

Aus dem Institut für klinische Chemie und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

LI-Cadherin als potentieller Biomarker bei Krebserkrankungen
von Darm, Leber und Lunge

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Deepak Ben Vangala

aus Dortmund

Datum der Promotion: 22.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Zusammenfassung.....	5
Abstract	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Epidemiologie von Krebserkrankungen.....	8
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren von kolorektalen Karzinomen.....	8
1.1.2 Epidemiologie, Einteilung und Risikofaktoren von primären Leberkrebserkrankungen	9
1.1.3 Epidemiologie, Einteilung und Risikofaktoren von primären Lungenkrebserkrankungen.....	10
1.1.4 Stadieneinteilung von Krebserkrankungen – die TNM-Klassifikation.....	10
1.1.5 Onkogenese am Beispiel des kolorektalen Karzinoms	12
1.1.6 Therapie, Prognose und Prävention von Krebserkrankungen	14
1.2 Biomarker	16
1.2.1 Definition	16
1.2.2 Biomarker und Krebserkrankungen.....	16
1.2.3 Staging-Marker.....	16
1.2.4 Screening-Marker.....	17
1.2.5 Prädiktive Biomarker	17
1.2.6 Prognostische Biomarker	18
1.2.7 Monitoring-Marker	18
1.3 Zelladhäsion.....	19
1.3.1 Zelladhäsionsmoleküle und Ihre Einteilung.....	19
1.3.2 Die Cadherin-Superfamilie	21
1.3.3 Cadherine und Krebserkrankungen am Beispiel von E-Cadherin.....	23
1.4. LI-Cadherin.....	25
1.4.1 LI-Cadherin als Biomarker bei Krebserkrankungen	26
1.5 Fragestellung.....	28
2 Patienten, Material und Methoden	30
2.1 Gewebeproben.....	30

2.1.2 Lebergewebe und hepatozelluläre Karzinome	32
2.1.3 Cholangiokarzinome.....	33
2.1.4 Lungenwebe und Lungenkarzinome	37
2.2 Materialien.....	38
2.2.1 Tissue-Microarrays.....	38
2.2.2 Antikörper	38
2.2.3 Verbrauchsmaterialien und Puffer.....	38
2.2.4 Geräte	39
2.3 Methoden	40
2.3.1 Herstellung von Gewebelysaten.....	40
2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assays	40
2.3.3 SDS-PAGE.....	41
2.3.4 Immundetektion von LI-Cadherin mittels Western Blot.....	43
2.3.5 Immunhistochemie	45
2.3.6 Probenvorbereitung.....	46
2.3.7 Block-Schritte	47
2.3.8 Applikation der Antikörper	48
2.3.9 Gegenfärbung und Eindeckeln.....	49
2.3.10 Auswertung	49
3 Ergebnisse	51
3.1 LI-Cadherin Expression in kolorektalen Karzinomen und kolorektalen Fernmetastasen	51
3.1.1 Immunhistochemie von normalem Ileum- und Kolongewebe.....	51
3.1.2 Vergleich der LI-Cadherin Expression in kolorektalen Adenomen und Karzinomen	52
3.1.3 Stadiumabhängige LI-Cadherin Expression in primären kolorektalen Karzinomen	54
3.1.4 LI-Cadherin Expression in kolorektalen Fernmetastasen.....	55
3.2 LI-Cadherin Expression im Cholangiokarzinom	56
3.2.1 Immunhistochemische Analyse der Proben des Tissue-Micro-Arrays.....	56
3.2.2 LI-Cadherin Expression in Klatskin-Tumoren.....	57
3.2.3 Vergleich der LI-Cadherin-Expression mit klinischen und histopathologischen Parametern in Klatskin-Tumoren.....	58
3.2.4 LI-Cadherin Expression in intrahepatischen Cholangiokarzinomen.....	60

3.3 LI-Cadherin im hepatozellulären Karzinom	65
3.3.1 Vergleich der LI-Cadherin-Antikörper im Western Blot	65
3.3.2 Immunhistochemische Analyse von LI-Cadherin im hepatozellulären Karzinom	66
3.3.3 Biotinblock im hepatozellulären Karzinom.....	66
3.3.4 Western Blot Analyse im HCC	68
3.4 Vergleich der LI-Cadherin Expression in Lebergewebe	69
3.5 LI-Cadherin Expression in Lungenkarzinomen	70
3.6 Vergleich der LI-Cadherin Expression im Lungengewebe	71
3.7 Co-Expression von LI-Cadherin und Cdx2.....	71
4. Diskussion	75
4.1 LI-Cadherin Expression in Adenomen und Karzinomen des Kolons sowie in kolorektalen Fernmetastasen	75
4.2. LI-Cadherin Expression in Hepatozellulären Karzinomen.....	78
4.3. LI-Cadherin Expression Cholangiokarzinomen	79
4.3.1 LI-Cadherin Expression in Klatskin-Tumoren – Korrelation mit Differenzierung und Infiltrationstiefe	80
4.3.2 LI-Cadherin Expression in intrahepatischen Cholangiokarzinomen – ein prognostischer Biomarker	81
4.4 LI-Cadherin als zellulärer Staging-Marker in der Leber.....	82
4.5 LI-Cadherin als zellulärer Staging-Marker in der Lunge.....	83
4.6 LI-Cadherin und Cdx2 Co-Expression.....	84
4.7 Fazit und Ausblick	85
5 Literaturverzeichnis	87
6 Eidesstattliche Versicherung	93
7 Lebenslauf.....	95
8 Publikationsliste.....	96
9 Danksagungen	98

Zusammenfassung

Das Zelladhäsionsmolekül LI-Cadherin gehört zur Gruppe der 7D-Cadherine und wurde initial in der Leber und im Darm der Ratte beschrieben. Beim Menschen wird es physiologischerweise zusammen mit E-Cadherin am Epithel des gesamten Darm hochgradig exprimiert. Es konnte jedoch beim Menschen auch in Karzinomen des Magens, des Pankreas und in hepatozellulären Karzinomen eine ektope Expression von LI-Cadherin nachgewiesen werden. Insbesondere im Magenkarzinom wurde LI-Cadherin bei Expression bereits in der intestinalen Metaplasie als möglicher Biomarker vorgeschlagen. Bei kolorektalen Karzinomen konnte eine verminderte LI-Cadherin Expression im Primarius mit einem vermehrten nodalen Befall assoziiert werden.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Western Blot Analysen und Immunhistochemie die Expression von LI-Cadherin in Gewebeproben von kolorektalen Karzinomen und deren Metastasen, hepatozellulären Karzinomen, Cholangiokarzinomen und Lungenkarzinomen von insgesamt 475 Patienten untersucht.

Dabei zeigte sich im Gegensatz zu E-Cadherin in kolorektalen Karzinomen eine hochgradige Persistenz der Expression von LI-Cadherin auch bei fortgeschritteneren Tumoren und in Fernmetastasen in Leber und Lunge. Insgesamt waren über 95% aller kolorektalen Primärkarzinome, über 85% aller kolorektalen Lungenmetastasen und 100% der kolorektalen Lebermetastasen LI-Cadherin positiv. Im Gegensatz dazu konnte eine LI-Cadherin Expression entgegen der bislang bekannten Datenlage in hepatozellulären Karzinomen nicht nachgewiesen werden. In primären Lungenkarzinomen zeigte sich lediglich in 7,4% der untersuchten Lungenadenokarzinome eine LI-Cadherin Expression. In Cholangiokarzinomen wurde in einem Kollektiv von 60 Patienten mit Klatskin-Tumoren eine statistisch signifikante Assoziation von LI-Cadherin mit Infiltrationsgrad, Differenzierungsgrad und Metastasierung im Rezidiv festgestellt. In einem weiteren Kollektiv von 110 Patienten mit intrahepatischen Cholangiokarzinomen zeigte sich eine statistisch signifikante negative Assoziation mit dem krankheitsfreien Überleben der Patienten.

LI-Cadherin ist somit ein potentieller zellulärer Staging-Biomarker insbesondere für die Diskriminierung von kolorektalen Lungenmetastasen und Lungenadenokarzinomen mit

einer Sensitivität von 88,9% und einer Spezifität von 92,6%. Eine LI-Cadherin Expression in der Leber schließt ein hepatozelluläres Karzinom aus. Zusätzlich hat LI-Cadherin Potenzial als prognostischer Biomarker für intrahepatische Cholangiokarzinome bezüglich des krankheitsfreien Überlebens.

Abstract

The cell adhesion molecule LI-cadherin is a member of the cadherin subfamily of 7D-cadherins. It was first described in the liver and intestine of rats. In humans, physiological expression of LI-cadherin is limited to the epithelial tissue off the gut where it is expressed on the lateral surface of enterocytes and co-expressed with E-cadherin. There have been multiple reports of ectopic LI-cadherin expression in gastric carcinomas, intestinal metaplasia of the stomach, ductal pancreatic adenocarcinomas and hepatocellular carcinomas. Reduced expression of LI-cadherin in colorectal carcinomas could be associated with increased lymphnode.

In this work, tissue specimen of colorectal carcinomas and their metastases, hepatocellular carcinomas, cholangiocarcinomas and lung carcinomas of altogether 475 patients were analyzed by western blot and immunohistochemistry regarding their LI-cadherin expression.

LI-cadherin was highly expressed even in advanced stages of colorectal carcinoma and its metastases contrasting the previously described expression of E-cadherin in these tissues. More than 95% of specimen with primary colorectal carcinomas revealed an LI-cadherin expression just like all analyzed colorectal carcinoma metastases to the liver and more than 85% of colorectal lung metastases. Surprisingly, none of the analyzed hepatocellular carcinomas showed any LI-cadherin expression, contradicting the current published data. In the lung, 7,4% of patients with lung adenocarcinoma had LI-cadherin positive tumors. In a cohort of 60 patients who underwent surgery for ductal cholangiocarcinomas LI-cadherin expression could be correlated significantly with depth of infiltration, differentiation and metastases in recurrence. A further cohort of 110 patients with intrahepatic cholangiocarcinoma showed a statistically significant negative correlation with disease free survival after undergoing surgery.

Thus, LI-cadherin can serve as cellular staging biomarker for discriminating primary lung adenocarcinomas from colorectal lung metastases with a sensitivity of 88,9% and a specificity of 92,6%. It can exclude hepatocellular carcinoma if expressed in liver tissue. Furthermore LI-cadherin is a prognostic cellular biomarker for intrahepatic cholangiocarcinomas regarding disease free survival.

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie von Krebserkrankungen

Krebserkrankungen stellen eine der größten Herausforderung an die moderne Medizin dar. Im Jahre 2008 litten schätzungsweise 12,7 Millionen Menschen weltweit an einer Krebserkrankung. In Deutschland erkrankten im selben Jahr etwa 470.000 Menschen an Krebs. Trotz sich ständig verbessernder diagnostischer Maßnahmen und Therapien starben im selben Jahr weltweit etwa 7,6 Millionen Menschen und in Deutschland 215.000 Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung [1, 2]. Zunächst werden in den folgenden Kapiteln die für diese Arbeit relevanten Tumorentitäten vorgestellt – das kolorektale Karzinom sowie die wichtigsten primären malignen Leber- und Lungentumore.

