die LGD ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von spezialisierten, intestinalen Zylinderepithelzellen (Barrett-Mukosa-Zellen) mit vergrößerten, hyperchromatischen Kernen bei erhaltener Zellpolarität. Oft besteht ein abrupter Übergang zwischen dysplastischen und nicht-dysplastischen Zellen (Faller et al., 2003; Müller et al., 2004). In der HGD sind die Drüsenschläuche stärker verzweigt als in der LGD. Die Zellpolarität ist meist aufgehoben und es sind vermehrt Mitosen und prominente Nucleoli zu erkennen. Die Zellkerne erscheinen stärker hyperchromatisch und pleomorph als in der LGD. Auch zeigt sich ein Verlust von Becherzellen (Faller et al., 2003; Müller et al., 2004). In der Dysplasie findet sich keine Invasion der Lamina propria.

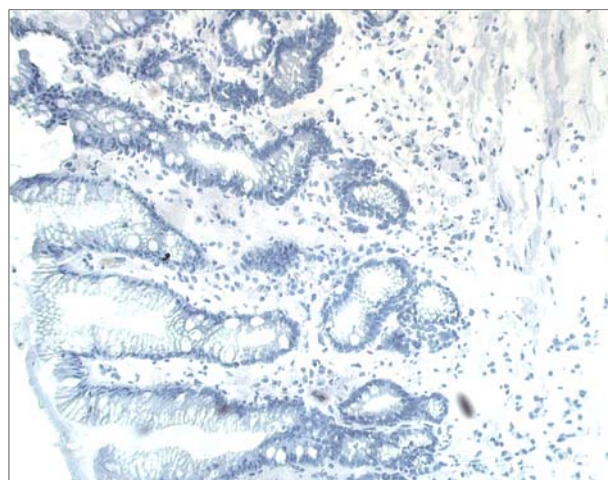


Abb. 2: Barrett-Dysplasie. Zu erkennen sind verzweigte Drüsenschläuche mit hyperchromatischen, vergrößerten Zellkernen, zum Teil mit Verlust der Zellpolarität. Es zeigt sich keine Invasion der Lamina propria (Hämalaun-Färbung, Vergrößerung: 100fach).

1.3.3 Barrett-Karzinom

95 % aller Ösophaguskarzinome sind Plattenepithelkarzinome (Abb. 3, rechts). In etwa 5 % findet man Adenokarzinome (Abb. 3, links), deren Inzidenz in den letzten Jahren rapide angestiegen ist (siehe 1.1). Das Adenokarzinom des Ösophagus unterscheidet sich histologisch von der HGD durch extrem verzweigte, stark in der Größe variierende Drüsen sowie durch eine Infiltration der Muscularis mucosae und/oder durch eine Invasion in Blut- oder Lymphgefäße (Faller et al., 2003). Es ist meist keine klare Grenze zwischen Mukosa und Submukosa zu ziehen. Als Diagnosekriterium gilt ein Einbruch von Tumorzellen in die Lamina propria (Reid et al., 1988). Die Tumoren können gut (Grading 1 = G 1), mäßig (G 2) oder schlecht (G 3) differenziert sein.

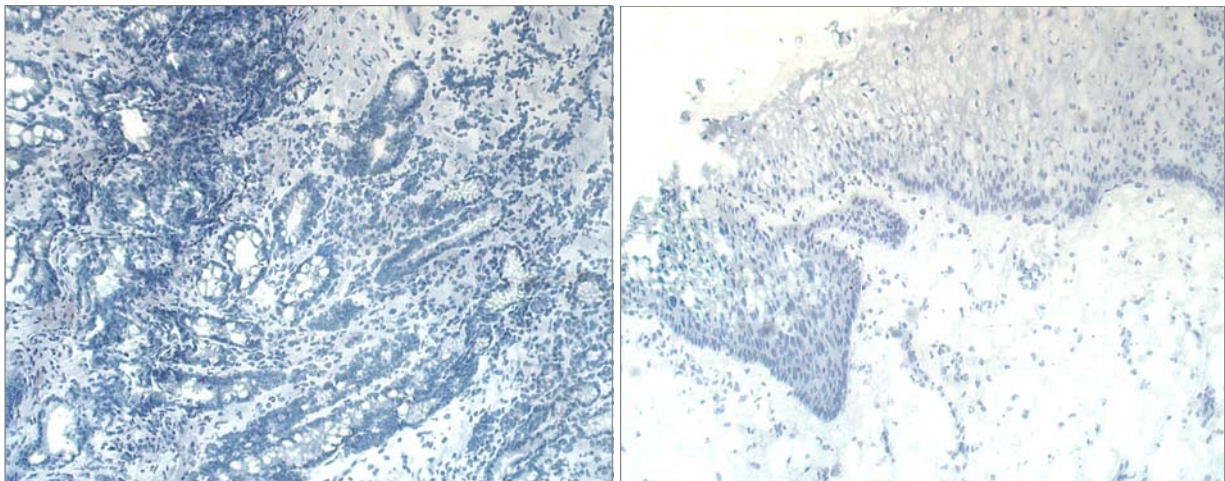


Abb. 3: Links: Barrett-Adenokarzinom des Ösophagus. Zu erkennen ist eine Infiltration der Lamina propria. Der Tumor selbst erscheint mäßig differenziert (Differenzierungsgrad G 2; Hämalaun-Färbung, Vergrößerung: 100fach). Rechts: Plattenepithelkarzinom mit beginnender Infiltration der Lamina propria. Die histologischen Tumordiagnosekriterien (Zellatypen) sind erfüllt (Hämalaun-Färbung, Vergrößerung: 100fach).

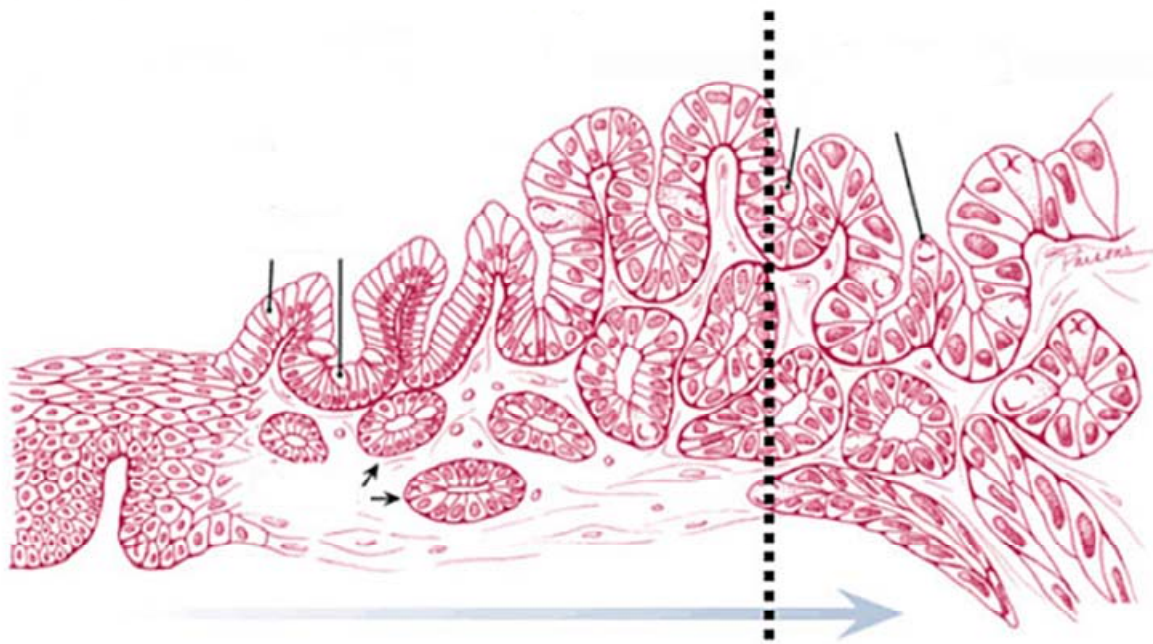


Abb. 4: Stadien der Barrett-Karzinogenese (Koppert et al., 2005). Am linken Bildrand sieht man den Übergang zwischen Plattenepithel und Barrett-Mukosa (lange Pfeile: Becherzellen; kurze Pfeile: Drüsenanschnitte in der Lamina propria). Links der gestrichelten Linie erkennt man Barrett-Epithelzellen mit vergrößerten Zellkernen und zum Teil aufgehobener Zellpolarität sowie reduzierter Zahl an Becherzellen (Barrett-Dyplasie). Rechts gestrichelten Linie zeigt sich das histologische Bild eines Barrett-Karzinoms mit verzweigten, unterschiedlich großen Drüsenschläuchen, Einbruch in die Submukosa sowie Mitosen in Oberflächenepithelzellen (lange Pfeile).

1.4 Bildung und Wachstum von Blut- und Lymphgefäßen

1.4.1 Physiologische und pathologische Angiogenese

Wie schon unter 1.1 angemerkt, ist es für die meisten Tumoren ab einer bestimmten Größe unerlässlich, Zugang zu einer eigenen Blutversorgung zu erlangen. Die hierbei ablaufenden Mechanismen beruhen auf physiologischen Vorgängen, wie sie von der embryologischen Entwicklung des Organismus oder der Wundheilung bekannt sind. Wenn man von Blutgefäßbildung und -wachstum spricht, muss man die Begriffe Vaskulogenese und Angiogenese definieren.

Vaskulogenese bezeichnet die Entstehung primärer Blutgefäße aus sich differenzierenden Vorläuferzellen (Risau et al., 1988). Sie findet vor allem in der Embryonalentwicklung statt, wo aus Hämangioblasten des Dottersacks Angioblasten (Vorläufer der Endo-

thelzellen) hervorgehen (Sabin, 1920; Mikkola und Orkin, 2002), welche primitive Kapillarnetze formen. Die Vaskulogenese vollzieht sich aber auch beim Adulten durch angioblastische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Reyes et al., 2002), beispielsweise im Rahmen der Wundheilung, ischämischer Muskelverletzungen oder während des weiblichen Zyklus im Corpus luteum.