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren von kolorektalen Karzinomen

Im Jahr 2008 erkrankten weltweit 1,2 Millionen Menschen an einem kolorektalen Karzinom und mehr als 600.000 starben an dieser Erkrankung. Damit war das kolorektale Karzinom die vierthäufigste Krebserkrankung weltweit und die dritthäufigste Ursache für einen krebsassoziierten Tod [1]. Die Rate an Erkrankten war in Industrieländern wie schon in den vorangegangenen Jahren höher als in Entwicklungsländern. So betrug die Inzidenz für Männer für ein kolorektales Karzinom zwischen 1998 und 2002 in Teilen Indiens 4,1 pro 100.000 und für Frauen 3,6 pro 100.000 [3], während in Deutschland im selben Zeitraum 63,0 pro 100.000 Männer und 39,4 pro 100.000 Frauen erkrankten [4]. Insgesamt lag die 5-Jahres-Prävalenz für kolorektale Karzinome in Deutschland im Jahre 2008 bei 190.000 bei mehr als 26.000 Sterbefällen im selben Jahr [2]. Verantwortlich hierfür werden vor allem Unterschiede in den Lebens- und vor allem Ernährungsgewohnheiten gemacht. So scheinen körperliche Inaktivität, Übergewicht, Stammfettsucht und eine westliche Diät einen Einfluss auf die Zahl der an einem kolorektalen Karzinom erkrankten zu haben [5]. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Inzidenzraten der Patienten mit einem kolorektalen Karzinom in den letzten Jahrzehnten in Ländern gestiegen sind, in denen sich ein zunehmend westlicher Lebensstil durchgesetzt hat, wie z.B. in Japan [3].

1.1.2 Epidemiologie, Einteilung und Risikofaktoren von primären Leberkrebserkrankungen

Primär maligne Lebertumore sind weltweit die fünfthäufigsten Krebserkrankungen bei Männern und die siebthäufigsten bei Frauen. Demgegenüber stehen Leberkrebserkrankungen in der Mortalitätsstatistik bei Männern an zweiter und bei Frauen an fünfter Stelle. Insgesamt erkrankten 2008 weltweit 748.300 Menschen an einer Krebserkrankung der Leber und 695.900 Menschen starben daran [1].

Die wichtigsten primären malignen Tumore der Leber sind das hepatozelluläre Karzinom und das Cholangiokarzinom. Hepatozelluläre Karzinome treten hierbei mit 75-90% der primären Leberkrebserkrankungen deutlich häufiger auf als Cholangiokarzinome [6].

Hepatozelluläre Karzinome treten in 80% aller Fälle in ostasiatischen Ländern und Ländern südlich der Sahara auf. In bis zu 90% der Fälle entsteht ein hepatozelluläres Karzinom auf dem Boden einer chronischen Lebererkrankung. Während in Asien und Afrika vor allem chronische Hepatitis-B-Infektionen für die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen verantwortlich sind, stehen in Industrieländern die Leberzirrhosen auf dem Boden chronischer Hepatitis-C-Virus Infektionen und chronischer Alkoholkrankungen an erster Stelle [7].

Das Cholangiokarzinom ist der zweithäufigste primäre Lebertumor. Tumore dieser Entität haben ihren Ursprung in den Gallengangsepithelien, wohingegen hepatozelluläre Karzinome ihren Ursprung in den Leberzellen nehmen. Cholangiokarzinome werden heute ob der unterschiedlichen therapeutischen Konsequenzen in intrahepatische Cholangiokarzinome, Karzinome der Hepatikusgabel (Klatskin-Tumore) und extrahepatische Cholangiokarzinome unterteilt [8]. Auch beim Cholangiokarzinom zeigen sich ausgeprägte Unterschiede in der weltweiten Häufung. Dies liegt unter anderem an regionalen Unterschieden der Parasiten *Opisthorchis viverrini* und *Clonorchis sinensis*, die in Thailand bzw. Korea vermehrt auftreten und dort mit erhöhten Raten an Cholangiokarzinomen assoziiert werden konnten. Weitere etablierte Risikofaktoren sind die primär sklerosierende Cholangitis, die Hepatolithiasis und Choledochuszysten. Als mögliche

Risikofaktoren für die Entwicklung eines Cholangiokarzinom gelten chronisch virale Hepatitiden, Cholangitiden und die Leberzirrhose [9].

1.1.3 Epidemiologie, Einteilung und Risikofaktoren von primären Lungenkrebserkrankungen

Lungenkrebserkrankungen waren 2008 weltweit für 13% aller Krebserkrankungen und 18% aller Krebstodesfälle verantwortlich. Lungenkrebserkrankungen sind weltweit die häufigste krebsassoziierte Todesursache bei Männern und die zweithäufigste bei Frauen [1]. In Deutschland erkrankten 2008 49.000 Menschen an einem Lungenkarzinom und 42.000 starben daran [2]. Anhand des histopathologischen Befundes werden Lungenkarzinome in kleinzellige (small cell lung cancer – SCLC) und nicht-kleinzellige (non small cell lung cancer – NSCLC) Karzinome unterteilt [10]. Dabei umfasst die Gruppe der NSCLC mehrere Entitäten: Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, großzellige Karzinome und nicht anders klassifizierbare NSCLC (NSCLC-NOS). Adenokarzinome sind mit nahezu 40% und Plattenepithelkarzinome mit 25-40% aller Lungenkrebsfälle in den USA die häufigsten Lungentumore [10]. SCLC machen etwa 13% aller Fälle aus [11]. Rauchen ist der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms. In den USA konnte eine klare Korrelationen zwischen Rückgang der Zahl der Raucher und Rückgang der Inzidenz an Lungenkarzinomen gezeigt werden [10]. Weitere Risikofaktoren beinhalten die Inhalation von kanzerogenen Noxen wie Asbest oder Dieselruß oder Radonexposition [12].

1.1.4 Stadieneinteilung von Krebserkrankungen – die TNM-Klassifikation

Zur Einteilung von Krebserkrankungen wird heute im allgemeinen die TNM-Klassifikation der Internationalen Union gegen Krebs (UICC) verwendet (Tabelle 1). Aktuell ist die siebte Auflage [13]. Mittels einer Tumorformel wird das Krebsstadium ermittelt. Der Buchstabe T bezeichnet in dieser Tumorformel im Allgemeinen die Infiltrationstiefe eines Tumors. Je nach Infiltrationstiefe erhält der Buchstabe eine Zahl von 1 bis 4, wobei ein T4-Tumor in der Regel organüberschreitend infiltriert. Der Buchstabe N steht für die Lokalisation der befallenen Lymphknoten und Lymphknotenstationen und wird mit einer Zahl von 0 bis 3 versehen. Ein Tumor mit Fernmetastasen ist ein M1-Tumor, ein Tumor ohne Fernmetastasen erhält die Bezeichnung M0. Die endgültige

Tumorformel – mit Ausnahme der Fernmetastasen – wird durch den Pathologen mikroskopisch festgelegt. Den entsprechenden Großbuchstaben wird ein „p“ vorangestellt. Zusätzlich beurteilt der Pathologe mikroskopisch die Lymphgefäßinvasion und die Invasion in Venolen (Buchstaben L und V). Bei Operationspräparaten wird die Infiltration des Resektatrandes mit dem Buchstaben R bezeichnet (R0: Resektion im Gesunden, R1: mikroskopische Tumordinfiltration des Resektatrandes, R2 makroskopische Infiltration des Resektatrandes). Letztlich erfolgt die Beurteilung der Differenzierung eines Tumors (Buchstabe G): ein gut differenzierter Tumor ist in der Regel ein G1-Tumor, ein schlecht differenzierter ein G3-Tumor.

TNM	Morphologie
T1-3	Tumor in der Regel auf das Organ begrenzt
T4	Tumor überschreitet Organgrenze
N0	Kein Lymphknotenbefall
N1/2	Regionaler Lymphknotenbefall
N3	Befall entfernter Lymphknoten
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM Klassifikation

Für das histopathologische Staging gibt es für jede Tumorentität genaue Vorgaben, zum Beispiel welche Lymphknoten als regionär gelten und bei Befall mit dem Buchstaben N1 bezeichnet werden. Aus der Tumorformel ergibt sich dann das UICC-Stadium der jeweiligen Tumorart (Tabelle 2). Die Stadien werden meist von UICC I (klein, wenig infiltrierend, keine Metastasen) bis UICC IV (Fernmetastasierung) unterteilt und erleichtern zum einen standardisierte Therapieentscheidungen und haben zum anderen prognostische Aussagekraft [13].

UICC-Stadium	T	N	M
UICC 0	Tis	N0	M0
UICC I	T1, T2	N0	M0
UICC II	T3, T4	N0	M0
UICC III	Jedes T	N1, N2	M0
UICC IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 2: Übersicht der TNM Klassifikation für die einzelnen Stadien des kolorektalen Karzinoms, T: Infiltrationstiefe, N: Nodalstadium, M: Fernmetastasen, Tis: Carzinoma in situ; nach [14].

1.1.5 Onkogenese am Beispiel des kolorektalen Karzinoms

Karzinome sind maligne Neoplasien von Epithelien. Malignität zeichnet sich durch unkontrolliertes und invasives Wachstum bei Verlust von Funktion und zum Teil auch Morphologie aus mit der zusätzlichen Möglichkeit der Bildung von Tumorabsiedlungen in anderen Organen (Metastasen). Dabei persistiert das bösartige Wachstum auch nach Beendigung etwaiger auslösender Stimuli. Maligne Neoplasien sind auf Grund ihres ungehinderten und unkontrollierten Wachstums konsumierende Erkrankungen, die den Körper in eine katabole Stoffwechsellage versetzen und unterschiedliche Stoffwechselfvorgänge negativ beeinflussen [15].

Ein Modell zur Entstehung des kolorektalen Karzinoms wurde 1988 von Fearon und Vogelstein beschrieben [16]. In dieser sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz kommt es durch genetische Veränderungen in Zellen des normalen Dickdarmepithels zur Entwicklung zunächst tubulärer und villöser Adenome und im Verlauf zur Entwicklung von Karzinomen. Dieser multifaktorielle Prozess dauert oft mehrere Jahrzehnte und es bedarf der Ansammlung von mehreren genetischen Veränderungen. Verantwortlich sind vor allem Mutationen mit Aktivitätsgewinn in Onkogenen und Aktivitätsverlust in Tumorsuppressorgenen. Fearon und Vogelstein machten zunächst 4 unterschiedliche Veränderungen aus, deren kombiniertes Auftreten zu einer letztendlich malignen Entartung führen: Mutation des ras-Onkogens und Mutationen von Tumorsuppressorgenen auf den Chromosomen 5q, 17p und 18q [17]. Heute weiß man, dass nicht nur tubuläre und villöse Adenome präkanzeröse Vorstufen darstellen, sondern beispielsweise auch serratierte Adenome. Weiterhin kann man heute global chromosomale Veränderungen und

epigenetische Modulationen von spezifischen genetischen Mutationen und Veränderungen in Signaltransduktionswegen unterscheiden [18].