Angiogenese hingegen bezeichnet die Neubildung von Blutgefäßen durch Sprossung von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen (Folkman, 1984; Risau, 1997). Sie findet genau wie die Vaskulogenese zum einen beim Embryo, wo sie der Sicherung der Vaskularisierung der entstehenden Gewebe und Organe dient, und zum anderen beim Adulten statt. Hier unterscheidet man das physiologische vom pathologischen Gefäßwachstum. Ersteres findet z. B. während der Wundheilung oder des weiblichen Zyklus statt (Findlay, 1986). Die einzelnen Phasen der physiologischen Angiogenese sind gut erforscht und bekannt (Gimbrone et al., 1974; Ausprunk und Folkman, 1977; Folkman, 1984; Meyer et al., 1997; Paku und Paweletz, 1991; Hirschi und D'Amore, 1996). Eine pathologische Angiogenese zeigt sich meist als Antwort auf einen physiologischen Stimulus wie z. B. Hypoxie und wird bei Autoimmunerkrankungen, bei rheumatischen Erkrankungen, bei Hauterkrankungen (Psoriasis, Kaposi-Sarkom; Detmar et al., 1994), bei der Retinopathie, beim Asthma und bei der Tumorentwicklung (Folkman, 1971 und 1989) beobachtet. Grundlage ist stets eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese zugunsten der Stimulatoren.

Folkman entwickelte 1971 eine zentrale Hypothese zur Tumorangiogenese, nach der sich Tumoren zunächst in einem Stadium der Avaskularität befinden, wo Ernährung und Versorgung mit Sauerstoff ausschließlich durch passive Diffusion erfolgen (Folkman, 1971). Der Tumor kann so maximal eine Größe von ein bis zwei Millimetern erreichen („Tumor Dormancy State“). Um eine weitere Proliferation zu ermöglichen, muss die Bildung von neuen Blutgefäßen induziert werden. Von Tumorzellen ausgehend werden Hypoxie-getriggert Angiogenesefaktoren (z. B. VEGF-A) sezerniert. Gleichzeitig wird in den Endothelzellen von Blutgefäßen in der Nähe des Tumors die Expression von Rezeptoren für die Gefäßwachstumsfaktoren (z. B. VEGFR-2 als Hauptrezeptor für VEGF-A) hochreguliert. VEGF-A steigert unter anderem die Gefäßpermeabilität (Connolly et al., 1989), wodurch Plasmabestandteile und Fibrinogen austreten können. Es kommt zur Ausbildung eines extravaskulären Fibringels, welches eine ideale Matrix für einwandernde Endothelzellen darstellt. VEGF-A kann selbst in dieser „provisorischen Matrix“

akkumulieren und eine Apoptose der migrierenden Endothelzellen unterbinden (Petersson et al., 2000). Neue Gefäße sprossen aus und infiltrieren den Tumor, womit der Anschluß an das Gefäßsystem vollzogen ist.

Eine weitere Möglichkeit der Tumorneovaskularisierung ist die, dass sich Endothelzellvorläufer aus dem Knochenmark (Endothelial Progenitor Cells = EPC), welche bei Erwachsenen nachgewiesenermaßen auch im peripheren Blut zirkulieren, in der Umgebung des Tumors als Reaktion auf lokale Stimuli zu Endothelzellen differenzieren und im Sinne einer postnatalen Vaskulogenese Kapillarnetze formen (Asahara et al., 1999). Andere Autoren definieren eine „vaskuläre Mimikry“. Hierbei ahmen Tumorzellen (hoch aggressiver und metastasierender Melanome) die Morphologie und den Phänotyp von Endothelzellen nach, exprimieren eine Vielzahl an Gefäßmarkern wie z. B. VEGF-Rezeptoren und formen in Abwesenheit von Endothelzellen und Fibroblasten Gefäßkanäle mit einer Basalmembran (Folberg et al., 2000; McDonald et al., 2000). Dieser Mechanismus ist Angiogenese-unabhängig.

1.4.2 Angiogenese und chronische Entzündung

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass bei verschiedenen chronisch-entzündlichen Erkrankungen (z. B. Psoriasis, rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis, Morbus Crohn, Diabetes) eine enge Verbindung zwischen den Prozessen Entzündung und Angiogenese besteht (Costa et al., 2007). Hypoxie ist ein zentraler, gemeinsamer Stimulus. Hierdurch wird zum einen vermehrt Stickstoffmonoxid produziert, was zu Vasodilatation und Steigerung der Gefäßpermeabilität mit Austritt von Immunzellen führt. Zum anderen werden Hypoxia-Inducible Factors (= HIF) hochreguliert, was eine Steigerung der Gentranskription, z. B. für VEGF-A, bewirkt (Naldini und Carraro, 2005). Die Angiogenese wird darüber hinaus durch direkt von Immunzellen sezernierte Gefäßwachstumsfaktoren und Proteasen sowie durch angiogene Faktoren, welche von Fibroblasten und Endothelzellen nach Stimulation durch proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden, aktiviert (Benelli et al., 2006). Auf der anderen Seite wird durch die Angiogenese der Entzündungsprozess aufrechterhalten, da durch die Zunahme an Gefäßen ausreichend Sauerstoff und Nährstoffe zur Verfügung gestellt werden. Des Weiteren wird über eine gesteigerte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (z. B. Selektine, Integrine) die Chemotaxis von Entzündungszellen gefördert (Ley, 2001). Auch bei der gastroösophagealen Refluxkrankheit (Gastroesophageal Reflux Disease = GERD) zeigen sich, insbesondere beim Vorliegen von endoskopisch sichtbaren Erosionen (Erosive Reflux Disease =

ERD), oft entzündliche Schleimhautinfiltrate. Ein vermehrtes Vorkommen von Gefäßen und Gefäßwachstumsfaktoren wurde in zahlreichen Studien bestätigt (Auvinen et al., 2002; Möbius et al., 2003; Lord et al., 2003; Brundler et al., 2006).

Durch die Generierung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies im Rahmen einer Entzündung können Gene, welche Zellzyklus und Apoptose kontrollieren, geschädigt werden. Dies fördert die Entwicklung bösartiger Tumoren (Christen et al., 1999). Tatsächlich konnten verschiedene klinische Studien demonstrieren, dass Patienten mit einer chronischen Entzündung ein erhöhtes Risiko für eine Malignomentwicklung haben (Balkwill et al., 2005). So haben auch Patienten mit einer Barrett-Mukosa ein erhöhtes Risiko, ein Adenokarzinom des distalen Ösophagus zu entwickeln (Naef et al., 1975; Stillman et al., 1975; Hoff et al., 1998). Bei der Untersuchung verschiedener Tumoren im Rahmen von Studien zeigte sich ein vermehrtes Vorkommen von Immunzellen und eine Korrelation mit einer gesteigerten Angiogenese (Balkwill et al., 2005). Bei vielen Tumoren wurde zudem verstärkt Cyclooxygenase-2 (= COX-2) exprimiert, was eine Hochregulation sowohl von Gefäßwachstumsfaktoren als auch von proinflammatorischen Zytokinen bewirkte (Tsujii et al., 1998). All dies weist auf eine Verbindung zwischen chronischer Entzündung und Angiogenese in Malignomen hin.

1.4.3 Physiologische und pathologische Lymphangiogenese

Das Lymphsystem ist ein blind beginnendes, äußerst komplexes Netzwerk von Kapillaren, kleineren und größeren Lymphgefäßen sowie Lymphknoten. Funktion dieses Netzwerkes ist die Kontrolle der Mikrozirkulation in den Geweben und der Transport von Gewebeflüssigkeiten, extravasalen Plasmaproteinen und Zellen zurück in den Blutkreislauf (Drinker und Yoffey, 1941; Rusznyak et al., 1960; Kubik und Manestar, 1985). Ebenso nimmt der Transport von Immunzellen und körperfremden Antigenen von den Geweben zu den peripheren Lymphknoten einen großen Teil der Funktion des Lymphsystems ein (Olszewski, 1985). Lymphatische Gefäße sind gegenüber Blutgefäßen durch eine fehlende oder inkomplette Basalmembran gekennzeichnet (Casley-Smith, 1961). Durch die relativ lockeren Zellverbindungen und die diskontinuierliche Basalmembran wird (bei kleineren Lymphgefäßen) die Passage von Makromolekülen, Chylomikronen, Pathogenen und migrierenden Zellen gestattet (Drinker und Yoffey, 1941; Rusznyak et al., 1960; Kubik und Manestar, 1985). Mittlerweile wurden einige Markermoleküle identifiziert, welche spezifisch für lymphatische Endothelien sind, so z. B. Podoplanin, Prox-1, LYVE-1, VEGFR-3 und Desmoplakin (Al-Rawi et al., 2005).

Lymphangiogenese bezeichnet das Wachstum und die Formierung neuer Lymphgefäße. Sie kommt im Rahmen der embryologischen Entwicklung von Geweben und bei pathologischen Prozessen wie z. B. Wundheilung, Entzündungen, Lymphödemen und Tumorentwicklung vor, wo sie für die Streuung von malignen Zellen von Bedeutung ist (Al-Rawi et al., 2005). Die genauen Vorgänge der Lymphangiogenese sind noch nicht gut bekannt. Man weiß, dass einige Tumoren (z. B. Mammakarzinome) in der Lage sind, VEGF-C und VEGF-D zu sezernieren, welche wiederum ihren Rezeptor (VEGFR-3) auf lymphatischen Endothelien aktivieren und so Bildung und Wachstum neuer Lymphgefäße erwirken (Valtola et al., 1999). Da noch keine lymphspezifische Endothelzelllinie entdeckt wurde, ist es insbesondere schwierig, zwischen unreifen Blut- und Lymphkapillaren zu diskriminieren und die Lymphangiogenese im Detail zu verstehen.

1.5 Angiogenese- und Lymphangiogenesemarker

1.5.1 Gefäßwachstumsfaktoren VEGF-A, -C und -D

Die Entdeckung der verschiedenen Mitglieder der VEGF-Familie und ihrer Rezeptoren hat dazu geführt, dass immer mehr über das menschliche Gefäßsystem – sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Bedingungen – in Erfahrung gebracht wurde und dass sich daraus unter anderem neue, bedeutende Ansatzpunkte für die Therapie Angiogenese-abhängiger Erkrankungen ergaben (siehe 1.1).