Zu den chromosomalen Veränderungen gehören die chromosomale Instabilität, die zum Beispiel in Form von Aneuploidie bei 85% aller Karzinome zu finden ist. Die genauen molekularen Mechanismen der chromosomalen Instabilität sind noch weitgehend unbekannt. Eine weitere chromosomale Veränderung ist die Mikrosatelliteninstabilität. Sie wird bei 15% der kolorektalen Karzinome beobachtet. Patienten mit mikrosatelliteninstabilen Karzinomen haben einen Mangel an sogenannten DNA-Mismatch-Reparaturproteinen, entweder durch somatische Mutationen oder aber bereits als Keimbahnmutationen. Patienten mit einem Lynch-Syndrom entwickeln kolorektale Karzinome bereits in frühem Alter auf Grund von Keimbahnmutationen der Mismatch-Reparatur-Proteine und haben fast immer mikrosatelliteninstabile Karzinome. Daneben können epigenetische Veränderungen wie eine globale DNA-Methylierung oder eine Hypermethylierung von Promotorregionen mit CpG-Inseln für genetische Instabilität und Karzinogenese mitverantwortlich sein [19].

Spezifische Mutationen können zu Veränderungen in bestimmten Signaltransduktionskaskaden führen, die zellregulatorische Vorgänge kontrollieren, welche überlebenswichtig für Krebserkrankungen sind: Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Apoptose, Immortalisierung, Invasion und Angiogenese. Dazu gehören Mutationen im Wnt- β -Catenin Signaltransduktionsweg, im Epidermal-Growth-Factor-Receptor-(EGFR)-Mitogen-Activated (MAP)-Kinase-Weg, im Transforming-Growth-Factor(TGF)- β -Weg und im Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Signaltransduktionsweg.

Eine der am besten untersuchten Mutationen ist die des adenomatösen Polyposis coli (APC)-Gens, die in 70% aller Darmkrebspatienten mit sporadischem kolorektalen Karzinom und bei einer familiären Darmkrebsentität, der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), immer zu finden ist. Durch eine APC-Mutation kommt es zu einem fehlenden Abbau von β -Catenin und einer dauerhaften Aktivierung der Wnt- β -Catenin Signalkaskade mit weitreichenden Folgen auf die Zellproliferation [18]. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass bestimmte Gene, die für die Akquirierung von Stammzeleigenschaften mitverantwortlich gemacht werden und somit für die Immortalisierung, Entdiffe-

renzierung und Metastasierung sowie für Resistenzen gegenüber Zytostatika wichtig zu sein scheinen, durch β -Catenin reguliert werden [20].

Der TGF- β -Signaltransduktionsweg gilt als Tumorsuppressor-Weg. Mutationen können entweder Rezeptoren oder intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle betreffen. Letztere stehen in Zusammenhang mit der oben bereits erwähnten heterozygoten Deletion des langen Arms von Chromosom 18. Hierdurch kommt es zum Beispiel zu einem Verlust von Molekülen wie DCC und SMAD 4 [18].

Die intrazelluläre Signalweiterleitung bei Aktivierung des EGF-Rezeptors erfolgt unter anderem über die Moleküle K-ras und BRAF. K-ras gehört zur ras-Familie der Onkogene. Bereits von Fearon und Vogelstein wurden ras-Mutationen mitverantwortlich für die kolorektale Karzinogenese gemacht [17]. Unabhängig davon hat der K-ras Mutationsstatus in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms in den letzten Jahren einen enormen Stellenwert erhalten. K-ras Mutationen dienen als prädiktiver Biomarker vor Behandlungen mit EGF-Rezeptor-Antikörpern (siehe Kapitel 1.2.5) [21].

1.1.6 Therapie, Prognose und Prävention von Krebserkrankungen

Die Therapie von Krebserkrankungen hängt in erster Linie von der Tumorentität ab. Über die Zeit haben sich unterschiedliche Therapieprotokolle für die einzelnen Erkrankungen etabliert, die in Studien und durch die Hinzunahme neuer Substanzen ständig optimiert werden. Krebserkrankungen werden durch Operationen, Bestrahlung oder medikamentöse Therapien behandelt. Neben der Behandlungsmodalität ist die Zielsetzung der Behandlung wichtig: kann die Erkrankung geheilt werden oder handelt es sich um eine palliative Therapie [22]. Generell gilt, dass die Primärprävention, also die Verhinderung der Tumorerkrankung vor Ihrer Entstehung jeder Therapie vorzuziehen ist. Praktisch heißt das, Risikofaktoren zu identifizieren und zu minimieren. Bei allen Formen des Lungenkrebs zählt dazu beispielsweise die Vermeidung des Rauchens bzw. die Entwöhnung von der Sucht [12]. Beim hepatozellulären Karzinom gilt es, eine hohe Impfquote gegen das Hepatitis-B-Virus auch in Entwicklungsländern zu erreichen und dem Alkoholabusus entgegenzuwirken [7]. Weiterhin ist eine im Frühstadium diagnostizierte Krebserkrankung prognostisch günstiger. Für bestimmte Krebsarten, wie das kolorektale Karzinom, haben sich daher Früherkennungsprogramme zur Primär- und Se-

kundärprävention durchgesetzt, wie die Untersuchung des Stuhls auf okkultes Blut oder endoskopische Vorsorgeuntersuchungen. In der Dickdarmspiegelung können noch asymptomatische Tumore in einem frühen Stadium gesichert werden bzw. ihre präkanzerösen Vorstufen, die Adenome, abgetragen werden und manifeste Karzinome so verhindert werden [23].

Ein früh diagnostiziertes Karzinom ist meist noch klein, auf ein Organ beschränkt und weist noch keine Metastasen auf. Es ist in einem niedrigen UICC-Stadium und oft durch eine operative Entfernung heilbar. Demgegenüber sind Krebserkrankungen in fortgeschrittenem Stadium einer Operation nicht zugänglich und werden mit unterschiedlichen Protokollen einer Radio- und/oder Chemotherapie behandelt. Durch die Therapie lässt sich zwar meist das Überleben verlängern, eine Heilung kann aber nicht mehr erreicht werden. Dabei ist zu beachten, dass die genetische Heterogenität bei ein und derselben Tumorart zu unterschiedlichem Therapieansprechen auf ein bestimmtes Medikament führen kann [24].

Schwierig werden therapeutische Entscheidungen dann, wenn die Tumorentität in einem Organ nicht klar zuzuordnen ist. Zum Beispiel können Lungenrundherde ein primäres Lungenkarzinom darstellen, aber auch metastatische Läsionen eines kolorektalen Karzinoms sein. Die therapeutischen Konsequenzen, aber auch die Prognose des Patienten können große Unterschiede aufweisen. Denn je nach Tumorentität und entsprechender Therapie kann das Überleben zum Teil erheblich differieren. Patienten mit einem metastasierten Kolonkarzinom (Stadium UICC IV) haben beispielsweise eine 5-Jahresüberlebensrate von etwa 20%, wohingegen die 5-Jahresüberlebensrate aller Lungenkrebspatienten (UICC Stadium I-IV) bei unter 15% liegt und die der Patienten mit NSCLC mit Fernmetastasen sogar nur unter einem Prozent [22].

Insgesamt zeigt sich, dass die Prognose von Krebserkrankungen durch bessere, gezieltere und wenig invasive Früherkennung erheblich verbessert würde. Wünschenswert wäre, Diagnostik und Therapie der Patienten durch eine bessere Charakterisierung der Tumoreigenschaften zur Diskriminierung von Tumorentitäten und zur Vorhersagbarkeit des Therapieansprechens zu optimieren: es braucht eine Verbesserung von Biomarkern.

1.2 Biomarker

1.2.1 Definition

Die „Biomarkers Definition Working Group“ des National Institute of Health (NIH) der USA hat 2001 Biomarker als objektiv messbare Eigenschaften definiert, die einen normalen oder pathologischen Prozess oder das Ansprechen auf eine therapeutische Intervention widerspiegeln. Ein Biomarker muss dabei nicht zwingend in funktionellem Bezug zu der korrespondierenden Erkrankung stehen [25]. Biomarker können direkt am Menschen gemessen werden, beispielsweise bei Verfahren wie dem EKG, bildgebend bestimmt werden in radiologischen Verfahren, in körpereigenen Flüssigkeiten wie Blut oder Urin oder direkt an Zellen in Gewebeproben nachgewiesen werden [26].

1.2.2 Biomarker und Krebserkrankungen

Bei Krebserkrankungen haben sich hauptsächlich Biomarker durchgesetzt, die in Form unterschiedlicher Moleküle – RNA, DNA, Proteine oder Stoffwechselabbauprodukte – in Blut, Urin oder Gewebeproben nachgewiesen werden können [26]. Biomarker, die in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können, werden als humorale Marker bezeichnet. Moleküle, die in Gewebeproben zu finden sind, werden als zelluläre Biomarker klassifiziert.

Neben der Einteilung nach Molekülklasse oder Ursprungsort sind in der onkologischen Diagnostik und Therapie fünf Einsatzfelder von Biomarkern von Bedeutung: die Früherkennung von Risikogruppen, die Diagnostik einer Erkrankung, das Therapieüberwachen, die Rezidivfrüherkennung und die Prognosestellung [27]. Für diese Einsatzfelder werden im Folgenden fünf Gruppen von Biomarkern unterschieden.

1.2.3 Staging-Marker

Staging-Marker haben die Fähigkeit, gesunde von kranken Prozessen abzugrenzen oder unterschiedliche Krankheitsprozesse gegeneinander zu unterscheiden. Mit einem Staging-Marker kann eine Verdachtsdiagnose bestätigt werden. Staging-Marker können bereits in einem asymptomatischen Stadium der Erkrankung ausgeprägt werden [28]. Bei Krebserkrankungen wurden eine Vielzahl solcher qualitativ diagnostischer Marker

beschrieben. Zum Beispiel helfen unterschiedliche Verteilungsmuster der Zytokeratine 7 und 20 bei der richtigen histopathologischen Diagnostik und Differentialdiagnostik von Metastasen kolorektaler Karzinome und primären Adenokarzinomen der Lunge [29]. Auf Grund der erheblichen Unterschiede in der Therapie und Prognose dieser Erkrankungen haben Staging-Marker einen hohen Stellenwert in der Differentialdiagnostik und Rezidivfrüherkennung.

1.2.4 Screening-Marker

Ähnlich den Staging-Markern ermöglichen Screening-Marker es, einen pathologischen von einem physiologischen Zustand zu unterscheiden. Screening-Marker sollten jedoch zwingend in einem Frühstadium einer Erkrankung nachweisbar sein, um eine frühzeitige Diagnose zu ermöglichen und therapeutisch eingreifen zu können [30]. Der einzige Screening-Marker, der im klinischen Alltag routinemäßig bestimmt wird, ist das Prosta-ta-Spezifische Antigen (PSA) zur Früherkennung des Prostatakarzinoms. In den USA wird Männern generell ab einem Alter von 40 Jahren eine jährliche PSA-Wert-Kontrolle empfohlen. Bei steigenden PSA Werten, bzw. Werten über dem alterskorrigierten Normbereich sind weitere diagnostische Maßnahmen zur Sicherung oder zum Ausschluss eines Prostatakarzinoms angezeigt [31].