VEGF-A, auch als VPF (Vascular Permeability Factor) bezeichnet, wurde 1989 von Connolly und Ferrara entdeckt (Connolly et al., 1989; Ferrara et al., 1989). Meist werden Homodimere mit einer Größe von 45 kD gebildet (Ferrara et al., 1989; Muller et al., 1997). Es können aber auch Heterodimere (mit PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D oder VEGF-E) gebildet werden. VEGF-A wird unter anderem von glatten Muskelzellen der Gefäße (Tischer et al., 1991), aktivierten T-Zellen, Makrophagen, Epi- und Endothelzellen (Berse et al., 1992), aber auch von Tumorzellen und Tumor-assoziierten Stromazellen (Fukumura et al., 1998) sezerniert. VEGF-A bindet an VEGFR-1 und VEGFR-2 (de Vries et al., 1992; Quinn et al., 1993). Die biologischen Hauptaktivitäten von VEGF-A sind zum einen die Kapazität, die Endothelzellproliferation zu stimulieren (Ferrara et al., 1989) und zum anderen die Fähigkeit, die Gefäßpermeabilität zu steigern (durch interzelluläre Lücken, Vakuolen und Fenestrationsen; Connolly et al., 1989). VEGF-A induziert zudem die Expression von anti-apoptotischen Proteinen in Endothelzellen (Gerber et al., 1998), die Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark, die Monozyten-Chemoattraktion und Rekrutierung von Entzündungszellen, die

Osteoblasten-vermittelte Knochenbildung, eine neuronale Protektion (Storkebaum et al., 2004) und die Expression der Proteasen, die im Rahmen der Angiogenese die Basalmembran und perizelluläre Matrix abbauen (Pepper et al., 1991; Unemori et al., 1992; Mandriota et al., 1995). Neuere Studien zeigen, dass VEGF-A auch die Lymphangiogenese induzieren kann (Nagy et al., 2002). Bislang war davon ausgegangen worden, dass dies vor allem durch VEGF-C und VEGF-D vermittelt wird. In der Embryonalentwicklung nimmt VEGF-A eine zentrale Rolle ein (Carmeliet et al., 1996).

VEGF-C, ein weiteres Mitglied der VEGF/PDGF- (Platelet Derived Growth Factor-) Superagen-Familie, ist ein 20 bis 21 kD-Protein und wurde 1996 identifiziert und aufgereinigt (Joukov et al., 1996). VEGF-D, ebenfalls ein 20 bis 21 kD-Protein, wurde 1997 als neues Mitglied der VEGF-Familie entdeckt (Achen et al., 1998; Yamada et al., 1997). VEGF-C und VEGF-D können sowohl Homo- als auch Heterodimere (mit VEGF-A) ausbilden, wobei bevorzugt nicht-kovalente Homodimere gebildet werden (Joukov et al., 1997; Achen et al., 1998). Beide Gefäßwachstumsfaktoren haben eine hohe Affinität zu VEGFR-2 und VEGFR-3 (Joukov et al., 1997; Achen et al., 1998). In vitro stimulieren VEGF-C und VEGF-D die Migration und Mitogenese von kultivierten Endothelzellen (Joukov et al., 1996; Achen et al., 1998). Über seine Interaktion mit VEGFR-2 induziert VEGF-C die Angiogenese und eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, während über die Interaktion mit VEGFR-3 die Lymphangiogenese stimuliert wird. Es ist gezeigt worden, dass dies in Tumoren zur Dissemination maligner Zellen führen kann, mit Formierung von Lymphknotenmetastasen (Mandriota et al., 2001). VEGF-D induziert ebenfalls die Bildung von Lymphgefäßen in Tumoren und bereitet den Weg für die Metastasierung der Tumorzellen (Stacker et al., 2001). VEGF-D kann aber auch die Tumorangiogenese via VEGFR-2 induzieren (Stacker et al., 2001). In der Embryonalentwicklung ist VEGF-C bei den initialen Schritten der Lymphgefäßbildung von Bedeutung (Karkkainen et al., 2004). VEGF-D scheint dagegen in der Embryonalentwicklung keine Hauptrolle bei der Entwicklung des Lymphgefäßsystems zu spielen (Baldwin et al., 2005).

1.5.2 VEGF-Rezeptoren 1, 2 und 3

VEGFR-1 (Flt-1 = Fms-Like Tyrosine Kinase 1) war das erste Mitglied der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, das als VEGF-Rezeptor identifiziert wurde (de Vries et al., 1992). VEGFR-1 ist ein 180 kD-Protein mit hoher Affinität zu VEGF-A, VEGF-B und PlGF (de Vries et al., 1992; Park et al., 1994; Olofsson et al., 1998). Es bindet VEGF-A mit zehnfach höherer Affinität als VEGFR-2 (de Vries et al., 1992; Terman et al., 1992). VEGFR-

1 wird auf der Zelloberfläche der meisten Blutgefäßendothelzellen sowie in Makrophagen und Monozyten (Sawano et al., 2001), hämatopoetischen Stammzellen (Hattori et al., 2002), Osteoblasten, Perizyten, glatten Muskelzellen von Gefäßen (Ishida et al., 2001) und kolorektalen Tumorepithelzellen (Fan et al., 2005) exprimiert. Die biologische Aktivität von VEGFR-1 liegt in der Beteiligung an der Endothelzellmigration (Rousseau et al., 1997; Kanno et al., 2000), der Migration von Monozyten/Makrophagen (Sawano et al., 2001), der Rekrutierung von hämatopoetischen Stammzellen (Hattori et al., 2002) und der Freisetzung gewebespezifischer Wachstumsfaktoren. VEGFR-1 vermittelt keine mitogenen Signale in Endothelzellen (Waltenberger et al., 1994). Während der frühen Embryonalentwicklung ist er ein Inhibitor der VEGF-A-Wirkung (durch Sequestrierung von VEGF-A und Verhinderung der Interaktion mit VEGFR-2; Fong et al., 1999).

VEGFR-2, auch bekannt als Flk-1 (Fetal Liver Kinase 1) bzw. KDR (Kinase Domain Region), ist ein 200 bis 230 kD-Protein mit hoher Affinität zu VEGF-A (Terman et al., 1992; Quinn et al., 1993), VEGF-E und den prozessierten Formen von VEGF-C und VEGF-D (Joukov et al., 1996; Achen et al., 1998). VEGFR-2 wird in Blut- und Lymphgefäßendothelien sowie in glatten Muskelzellen von Gefäßen (Ishida et al., 2001), neuronalen Zellen, Osteoblasten, retinalen Progenitorzellen (Yang und Cepko, 1996), Megakaryozyten, hämatopoetischen Stammzellen (Katoh et al., 1995) und einigen Tumorepithelzellen exprimiert (Meister et al., 1999; von Marschall et al., 2000; Price et al., 2001; Tian et al., 2001; Zhukova et al., 2003). Die Expression von VEGFR-2 wird durch VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D hochreguliert. Auf der anderen Seite führt die Sequestrierung von VEGF-A zur Herunterregulation von VEGFR-2 und zur Apoptose von (Kapillar-) Endothelzellen (Baffert et al., 2004). In adulten Blutgefäßendothelzellen ist die VEGFR-2-Expression weitgehend herunterreguliert; sie wird aber im Endothel neugebildeter (angiogener) Blutgefäße hochreguliert (Millauer et al., 1994). VEGFR-2 ist der Hauptrezeptor für die mitogenen, angiogenen, permeabilitätssteigernden und migrationsfördernden (Gille et al., 2001) sowie für die anti-apoptotischen (Katoh et al., 1995) Effekte von VEGF-A. Neuere Studien zeigen, dass VEGFR-2 (nach Stimulation durch VEGF-A) auch die Lymphangiogenese induzieren kann (Nagy et al., 2002).

VEGFR-3 (Flt-4 = Fms-Like Tyrosine Kinase 4) ist ein 195 kD Hochaffinitätsrezeptor für VEGF-C und VEGF-D (Joukov et al., 1996; Achen et al., 1998), nicht aber für VEGF-A (Pajusola et al., 1994). Während der Embryonalentwicklung findet man VEGFR-3 auf allen Endothelzellen, beim Adulten nur noch auf lymphatischen Endothelzellen, wo er

Wachstum, Migration und Aufrechterhaltung der Lymphgefäße reguliert (Veikkola et al., 2003; Mäkinen et al., 2001). VEGFR-3 kann in pathologischen Bedingungen wie Tumoren auch auf Blutgefäßendothelzellen vorkommen (Valtola et al., 1999).

Tab. 1: Übersicht über Vorkommen, Bindungsverhalten und biologische Aktivitäten der in dieser Arbeit untersuchten Gefäßwachstumsfaktoren und Rezeptoren.

VEGF-A	Vorkommen: glatte Muskelzellen von Gefäßen, aktivierte T-Zellen, Makrophagen, Epi- und Endothelzellen, Tumorzellen, Tumor-assoziierte Stromazellen
	Bindung an: VEGFR-1, VEGFR-2
	Biologische Aktivitäten: Stimulation der Endothelzellproliferation, Steigerung der Gefäßpermeabilität, Expression von anti-apoptotischen Proteinen in Endothelzellen, Expression von Proteasen zum Abbau von Basalmembran und perizellulärer Matrix, Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark, Monozyten-Chemoattraktion; Interaktion mit VEGFR-2: Stimulation von Lymphangiogenese möglich
VEGF-C	Vorkommen: Epi- und Endothelzellen, glatte Muskelzellen von Gefäßen, Tumorzellen, Tumor-assoziierte Stromazellen
	Bindung an: VEGFR-2, VEGFR-3
	Biologische Aktivitäten: Interaktion mit VEGFR-2: Induktion von Angiogenese (Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Endothelzellmigration); Interaktion mit VEGFR-3: Induktion von Lymphangiogenese
VEGF-D	Vorkommen: Epi- und Endothelzellen, glatte Muskelzellen von Gefäßen, Tumorzellen, Tumor-assoziierte Stromazellen
	Bindung an: VEGFR-2, VEGFR-3
	Biologische Aktivitäten: Interaktion mit VEGFR-3: Induktion von Lymphangiogenese (Mitogenese und Migration von Lymphgefäßendothelzellen); Interaktion mit VEGFR-2: Induktion von Tumorangiogenese