1.2.5 Prädiktive Biomarker

Für die Abschätzung des Therapieansprechens werden in der modernen Onkologie die Suche und der Einsatz prädiktiver Biomarker immer wichtiger. In der Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms konnte durch die Hinzunahme der Antikörper Cetuximab oder Panitumumab zur Standardchemotherapie für einige Patienten ein Überlebensvorteil erzielt werden [21]. Diese Antikörper richten sich gegen den Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR) und zeigen nur eine Wirkung, wenn das Molekül K-ras, welches an der Signaltransduktion durch EGFR beteiligt ist, in Wildtyp-Form vorliegt [32]. Patienten mit mutiertem K-ras sprechen demnach nicht auf die entsprechende Antikörpertherapie an. Der K-ras Mutationsstatus wird heute bei Patienten mit metastasierten kolorektalen Karzinomen routinemäßig mitbestimmt und ist entscheidend für eine Therapie mit EGFR-Antikörpern [24]. Prädiktive Biomarker spiegeln in der onkologischen Therapie den gegenwärtigen Paradigmenwechsel hin zu personalisierter Medi-

zin und individuellen Therapieschemata wieder. Neben dem k-ras Mutationsstatus beim kolorektalen Karzinom ist beispielsweise der EGFR-Mutationsstatus beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom therapieentscheidend bezüglich der Verwendung von sogenannten „small molecules“ wie Erlotinib als Inhibitoren des EGFR [33].

1.2.6 Prognostische Biomarker

Prognostische Biomarker können den wahrscheinlichen Verlauf einer Erkrankung vorhersagen [30]. Die Expression eines prognostischen Biomarkers korreliert demzufolge mit einem Überlebensvorteil oder -nachteil. Bei Krebserkrankungen korreliert – wie oben bereits erwähnt – ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit einer schlechteren Prognose. Entsprechend sind in der Literatur einige Moleküle als prognostische Biomarker beschrieben, die mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium einhergehen. Daneben gibt es Markermoleküle, die eine bessere oder schlechtere Prognose vorhersagen können. Eine bestimmte Mutation des oben bereits erwähnten K-ras, nämlich eine Punktmutation in Codon 13 (G13D), scheint einen prognostisch ungünstigen Einfluss auf den Verlauf von kolorektalen Karzinomen zu haben [34]. Weiterhin konnte für kolorektale Karzinome im Stadium UICC II und III gezeigt werden, dass die Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin einen Einfluss auf das Überleben der Patienten hat. Ein immunohistochemisch nachgewiesener Verlust von E-Cadherin korrelierte mit einer schlechteren Prognose in diesem Patientenkollektiv [35].

1.2.7 Monitoring-Marker

Monitoring-Marker werden in der klinisch onkologischen Praxis für eine Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt. Diese Marker sind meist humorale Biomarker und werden auch als klassische Tumormarker bezeichnet [36]. Ihr Anwendungsbereich liegt in der Therapiekontrolle und Verlaufsbeobachtung. Wichtig ist hierbei nicht der absolute Wert des Markers im Serum sondern die Kinetik im Verlauf der Erkrankung. Ein vor Beginn einer Therapie erhöhter Wert sollte unter der Therapie – zum Beispiel Operation oder Chemotherapie – abfallen und somit den Therapieerfolg anzeigen. Dies ist nur möglich bei initial erhöhten Markerwerten. Da die Sensitivität der meisten Markermoleküle nicht ausreichend hoch ist, eignen sich Monitoring Marker in der Regel nicht als Screening-Marker [37].

Ein bei Erstdiagnose erhöhter und im Therapieverlauf absinkender Monitoring-Marker eignet sich oft auch zur Rezidivfrüherkennung. Ein Anstieg der Konzentration des Tumormarkers gilt als Hinweis auf ein Rezidiv bzw. ein Fortschreiten der Erkrankung [27]. Beim kolorektalen Karzinom ist das Carcinoembryonale Antigen (CEA) ein solcher in der klinischen Routine gebräuchlicher Monitoring-Marker [36].

1.3 Zelladhäsion

Die meisten eukaryoten Zellen haben die Fähigkeit, komplexere Strukturen, vielzellige Organismen, Gewebe und Organe zu formen. Hierfür reicht es nicht aus, dass Zellen nur aneinander haften. Vielmehr müssen Zellen gleichsam miteinander und mit der sie umgebenden extrazellulären Matrix interagieren. Sie gewinnen so die Möglichkeit, im Verband dreidimensionale Strukturen zu schaffen. Diese Interaktionen werden unter dem Begriff der Zelladhäsion zusammengefasst. Dabei stellt die Zelladhäsion nicht nur den „Klebstoff“ dar, der Zellen zusammenhält, sondern ist auch für eine Vielzahl weiterer Vorgänge verantwortlich. Dazu zählen beispielsweise morphoregulatorische Vorgänge, wie Gewebedifferenzierung und -erhalt [38] oder Vorgänge bei der Immunantwort [39].

1.3.1 Zelladhäsionsmoleküle und Ihre Einteilung

Für die Zelladhäsion sind unterschiedliche Proteine verantwortlich, die auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden. Die meisten dieser Zelladhäsionsmoleküle lassen sich entsprechend ihrer Struktur in vier Hauptfamilien einteilen: Integrine, Selektine, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und Mitglieder der Cadherin-Superfamilie (Abbildung 1). Daneben gibt es einige nicht zuzuordnende Moleküle mit adhäsiven Eigenschaften [40] und die beiden kleineren Gruppen der Syndekane [41] und Disintegrine [42]. Neben den strukturellen Eigenschaften lassen sich Zelladhäsionsmoleküle auch entsprechend ihrer Bindungseigenschaften einteilen. Zum einen erfolgt die Einteilung entsprechend dem Einfluss von Erdalkalitionen auf die Interaktion (Ca^{2+} -abhängige und -unabhängige Interaktion). Zum anderen wird eine homotypische Interaktion (Interaktion gleicher Moleküle) von einer heterotypischen Interaktion (Interaktion verschiedener Moleküle) unterschieden [43, 44].

Strukturell bestehen Zelladhäsionsmoleküle aus einem extrazellulären und einem intrazellulären Teil unterschiedlicher Größe, die über einen transmembranären Teil miteinander verbunden sind. Viele Zelladhäsionsmoleküle interagieren intrazellulär mit weiteren Molekülen und sind darüber an der Regulierung des Cytoskeletts sowie an komplexen intrazellulären Signaltransduktionskaskaden beteiligt [45].

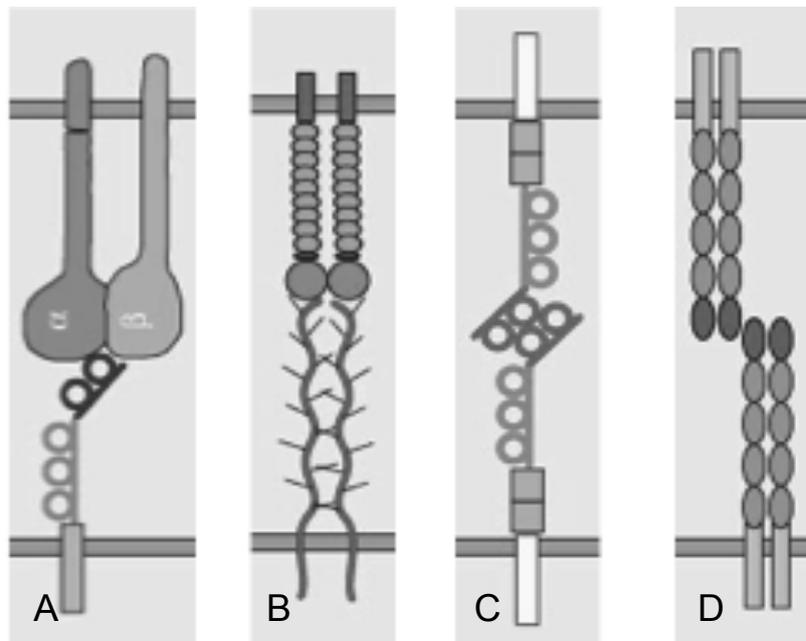


Abbildung 1: Schematische Übersicht der Gruppen von Zelladhäsionsmolekülen: Integrine bestehend aus alpha- und beta- Untereinheiten mit heterotypischer Interaktion (A), Selektine mit heterotypischer Interaktion (B), Ig-CAMs mit homotypischer Interaktion (C) und Cadherine mit homotypischer Interaktion (D) [46].

Integrine sind Glykoproteine der Zelloberfläche, die vor allem für die Interaktion von Zellen mit Proteinen der extrazellulären Matrix verantwortlich sind. Sie vermitteln eine Ca^{2+} -abhängige, heterotypische Interaktion, sind intrazellulär mit dem Cytoskelett verbunden und sind darüber an der Signaltransduktion beteiligt [47].

Die Gruppe der Selektine besteht aus drei Molekülen, dem P-, E-, und L-Selektin. Selektine sind ebenfalls Glykoproteine die eine heterotypische, Ca^{2+} -abhängige Interaktion von Zellen vermitteln. Selektine sorgen für die Adhäsion von Leukozyten an Endothelien und sind somit entscheidend an Entzündungsprozessen wie auch der primären Immunantwort beteiligt [45, 48].

Die Immunglobulin-Superfamilie (IgCAM) ist eine heterogene Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen, die sich strukturell durch eine oder mehrere Immunglobulin-Domänen (Ig-Domänen) ähneln. Je nach Molekül vermitteln einzelne Vertreter dieser Gruppe Ca^{2+} -unabhängige homo- oder heterotypische Interaktionen. Die IgCAMs sind zum Beispiel an der Immunantwort beteiligt und wichtig für die neuronale Entwicklung in komplexen Organismen [45].

1.3.2 Die Cadherin-Superfamilie

Die Cadherin-Superfamilie ist eine große Gruppe zu der beim Menschen aktuell mehr als 80 unterschiedliche Moleküle gehören. Cadherine sind Transmembranproteine, die in der Regel eine homotypische und Ca^{2+} -abhängige Interaktion ermöglichen. Der extrazelluläre Bereich dieser Moleküle ist durch eine mehrfache Wiederholung von Cadherin-typischen homologen Aminosäuresequenzen gekennzeichnet, den sogenannten „cadherin-repeats“ oder Cadherin-Domänen. Diese extrazellulären Cadherin-Domänen (EC-Domänen) bestehen jeweils aus etwa 110 Aminosäuren und bilden strukturell definierte Einheiten. Zwischen den einzelnen EC-Domänen befinden sich die hochkonservierten Calciumbindungsstellen [49].

Entsprechend bestimmter Strukturmerkmale wird die große Cadherin-Superfamilie in mehrere Subfamilien unterteilt, darunter die klassischen und desmosomalen Cadherine sowie Protocadherine und 7D-Cadherine (Abbildung 2)[50, 51].