VEGFR-1	Vorkommen: Blutgefäßendothelzellen, Makrophagen, Monozyten, hämatopoetische Stammzellen, Osteoblasten, Perizyten, glatte Muskelzellen von Gefäßen, Tumorepithelzellen
	Bindung von: VEGF-A, VEGF-B, PlGF
	Biologische Aktivitäten: Endothelzellmigration, Migration von Monozyten/Makrophagen, Rekrutierung von hämatopoetischen Stammzellen, Freisetzung gewebespezifischer Wachstumsfaktoren
VEGFR-2	Vorkommen: Blut- und Lymphgefäßendothelzellen, glatte Muskelzellen von Gefäßen, neuronale Zellen, Osteoblasten, retinale Progenitorzellen, Megakaryozyten, hämatopoetische Stammzellen, Tumorepithelzellen
	Bindung von: VEGF-A, VEGF-E, prozessierte Formen von VEGF-C und VEGF-D
	Biologische Aktivitäten: Hauptrezeptor für die mitogenen, angiogenen, permeabilitätssteigernden und migrationsfördernden Effekte von VEGF-A; nach Stimulation durch VEGF-A: Induktion von Lymphangiogenese möglich
VEGFR-3	Vorkommen: lymphatische Endothelzellen
	Bindung von: VEGF-C, VEGF-D
	Biologische Aktivitäten: Regulation von Wachstum, Migration und Aufrechterhaltung von Lymphgefäßen

1.5.3 Endothelzellmarker LYVE-1 und CD31

LYVE-1 (Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor) ist ein lymphgefäßspezifischer Marker und ein Rezeptor für Hyaluronsäure (Banerji et al., 1999). Hyaluronsäure ist ein hochkomplexes Kohlenhydratmolekül (Glykosaminoglykan) der extrazellulären Matrix (Knudson, 1993). Es wird unter anderem in der Plasmamembran von Fibroblasten synthetisiert (Prehm, 1989) und spielt bei der physiologischen Wasser- und Gewebemöostase, bei der Zellmigration und -differenzierung (Laurent und Fraser, 1992), nach Gewebeverletzungen und bei der Tumormetastasierung eine Rolle (Knudson et

al., 1989). LYVE-1 ist der Hauptrezeptor für Hyaluronsäure auf der Lymphgefäßwand und er fehlt vollständig auf adulten Blutgefäßen (Banerji et al., 1999). LYVE-1 ist ein integrales, aus 322 Aminosäureresten bestehendes Membranglykoprotein (Banerji et al., 1999), dessen Expression sich vor allem in lymphatischen Endothelzellen in Haut, Magen und Darm, aber auch in sinusoidalen Endothelzellen in der Milz und verschiedenen epithelialen Zellen zeigt (Banerji et al., 1999). Dieses Expressionsmuster und die Untersuchungen von Banerji et al. belegen, dass LYVE-1 am Transport von Hyaluronsäure vom Gewebe in das Lumen von Lymphgefäßen beteiligt ist und außerdem durch die Bindung von Hyaluronsäure an die Wand von Lymphgefäßen eine Transmigration von CD44-positiven Zellen unterstützt (Banerji et al., 1999; Jackson et al., 2001). Neuere Studien zeigen, dass LYVE-1 ein wertvoller und hilfreicher Marker sein könnte, um Lymphangiogeneseprozesse in Tumoren zu erkennen und Patientengruppen mit hohem Risiko für Lymphknotenmetastasen auszumachen (Dadras et al., 2003; Goydos und Gorski, 2003; Maula et al., 2003).

CD31, auch bekannt als PECAM-1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) bzw. EndoCAM (Endothelial Cell Adhesion Molecule), ist ein Typ 1 transmembranes Protein, welches ein Molekulargewicht von ungefähr 135 kD hat und zur Immunglobulin-Superfamilie gehört (Albelda et al., 1990; Newman et al., 1990). CD31 ist vor allem ein Marker von Blutgefäßendothelzellen und endothelialen Zell-Zell-Kontakten in einer Vielzahl von Geweben (Albelda et al., 1990; Muller et al., 1989). Es spielt eine große Rolle bei adhäsiven Verbindungen zwischen benachbarten Endothelzellen und zwischen Leukozyten und Endothelzellen (Albelda et al., 1990 und 1991). CD31 findet sich auch in benignen und malignen Gefäßläsionen auf Endothelzellen (DeYoung et al., 1995). CD31-Interaktionen sind z. B. bei Entzündungsprozessen im Rahmen der Leukozyten-Diapedese durch das Endothel oder bei der Migration von Monozyten durch die subendotheliale Basallamina von Bedeutung. Weil CD31 ein sehr spezifischer Marker für vaskuläre Endothelzellen ist, können CD31-Antikörper benutzt werden, um Blutgefäße und Angiogeneseprozesse zu markieren (Parums et al., 1990).

1.6 Aktueller Stand der Forschung und Fragestellung

Vor dem Hintergrund der rapid steigenden Inzidenz des ösophagealen Barrett-Adenokarzinoms, der sehr schlechten Prognose für die betroffenen Patienten und der noch nicht gut erforschten Mechanismen, die zu Progression und Metastasierung führen (siehe 1.1), wird seit einigen Jahren gezielt untersucht, welche Rolle die Bildung von