Klassische Cadherine wurden ursprünglich nach den Geweben benannt, in denen sie hauptsächlich exprimiert werden, beispielsweise E-Cadherin (epitheliales Cadherin) in Epithelien, N-Cadherin (neuronales Cadherin) im Nervengewebe oder VE-Cadherin (vaskulo-endotheliales Cadherin) in Endothelien [52].

Klassische Cadherine gehören zu den am besten charakterisiertesten Cadherinen. Sie bestehen aus fünf extrazellulären EC-Domänen, einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Domäne aus etwa 150 Aminosäuren mit hochkonservierten Abschnitten [53]. Sie sind entscheidend an der Ausbildung der Zonulae adherentes (Adherens junctions) beteiligt, die wiederum eine Stabilisierung von Zellverbänden bewir-

ken. Die Zonula adherens trennt zudem die Plasmamembran der Zelle in einen apikalen und basolateralen Teil und führt somit zu einer Polarisierung der Zelle [54].

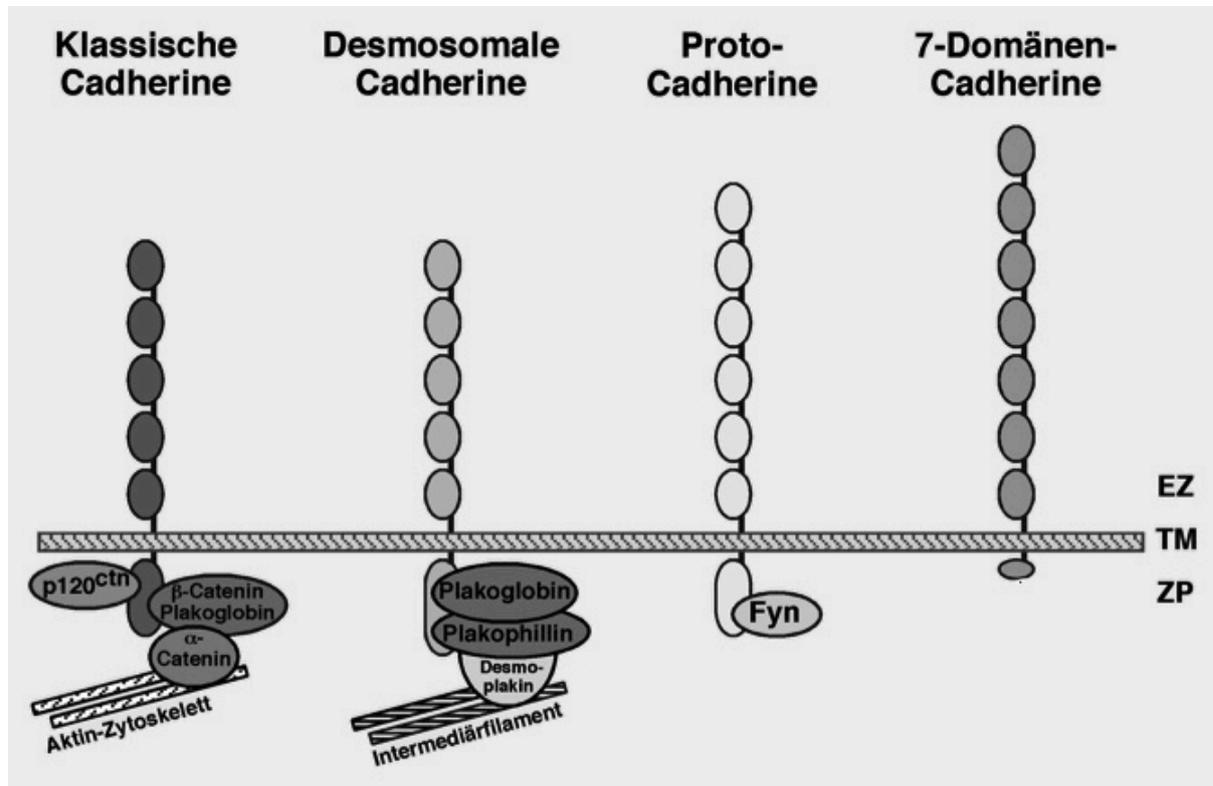


Abbildung 2: Übersicht über die Cadherin-Subfamilien mit intrazellulären Interaktionspartnern, EZ: extrazellulär, TM: transmembranös, ZP: zytoplasmatisch. Adaptiert aus [55].

Dies geschieht über die Interaktion der cytoplasmatischen Domäne der klassischen Cadherine mit Proteinen der Armadillo Familie: β-Catenin, Plakoglobin und p120-Catenin. Hierüber wird eine indirekte Verbindung zum Aktinzytoskelett der Zelle erreicht [49]. Zum anderen stehen Mitglieder der Subfamilie der klassischen Cadherine auch über β-Catenin mit dem Wnt-Signaltransduktionsweg in Verbindung, der die Zellproliferation und viele weitere zellregulatorische Vorgängen kontrolliert [45].

Desmosomale Cadherine sind am Aufbau der Desmosomen beteiligt. Sie werden in Desmogleine und Desmocolline unterteilt. Beim Menschen sind bislang vier Desmoglein- und drei Desmocollin-Gene bekannt [49]. Strukturell bestehen desmosomale Cadherine aus fünf EC-Domänen, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zu denen der klassischen Cadherine aufweisen. Demgegenüber unterscheiden sich desmosomale Cadherine von klassischen Cadherinen durch ihre cytoplasmatische Domäne. Dort interagie-

ren desmosomale Cadherine über die Armadillo-Proteine Plakoglobin und Plakophilin mit dem Intermediärfilament [56]. Desmosomale Cadherine werden in Geweben exprimiert, die mechanischem Stress ausgesetzt sind, beispielsweise dem Herzmuskelgewebe oder mehrschichtigen Epithelien, wie der Haut [49]. Es wird vermutet, dass desmosomale Cadherine neben ihren adhäsiven Funktionen auch an regulatorischen und Differenzierungsvorgängen insbesondere der Epidermis eine Rolle spielen [57].

Protocadherine bestehen aus sechs oder sieben EC-Domänen und einer cytoplasmatischen Domäne, die nicht homolog zu der klassischen Cadherine ist. Protocadherine wurden initial im Zentralnervensystem beschrieben [58]. Mit mehr als 70 Vertretern ist die Gruppe der Protocadherine die größte Subfamilie der Cadherine. 52 der humanen Protocadherine sind in drei verschiedenen Genclustern arrangiert und werden als α -, β - und γ -Protocadherine klassifiziert. Daneben gibt es die sogenannten ungeclusterten Protocadherine [59]. Cytoplasmatische Interaktionspartner sind neben der in Abbildung 2 dargestellten Fyn-Tyrosinkinase auch das Adapterprotein disabled 1 und die protein phosphatase 1 [60]. Protocadherine und ihr Expressionsmuster scheinen einen Einfluss auf das Überleben und die synaptische Organisation von Nervenzellen zu haben [59].

Namensgebend für die 7D-Cadherine sind die sieben EC-Domänen dieser Subfamilie. Die beiden Vertreter dieser Gruppe sind LI-Cadherin (liver-intestine cadherin, Cadherin 17) und Ksp-Cadherin (kidney specific cadherin, Cadherin 16) [61]. Neben den sieben EC-Domänen besitzen die 7D-Cadherine eine nur kurze cytoplasmatische Domäne aus 25 Aminosäuren, die nicht an das Cytoskelett bindet [62, 63]. Die Vertreter der 7D-Cadherine werden in den renalen bzw. intestinalen Epithelien mit E-Cadherin coexprimiert, sind aber nicht co-lokalisiert: 7D-Cadherine werden nicht in den Zonulae adherentes exprimiert, sondern an der lateralen Zellmembran [64, 65] (Abbildung 3). Auf LI-Cadherin wird in Kapitel 1.4 näher eingegangen.

1.3.3 Cadherine und Krebserkrankungen am Beispiel von E-Cadherin

Das klassische Cadherin E-Cadherin gehört zu den am besten untersuchten Cadherinen. E-Cadherin wird physiologischerweise in epithelialen Geweben exprimiert [66]. E-Cadherin exprimierende Zellen und Gewebe zeigen einen epitheloiden Phänotyp mit gering invasivem Potential. Im Gegensatz zu gesunden Zellen weisen Tumorzellen

nicht nur eine Entdifferenzierung vom Ausgangsgewebe auf, sondern auch die Fähigkeit zu invasivem Wachstum und unter Umständen sogar zur Metastasierung. Verschiedene Studien konnten in der Progression von gesundem Gewebe über präkanzeröse Vorstufen bis hin zum manifesten Krebs zeigen, dass eine zunehmende Entdifferenzierung der Zellen hin zu einem fibroblastoiden Phänotyp und eine Zunahme des migratorischen Potentials der entarteten Zellen mit einer Abnahme der E-Cadherin Expression korrelieren. Einige Zellen, bei denen die E-Cadherin-Expression gezielt blockiert wurde, gewannen migratorische Eigenschaften und verloren ihr epitheloides Aussehen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Induktion von E-Cadherin in bestimmten entdifferenzierten Zelllinien die Fähigkeit zu invasivem Wachstum senkte [66, 67].

Bereits Anfang der 90er Jahre konnte E-Cadherin als potentieller Biomarker in unterschiedlichen Karzinomen etabliert werden. Dabei zeigten kolorektale Karzinome, Mammakarzinome, Prostatakarzinome, Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs sowie Magenkarzinome eine positive Korrelation zwischen Entdifferenzierung und Herabregulierung von E-Cadherin. Außerdem war die Expression von E-Cadherin in einigen der o.g. Tumorentitäten, insbesondere bei kolorektalen Karzinomen, in fortgeschritteneren Stadien mit invasiverem und metastatischem Wachstum deutlich geringer als in lokal begrenzten Karzinomen. In Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals war das Rezidivrisiko nach kurativer Operation bei E-Cadherin-negativen Tumoren deutlich erhöht [67]. In familiären Magenkarzinomen, vor allem im diffusen hereditären Magenkarzinom, konnten Keimbahnmutationen von E-Cadherin in 30% der Familien identifiziert werden [68]. E-Cadherin besitzt somit ein weitreichendes Potential als Biomarker. Neben E-Cadherin zeigen auch eine Vielzahl anderer Cadherine und Zelladhäsionsmoleküle unterschiedliche Expressionsmuster in malignen Neoplasien. In Karzinomen wird der Verlust des epitheloiden Phänotyps mit einer Steigerung der migratorischen und invasiven Fähigkeiten von Zellen als Epithelial-mesenchymale Transition bezeichnet. Dieser Prozess ist nicht nur während der Karzinogenese zu beobachten, sondern physiologischerweise auch in der Ontogenese während der Gastrulation. Während der Entstehung des Mesenchyms kommt es zu einer Herabregulierung der E-Cadherin Expression und einer Expression von N-Cadherin. Auch in der Karzinogenese kann bei vielen Tumoren eine de-novo Expression von N-Cadherin beobachtet werden. Dieser Vorgang wird auch als Cadherin-switch bezeichnet [69]. Auf molekularer Ebene

sind unterschiedlichen Mechanismen für den Verlust von E-Cadherin identifiziert worden. Dazu zählen der Verlust der Heterozygotie, inaktivierende Mutationen, Hochregulierung von E-Cadherin Repressoren oder epigenetische Phänomene wie eine Hypermethylierung des E-Cadherin Promoters [70].