Blut- und Lymphgefäßen für metaplastisch, dysplastisch und neoplastisch veränderte Ösophagusepithelzellen spielt, welche Gefäßwachstumsfaktoren und Rezeptoren an diesen Prozessen beteiligt sind und welche Ansätze sich für Screening und Therapie des Barrett-Karzinoms bzw. seiner Vorstufen ergeben. Es wurden bereits einige Arbeiten publiziert, die die Rolle von Angiogenese und Lymphangiogenese in der Barrett-Karzinogenese untersucht haben (Brundler et al., 2006; Möbius et al., 2004; Möbius et al., 2003; Lord et al., 2003; Auvinen et al., 2002; Couvelard et al., 2000; Torres et al.; 1999). Die bisher umfangreichste Arbeit ist die von Auvinen und Mitarbeitern, welche je 15 Fälle der Barrett-Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz immunhistochemisch mit Antikörpern gegen CD31 und PAL-E (undefiniertes, endotheliales Antigen kleiner Blutgefäße) sowie gegen VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 und α -SMA (α -Smooth Muscle Cell Actin) färbten (Auvinen et al., 2002). Die Untersuchungen zeigten: **1.)** die Zahl der CD31-positiven Gefäße stieg in der Barrett-Mukosa deutlich an, **2.)** diese Gefäße waren unreif und noch in der Bildung, erkennbar an der veränderten Morphologie und fehlenden Anfärbung mit α -SMA-Antikörpern, **3.)** VEGFR-2 markierte die Endothelzellen dieser neu gebildeten Blutgefäße, **4.)** VEGF-A wurde in Zylinderepithelzellen und Becherzellen der Barrett-Mukosa verstärkt exprimiert, was vermutlich die Aufrechterhaltung der unreifen Gefäße unterstützte, **5.)** die VEGF-C-Expression stieg in der Barrett-Mukosa, Barrett-Dysplasie und im Barrett-Karzinom kontinuierlich an, **6.)** die Expression von VEGFR-3 in Gefäßendothelien wurde in der Barrett-Dysplasie und im Barrett-Karzinom hochreguliert. Die anderen publizierten Arbeiten untersuchten ebenfalls die verschiedenen Stadien der Barrett-Karzinogenese und führten unter anderem immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen LYVE-1, CD34, CD31, VEGF-A, bFGF und α -SMA durch. Die wichtigsten Beobachtungen aus diesen Arbeiten waren, dass **1.)** die Zahl der Lymphgefäße im Barrett-Karzinom geringer war als in den anderen Stadien (Brundler et al., 2006), **2.)** die Microvessel Density (= MVD) in der Barrett-Mukosa, Barrett-Dysplasie und im Barrett-Karzinom kontinuierlich anstieg (Brundler et al., 2006), **3.)** die mittlere VEGF-A-Expression in der Barrett-Mukosa, Barrett-Dysplasie und im Barrett-Karzinom kontinuierlich anstieg (Möbius et al., 2003), **4.)** der angiogene Switch (Umschaltung zwischen avaskulärem und vaskulärem Tumorwachstum), vermittelt durch die Wirkung von VEGF-A, als frühzeitiges Ereignis in der Barrett-Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz auftrat (Möbius et al., 2003; Lord et al., 2003)), **5.)** die Expression von VEGF-A mit einer hohen Vaskularisierung in Tumoren korreliert war (Couvelard et al., 2000) und **6.)** Tumoren mit hohem Neovaskularisationskoeffizient

(CD31-positive Gefäße/ α -SMA-positive Gefäße) keine signifikant höhere VEGF-A-Expression zeigten (Möbius et al., 2004). Mit Ausnahme der Studien von Auvinen et al. und Brundler et al. wurden bei den angeführten Arbeiten ausschließlich MVD und Angiogenese im Verlauf der Barrett-Karzinogenese untersucht, wobei vor allem die Expression und zelluläre Verteilung von VEGF-A und CD31 bzw. CD34 betrachtet wurde. Die Expression von VEGF-C und von den drei VEGF-Rezeptoren wurde nur von Auvinen et al. untersucht, welche jedoch keine immunhistochemischen Färbungen mit einem lymphendothelspezifischen Marker wie z. B. LYVE-1 durchführten. Die Expression von VEGF-D in der Barrett-Karzinogenese ist bislang noch nicht untersucht worden. Die Ergebnisse der Arbeiten von Couvelard et al. (2000) und Möbius et al. (2004) sind zudem kontrovers (siehe **5.** und **6.**). Um diese Ergebnisse kritisch beurteilen zu können, insbesondere die Hypothese der Induktion von Angiogeneseprozessen im Stadium der Barrett-Mukosa (Möbius et al., 2003; Lord et al., 2003), und um darüber hinaus möglicherweise neue Erkenntnisse über Veränderungen des VEGF-Systems im Rahmen der refluxbedingten Erkrankung Barrett-Mukosa zu gewinnen, sollen in der vorliegenden Arbeit Ösophagus-Normalgewebe sowie Biopsate der Barrett-Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz in einer großen Fallzahl untersucht und zusätzlich zu den Markern VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 und CD31 auch die Expression von VEGF-D und LYVE-1 betrachtet werden. Im Mittelpunkt der Untersuchung steht es, Vorkommen, Häufigkeit und differentielle Expression oben genannter Gefäßwachstumsfaktoren und Rezeptoren zu analysieren und die Expressionsbefunde im Kontext mit bisherigen Erkenntnissen zu diskutieren. Von großer Relevanz ist die Frage, ob Angiogenesefaktoren mit Voraussagewert für die Entwicklung eines Barrett-Karzinoms identifiziert werden können.