1.4. LI-Cadherin

LI-Cadherin wurde erstmals 1994 als erster Vertreter der 7-D-Cadherine in der Leber und im Darm der Ratte identifiziert und dementsprechend als „Liver-intestine cadherin“ benannt [71]. Das Gen für das humane LI-Cadherin liegt auf dem langen Arm von Chromosom 8. Das Protein hat ein Molekulargewicht von etwa 120 kDa. Im Jahre 1997 folgte die Klonierung der humanen cDNA des LI-Cadherins [72] und 2001 die Klonierung des murinen LI-Cadherins [65]. Die Expressionsmusteranalysen beim Menschen zeigten eine auf den gesamten Darm begrenzte Expression von LI-Cadherin bei im Vergleich zur Ratte fehlender Expression in der Leber [72]. Auf zellulärer Ebene wird LI-Cadherin an den lateralen Zellmembranen der Enterozyten exprimiert, mit Ausnahme der Zonulae occludentes et adherentes und der Desmosomen [55] (Abbildung 3). Wird die Expression von LI-Cadherin in nicht-polarisierten Zellen induziert, so zeigen diese Zellen im Verlauf einen epitheloiden Phänotyp und aggregieren in etwa gleichem Ausmaß wie bei einer induzierten Expression von E-Cadherin [62]. Im Gegensatz zu klassischen Cadherinen tritt der Verlust der zelladhäsiven Eigenschaft bei einem Abfall der extrazellulären Kalziumkonzentration unter 0,7 mmol/l sehr plötzlich ein [73].

Ein weiterer Gegensatz zu klassischen Cadherinen ist die fehlende Bindung der kurzen, aus 25 Aminosäuren bestehenden cytoplasmatischen Domäne des LI-Cadherins an Catenine, das Aktincytoskelett oder andere Proteine. Die zelladhäsiven Eigenschaften von LI-Cadherin sind somit unabhängig von intrazellulären Interaktionen [63].

Die Regulation der Transkription des LI-Cadherin-Gens hängt vor allem vom Kaudalen-Homeobox-Protein 2 (Cdx2) ab. Cdx2 ist für eine Vielzahl von Genen im gesamten Darm ein wichtiger Transkriptionsfaktor und wird mitverantwortlich für die unterschiedliche Differenzierung des Epithels in unterschiedlichen Teilen des Darmes gemacht [74]. Der LI-Cadherin-Promoter besitzt Cdx2-response-Elemente. In Zellkulturexperimenten konnte eine Induktion der LI-Cadherin Expression durch Cdx2 erreicht werden [75].

Umgekehrt konnte kürzlich durch eine Blockade von Cdx2 und den Hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1 α), für den es ebenfalls Bindungsstellen im LI-Cadherin-Promoter gibt, mit Hilfe von small interfering RNA (siRNA) eine Herunterregulation von LI-Cadherin erreicht werden [76].

1.4.1 LI-Cadherin als Biomarker bei Krebserkrankungen

Neben der physiologischen Expression im menschlichen Darm konnte 2001 erstmals eine ektope Expression von LI-Cadherin in Magenkarzinomen vom intestinalen Typ gezeigt werden. Zusätzlich zeigte sich bereits in der präkanzerösen Vorstufe solcher Karzinome, der intestinalen Metaplasie, eine starke Expression von LI-Cadherin. In diesem Kontext wurde LI-Cadherin erstmals als möglicher Staging-Biomarker und als potentieller zellulärer Screening-Marker vorgeschlagen [77]. Im duktalem Adenokarzinom des Pankreas konnte ebenfalls eine ektope LI-Cadherin Expression demonstriert werden. In einer Studie mit 101 Patienten korrelierte der Grad der LI-Cadherin-Expression positiv mit der Differenzierung der Tumore und dem Überleben der Patienten. Die Autoren sahen das Potential eines möglichen prognostischen Biomarkers [78]. Auch im HCC wurde in einer Kohorte von 18 Patienten eine cytoplasmatische Expression von LI-Cadherin bei 15 Patienten immunhistochemisch nachgewiesen und LI-Cadherin als Staging-Marker vorgeschlagen [79]. Kürzlich konnte erstmals eine ektope LI-Cadherin-Expression in Cholangiokarzinomen und intraepithelialen Gallengangläsionen bei an Cholangiokarzinomen erkrankten Patienten festgestellt werden [80].

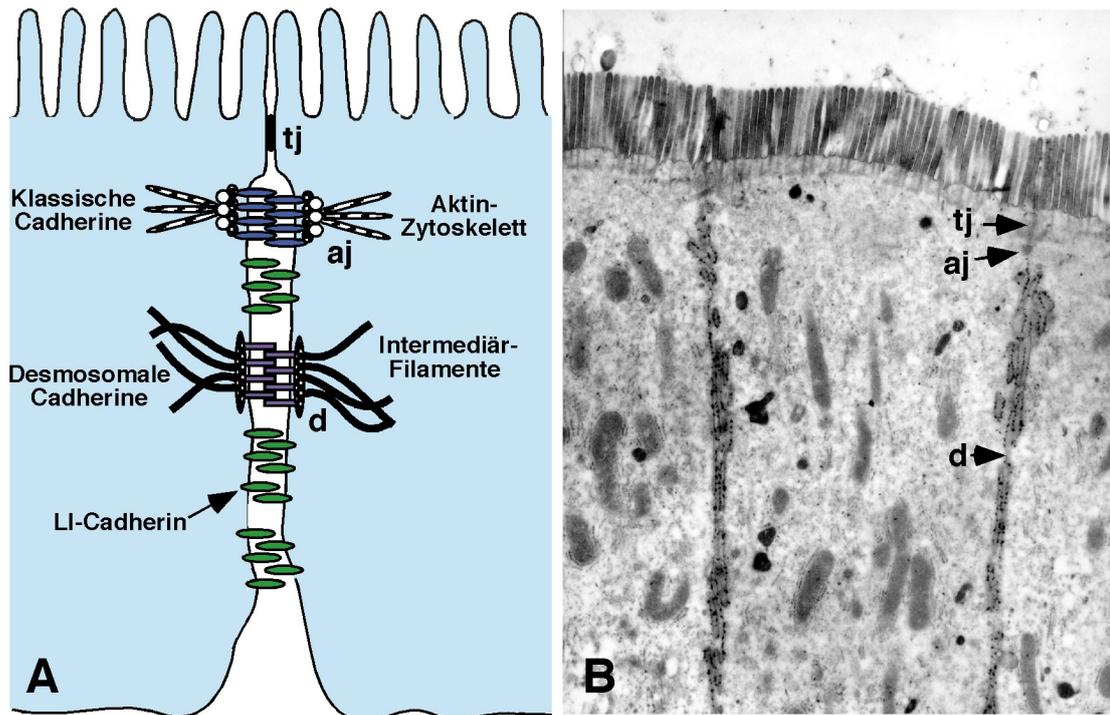


Abbildung 3: Schematische Darstellung (A) und elektronenmikroskopische Aufnahme (B) von benachbarten Enterozyten mit Immunogoldpartikel markiertem LI-Cadherin. LI-Cadherin findet sich an den lateralen Zellmembranen mit Ausnahme der adherens junctions (aj), tight junctions (tj) und Desmosomen. Aus [81].

Bezüglich der Korrelation der LI-Cadherin-Expression und einer möglichen Fernmetastasierung ist die Datenlage widersprüchlich: zwei Arbeitsgruppen konnten eine Korrelation zwischen verminderter LI-Cadherin-Expression und vermehrter Lymphknotenmetastasierung ausmachen, einmal bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen [82] und in einer anderen Arbeit bei Patienten mit Magenkarzinomen [83]. Im Gegensatz dazu stellte eine andere Arbeitsgruppe bei Patienten mit Magenkarzinomen eine positive Korrelation zwischen einer Überexpression von LI-Cadherin und gesteigerter Lymphknotenmetastasierung fest [84]. In der intestinalen Metaplasie und im Magenkarzinom zeigte sich weiterhin eine starke ektope Co-Expression der sonst nur im Darm exprimierten Proteine Cdx2 und LI-Cadherin [85].

Die Expression von LI-Cadherin in unterschiedlichen Stadien von kolorektalen Karzinomen und insbesondere in Fernmetastasen ist somit noch nicht eindeutig geklärt. Ebenso fehlen systematische Analysen zur Expression von LI-Cadherin in primären Leber- und Lungentumoren.

1.5 Fragestellung

Das mit LI-Cadherin an intestinalen Epithelien co-exprimierte, aber nicht co-lokalisierte E-Cadherin zeigt in fortgeschrittenen Stadien kolorektaler Karzinome eine deutlich verminderte Expression. Für LI-Cadherin konnte in einer Arbeit beim kolorektalen Karzinom eine Korrelation von verminderter Expression im Primärtumor und erhöhter Lymphknotenmetastasierung beobachtet werden.

Daher stellt sich die Frage:

Ist die Expression von LI-Cadherin in fortgeschrittenen Stadien des kolorektalen Karzinoms und in kolorektalen Fernmetastasen vermindert?

Während für das hepatozelluläre Karzinom eine eindeutige Expression von LI-Cadherin gezeigt werden konnte und LI-Cadherin als Staging-Biomarker vorgeschlagen wurde, ist die Datenlage zur ektope LI-Cadherin Expression im Cholangiokarzinom dünn. In intraepithelialen Gallengangläsionen von Patienten mit Cholangiokarzinomen konnte eine Expression von LI-Cadherin immunhistochemisch nachgewiesen werden. In dieser Arbeit soll nun in unterschiedlichen Entitäten von Cholangiokarzinomen systematisch die Fragen beantwortet werden:

Gibt es eine ektope Expression von LI-Cadherin in Cholangiokarzinomen?

Gibt es Potential für LI-Cadherin als Biomarker in Cholangiokarzinomen?

Die histopathologische Differentialdiagnose kolorektaler Fernmetastasen von Primärtumoren ist insbesondere in der Lunge nicht immer trivial. In der Leber ist zu vermuten, dass eine verminderte Expression von LI-Cadherin in kolorektalen Fernmetastasen bei der vorbeschriebenen Expression im hepatozellulären Karzinom Potenzial für die Diskriminierung dieser Tumorentitäten birgt. Gleiches soll in Lungenkarzinomen und kolorektalen Lungenmetastasen untersucht werden.

Kann LI-Cadherin als zellulärer Staging-Marker zur Diskriminierung kolorektaler Leber- und Lungenmetastasen und Primärtumore in Leber und Lunge eingesetzt werden?

Das Kaudale-Homeoboxprotein-2 (Cdx2) wurde in mehreren Arbeiten als notwendiger Transkriptionsfaktor für eine LI-Cadherin Expression postuliert. Demzufolge ist auch bei ektopter Expression von LI-Cadherin eine Co-Expression von LI-Cadherin zu erwarten. Diese Hypothese soll bestätigt werden.

Werden LI-Cadherin und Cdx2 immer co-exprimiert?

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Gewebeproben

Ein Teil der Gewebeproben wurden als Kryogewebeproben (fresh frozen samples) aus der Klinik für Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie am Campus Virchow-Klinikum der Charité, Universitätsmedizin Berlin, zur Western Blot Analyse zur Verfügung gestellt. Kryogewebeproben wurden postoperativ in flüssigem Stickstoff gefroren und dann bei -80° C gelagert.

Zur immunhistochemischen Analyse wurde ein Teil der Proben aus der Probensammlung des Instituts für Pathologie des Campus Charité Mitte, Charite, Universitätsmedizin Berlin, als formalinfixiertes, paraffineingebettetes Gewebe in Form von Paraffinblöcken zur Verfügung gestellt.

Schließlich wurden Proben zur immunhistochemischen Analyse in Form von tissue-micro-arrays (TMAs) von der Firma Oligene GmbH, Berlin, beschafft. Analog zu der 1986 erstmals beschriebenen und 1998 verbesserten Methode von Battifora [86, 87] wurden aus formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeproben unterschiedlicher Tumore aus den Archiven des Instituts für Pathologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, bis zu 86 repräsentative Stanzzyylinder mit einem Durchmesser von 1,5 - 2 mm und einer Schichtdicke von 4 µm auf einen Objektträger gesetzt. Die Diagnosen der einzelnen Proben sowie klinische Angaben wurden histopathologisch gesichert und vom Hersteller bereitgestellt.

Während die meisten Patientenproben zufällig ausgewählt wurden, handelte es sich bei zwei Kollektiven zu Klatskin-Tumoren bzw. intrahepatischen Cholangiokarzinomen um gezielt ausgewählte und bereits zuvor beschriebene Kollektive.

Von allen Patienten lag ein schriftliches Einverständnis zur wissenschaftlichen Verwendung der Proben vor.

Im Folgenden werden die Details der Proben an Hand der untersuchten Tumorentitäten aufgeführt.

2.1.1 Proben aus Dünndarm, Dickdarm, Kolonadenome, kolorektalen Karzinomen und deren Fernmetastasen

Kryogewebe von 9 Patienten mit gesichertem kolorektalen Karzinom und von einem Patienten mit krebsfreier Resektion zur Positivkontrolle wurde zur Western Blot Analyse aus der Klinik für Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie am Campus Virchow-Klinikum der Charité, Universitätsmedizin Berlin, zur Verfügung gestellt.

Normales Dünndarmgewebe eines Patienten sowie normales Dickdarmgewebe von 16 Patienten, Gewebe von 15 Patienten mit tubulovillösen Adenomen des Kolons und Gewebe von 76 Patienten mit primären kolorektalen Karzinomen wurde in Form von TMAs von der Firma Oligene bezogen. Von allen Patienten mit kolorektalen Karzinomen waren Alter und Geschlecht sowie das UICC-Stadium der Tumore bekannt.

Gewebeprobe von 15 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen und von 4 Patienten mit kolorektalen Lungenmetastasen wurden ebenfalls in Form von TMAs bezogen. Von 4 Patienten mit Lebermetastasen lag Gewebe des Primärtumors vor. Zusätzlich wurden von 13 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen und von 14 Patienten mit kolorektalen Lungenmetastasen Paraffinblöcke aus dem Institut für Pathologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin erhalten. Auch bei diesen Patienten waren Alter und Geschlecht bekannt (Tabellen 3 und 4).

	Normale Kolonmucosa	Kolorektale Adenome
Gesamtzahl	16	15
Alter (Median)	65	67
(Von-Bis)	(43-89)	(28-79)
Männlich:Weiblich	9:7	9:6

Tabelle 3: Alter und Geschlechterverteilung formalinfixierter, paraffineingebetteter Proben der Patienten mit normalen Kolongewebeprobe und kolorektalen Adenomen.

	Kolorektale Karzi- nome	Kolorektale Le- bermetastasen	Kolorektale Lungenmetasta- sen
Gesamtzahl	76	28	18
Medianes Alter (Von-Bis)	72 (36-96)	61 (36-86)	65 (56-76)
Männlich:Weiblich	30:46	16:12	10:8
UICC I	14	--	--
UICC II	17	--	--
UICC III	31	--	--
UICC IV	14	28	18

Tabelle 4: Alter und Geschlechtsverteilung formalinfixierter, paraffineingebetteter Proben der Patienten mit primären kolorektalen Karzinomen, kolorektalen Lebermetastasen und kolorektalen Lungenmetastasen.

2.1.2 Lebergewebe und hepatozelluläre Karzinome

Kryogewebe von 10 Patienten mit gesichertem hepatozellulärem Karzinom wurde zur Western Blot Analyse von der Gewebebank der Klinik für Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie am Campus Virchow-Klinikum der Charité, Universitätsmedizin Berlin, zur Verfügung gestellt.

Von 21 Patienten wurden Paraffinblöcke mit gesichertem hepatozellulärem Karzinom zur immunhistochemischen Analyse aus dem Institut für Pathologie der Charité erhalten. Die Probe eines Patienten mit hepatozellulärem Karzinom sowie Gewebe von 22 Patienten mit nicht kanzerösem Leberbefund wurde als TMA von der Firma Oligene bezogen. Alter und Geschlecht der Patienten sowie der Differenzierungsgrad der Karzinome lagen vor (Tabelle 5).

	Lebergewebe	Hepatozelluläre Karzinome
Gesamtzahl	22	22
Medianes Alter (Von-Bis)	66 (35-83)	61 (33-75)
Männlich:Weiblich	13:9	10:12
G1		7
G2		9
G3		6

Tabelle 5: Alter und Geschlechterverteilung formalinfixierter, paraffineingebetteter Proben der Patienten mit normalem Lebergewebe und hepatozellulären Karzinomen.

2.1.3 Cholangiokarzinome

Von 54 Patienten wurde Gewebe in Form von TMAs von der Firma Oligene bezogen. Alter und Geschlecht der Patienten lagen vor (Tabelle 6).

	Lebergewebe	Cholangiokarzinome (TMA)
Gesamtzahl	22	54
Medianes Alter (Von-Bis)	66 (35-83)	61 (35-83)
Männlich:Weiblich	13:9	29:25

Tabelle 6: Alter und Geschlechtsverteilung formalinfixierter, paraffineingebetteter Proben von Patienten mit gesundem Lebergewebe und Cholangiokarzinomen.

Zur weiteren Untersuchung wurde ein Kollektiv von 60 Patienten mit gesichertem Cholangiokarzinomen der Hepatikusgabel (Klatskin-Tumore) aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Charité herausgesucht. Diese Patienten wurden zwischen Januar 1996 und Dezember 2002 in kurativer Intention ohne vorangegangene neoadjuvante Chemotherapie in der Klinik für Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie am Campus Virchow-Klinikum der Charité operiert. Keiner der Patienten starb im postoperativen Verlauf. Von den 60 Patienten wurden 22 (36%) mit einer rechtsseitigen Trisektorektomie mit Vena portae Resektion versorgt, 16 (27%) mit einer anatomischen oder erweiterten rechtsseitigen Hemihepatektomie mit oder ohne V. portae Resektion,

18 (30%) mit einer anatomischen oder erweiterten linksseitigen Hemihepatektomie mit oder ohne V. portae Resektion und 4 (7%) mit einer hilären Resektion. Alle Patienten hatten bei Diagnosestellung einen nicht über die Organgrenzen hinaus infiltrierenden Tumor und keine Fernmetastasen. Das mediane follow-up lag bei 28 Monaten (3-107 Monate). Bei 32 der 60 Patienten traten im Verlauf Rezidive auf und 31 Patienten starben während der follow-up Periode an Ihrem Tumorrezidiv. Bei 27 Patienten lag ein Lokalrezidiv oder eine Peritonealkarzinose vor, während bei 5 Patienten Fernmetastasen diagnostiziert wurden. Bei 9 Patienten mit Lokalrezidiv lagen zusätzlich Fernmetastasen vor. Die klinischen Charakteristika dieses Patientenkollektivs inklusive Gesamtüberleben und krankheitsfreiem Überleben wurden an anderer Stelle bereits beschrieben [88] und sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Ein weiteres Kollektiv bestand aus einer Auswahl von Patienten mit gesicherten intrahepatischen Cholangiokarzinomen. Das zugehörige Gesamtkollektiv wurde ebenfalls zuvor beschrieben [89]. Die Proben der Patienten dieses Kollektivs wurden aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Charité, Berlin, herausgesucht. Von den 110 Patienten wurden 88 (80%) in der Klinik für Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie am Campus Virchow-Klinikum der Charité mittels Hemihepatektomie, erweiterter Hemihepatektomie oder Trisektorektomie und 22 (20%) mit atypischen Leberteil- und Segmentresektionen operativ versorgt. Bei 69 (63%) Patienten lag eine R0 Resektion vor, während bei 41 (37%) die Resektionsränder mikroskopisch oder makroskopisch nicht tumorfrei waren und somit hier nicht von einer kurativen Resektion ausgegangen werden konnte. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Klatskin Tumore	
Gesamtzahl	60
Alter (Median)	61,5
(von-bis)	(42-80)
Männlich:Weiblich	30:30
Infiltrationsgrad	
T2	21 (35%)
T3	39 (65%)
Lymknotenbefall	
N0	36 (60%)
N1/2	24 (40%)
Differenzierungsgrad	
G1	7 (12%)
G2	39 (65%)
G3	14 (23%)
Zahl der Rezidive	32 (53,3%)
Gesamtüberleben (OS) in%	
1-Jahr	75,9%
3-Jahre	49,9%
5-Jahre	31,9%
Krankheitsfreies Überleben (DFS) in %	
1-Jahr	64,2%
3-Jahre	36,4%
5-Jahre	30,3%

Tabelle 7: Patientencharakteristika der Patienten mit Klatskin-Tumoren.

Intrahepatisches Cholangiokarzinome	
Gesamtzahl	110
Alter (Median)	61
(von-bis)	(36-81)
Männlich:Weiblich	48:62
Infiltrationsgrad	
T1	60 (55%)
T2	43 (39%)
T3	7 (6%)
T4	0 (0%)
Lymphknotenbefall	
N0	61 (55%)
N1/2	49 (45%)
Differenzierungsgrad	
G1	2 (2%)
G2	75 (68%)
G3	33 (30%)
Resektionsränder	
R0	69 (63%)
R1	30 (27%)
R2	11 (10%)
Zahl der Rezidive	69 (63%)
Gesamtüberleben (OS) in%	
1-Jahr	54,8%
3-Jahre	23,3%
5-Jahre	16,4%
Krankheitsfreies Überleben (DFS) in %	
1-Jahr	43,3%
3-Jahre	20,6%
5-Jahre	18,3%

Tabelle 8: Patientencharakteristika der Patienten mit intrahepatischen Cholangiokarzinomen

2.1.4 Lungenwebe und Lungenkarzinome

Gewebeproben von 54 Patienten mit Lungenkarzinomen wurde in Form eines TMAs von der Firma Oligene bezogen. Hierbei handelte es sich um Proben von 27 Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge, 22 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Lunge und 4 Patienten mit kleinzelligen Karzinomen der Lunge. Zusätzlich waren von 3 Patienten gesunde Vergleichsproben auf dem TMA. Alter und Geschlecht der Patienten sowie Tumorformel und Differenzierungsgrad der Karzinome waren bekannt. Keines der untersuchten Karzinome hatte Fernmetastasen aufzuweisen.

	Gesundes Lungengewebe	SCLC	PEC	Adenokarzi- nom
Gesamtzahl	3	4	22	27
Alter (Median)	70	60	62	62
(von-bis)	(46-70)	(53-65)	(49-76)	(35-77)
Männlich:Weiblich	2:1	4:0	18:4	19:8
Infiltrationsgrad				
T1		2	1	6
T2		2	18	18
T3		0	2	3
T4		0	1	0
Lymphknotenbefall				
N0		2	15	13
N1/2		1	7	13
Differenzierungsgrad				
G1		--	0	1
G2		--	15	11
G3		--	7	15

Tabelle 9: Übersicht und Verteilung der Patientencharakteristika der Patienten mit Lungenkarzinomen, SCLC: kleinzelliges Lungenkarzinom, PEC: Plattenepithelkarzinom.

2.2 Materialien

2.2.1 Tissue-Microarrays

- Human Tissue Microarray Colon UICC (Lot 051P270504.06-07)
- Human Tissue Microarray Colon Carcinoma (Lot 015P170703.25-26)
- Human Tissue Microarray Lung Carcinoma (Lot 019P170703.17)
- Human Tissue Microarray Cholangiocarcinoma (Lot 037P220104.08)

Alle Tissue Microarrays (TMA) wurden von Oligene, Berlin bezogen.

2.2.2 Antikörper

- Polyklonaler Kaninchen-anti-hLI-Cadherin Antikörper K2101 (Wendeler, 2003, [81])
- Polyklonaler Ziege-anti-hLI-Cadherin Antikörper SC 6978 (Santa Cruz, USA)

Beide Antikörper waren gegen die zytoplasmatische Domäne des humanen LI-Cadherins gerichtet

- Monoklonaler Maus-anti-hCdx2 Antikörper Mu392UC (BioGenex, USA)
- Polyklonaler Schwein-anti-Kaninchen Antikörper, HRP konjugiert (Dako, Hamburg)
- Polyklonaler Kaninchen-anti-Ziege Antikörper, HRP konjugiert (Dako, Hamburg)
- Polyklonaler MultiLink Antikörper (Schwein-anti-Kaninchen Schwein-anti-Maus, Schwein-anti-Ziege), Biotin konjugiert (Dako, Hamburg)

2.2.3 Verbrauchsmaterialien und Puffer

- Acrylamid , RotiphoreseR Gel 30, 30% Acrylamid (Roth, Karlsruhe)
- Ammoniumpersulfat (APS, Sigma, Taufkirchen)
- BioMax-Film (Eastmann-Kodak, Rochester, NY, USA)
- Bovines Serum Albumin (BSA, Sigma, Taufkirchen)
- Citratpuffer: 1,8 % (v/v) 0,1 mM Citronensäure; 8,2 % (v/v) 0,1 M Natriumcitrat; pH 6
- Coomassie Brilliant Blue R250 (BioRad, München)
- Coomassie Färbelösung: 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,025 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue 250
- Filterpapier Whatmann ® 3MM (Whatmann International Ltd, Maidstone, GB)
- Hybond-P-Membran, PVDF-Membran (Amersham Biosciences, USA)

- Lämmli-Puffer: 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 3% (w/v) SDS; 5% (w/v) 2-Mercaptoethanol; 10% (w/v) Glycerin, 0,025 mg/ml Bromphenolblau
- Mayers Hämalaun (Sigma, Taufkirchen)
- PBS (phosphate buffered saline): 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,4 mM KH₂PO₄; 4,3 mM Na₂HPO₄*7H₂O; pH 7,4
- Ponceau S (Sigma, Taufkirchen)
- Proteinase Inhibitor Cocktail, PIC (Roche, Mannheim)
- Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4% SDS
- SDS-7B Molekulargewichtstandard (Sigma, Taufkirchen)
- SDS-Laufpuffer: 0,3 % (w/v) Tris/HCl pH 8,8; 1,44 % (w/v) Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
- TBS (tris buffered saline): 25 mM Tris/HCl pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl
- TBS-T (tris-buffered-saline-Tween): 25 mM Tris/HCl pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,05 % Tween 20
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin, BioRad, München)
- Trenngelpuffer (4x): 1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS
- Triton X-100 (Sigma, Taufkirchen)
- Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat, Sigma Taufkirchen)

Alle anderen Standardlaborchemikalien wurden von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

Kits:

- BCA Protein Assay Reagents (Pierce, Weisskirchen)
- ECL plus Western Blotting detection Kit (Amersham Biosciences, USA)
- Biotin Blockierungssystem X0590 (DakoCytomation, Hamburg)
- LSAB Kit K0679 (DakoCytomation, Hamburg)

2.2.4 Geräte

- Brutschrank B 6060 (Heraeus-Christ, Hanau)
- Einmalskalpell (Braun Melsungen)
- Douncer 2 ml (Braun, Melsungen)
- Lichtmikroskop (Carl-Zeiss, Jena)

- Multiplate Reader (Dynatech, Guernsey, UK)
- Mini-Protean II Kammer (BioRad, München)
- Mini-Trans-Blot (BioRad, München)
- Objektträger, beschichtet (S2024, Dako, Hamburg)
- Tischzentrifuge 5402, temperierbar (Eppendorf, Hamburg)
- Thermostat plus (Eppendorf, Hamburg)
- Schlittenmikrotom (Leica, Wetzlar)
- Ultra-Tiefkühltruhe U54285 (New Brunswick Scientific, Labotec Göttingen)

2.3 Methoden

Die LI-Cadherin Expression in den unterschiedlichen Gewebeproben wurde mittels Western Blot und Immunhistochemie analysiert. Beide Methoden werden im Folgenden beschrieben.

2.3.1 Herstellung von Gewebelysaten

Gewebelysate zur Western Blot Analyse wurden analog der von Wendeler beschriebenen Methode angefertigt [81]. Die bei -80°C gelagerten Kryogewebsproben wurden in gefrorenem Zustand mit einem Einmalskalpell zerkleinert. In einem 2 ml Douncer wurden 1 ml PBS mit 0,1% Triton X-100 mit PIC (Roche, Mannheim) vorgelegt. Es wurden etwa 80 mg des zerkleinerten Tumorgewebes überführt und aufgeschlossen. Die Lysate wurden dann bei 4°C und $12.000 \times g$ über 25 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und standen für die weitere Verarbeitung zur Verfügung. War eine weitere Verarbeitung nicht unverzüglich möglich, so wurden die aliquotierten Proteinlysate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assays

Um gleiche Mengen an Proteinen von unterschiedlichen Proben mittels SDS-PAGE zu analysieren, wurden die Konzentration der Proteine in den Organlysaten mit Hilfe der Bicinchoninsäuremethode (BCA) ermittelt [90]. Bei dieser Methode macht man sich zu Nutze, dass Proteine in saurem Milieu Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen reduzieren. Letztere

bilden mit Bicinchon einen violetten Komplex. Die Menge dieses Farbstoffkomplexes kann photometrisch bei 570 nm gemessen werden. Die Reagenzien für die Durchführung des Experiments entstammten dem gebrauchsfertigen BCA Protein Assay Kit (Pierce, Weisskirchen). Die Reaktion fand in Mikrotiterplatten statt. Zu 10 µl des Proteinlysates wurden 200 µl des BCA Reagens pipettiert. Die Ansätze wurden anschließend für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Hilfe einer Kalibrierungsgeraden ermittelt. Letztere wurde durch paralleles Pipettieren von im Kit enthaltenen BSA-Standards erstellt. Das Auslesen der Mikrotiterplatte erfolgte photometrisch in einem Multiplate Reader (Dynatech, Guernsey, UK).

2.3.3 SDS-PAGE

Die in den Organlysaten enthaltenen Proteine wurden an Hand ihres relativen Molekulargewichts mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt [91]. Die Natrium-Dodecylsulfat (SDS) Moleküle besetzen dabei die Proteine proportional zur Anzahl ihrer Aminosäuren mit negativen Ladungen, so dass in einem elektrischen Feld die Auftrennung nach Ladung und letztendlich nach Größe der Proteine erfolgen kann. Die Auftrennung erfolgte mit Polyacrylamid-Sammelgelen von 4,5% und Trenngelen von 7,5% in einer Mini-Protean II Kammer (BioRad, München) mit den Maßen 80 mm x 55 mm x 0,75 mm (Breite x Höhe x Tiefe).

	4,5 % Sammelgel	7,5 % Trenngel
30% Polyacrylamid	0,375 ml	1,25 ml
4x Sammelgelpuffer	0,625 ml	---
4x Trenngelpuffer	---	1,25 ml
TEMED	1,5 µl	3 µl
30% APS	5 µl	10 µl
ddH₂O	ad 3 ml	ad 5 ml

Tabelle 10: Pipettierschema für Trenn- und Sammelgele zur SDS-PAGE

Die Proben wurden mit 4fach-konzentriertem Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min auf 96°C erhitzt. Danach erfolgte das Auftragen der Proben in die durch einen Kunststoffkamm (12 Zacken) im Sammelgel vorgegebenen Taschen, welche zuvor mit SDS-Laufpuffer gespült wurden. Die erste Tasche des Gels wurde dabei mit einem Moleku-

largewichtstandard (Sigma, Taufkirchen) beladen. Das Probenvolumen betrug pro Tasche maximal 15 µl. Die Elektrophoresekammer wurde ebenfalls mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte initial mit einer Stromstärke von 15 mA und nach Erreichen des Trenngels durch die Proben mit 20-25 mA für ca. 75 Minuten. Dabei war auf eine Höchstspannung von 250 Volt zu achten.

Zum Nachweis der erfolgreichen SDS-PAGE konnten die Proteinbanden mittels Coomassiefärbung sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde dazu in Coomassie-Färbelösung 10 Minuten auf einem Schüttler gefärbt. Anschließend wurde das Gel in einer Entfärbelösung (50% (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) behandelt, bis die Banden im Gel klar zu erkennen waren. Ein Erhitzen in der Mikrowelle und ein Kunststoffschwamm im Entfärber beschleunigten den Entfärbeprozess.

2.3.4 Übertragen von Proteinen auf eine PVDF-Membran

Vom ungefärbten und unfixierten Gel erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Hybond-P-Membran, Amersham, Freiburg) analog der von Towbin et al. und Rennert et al. beschriebenen Methoden [92, 93]. Dazu wurde das „Blotsandwich“ wie in Abbildung 4 schematisch gezeigt aufgebaut.

Vor Aufbau des Blotsandwichs erfolgte die Aktivierung der PVDF-Membran in Methanol. Der Proteintransfer fand in einer Mini Trans Blot Apparatur (BioRad, München) statt. Das Blotsandwich wurde dazu an beiden Seiten durch kleine Kunststoffschwämme stabilisiert. Für den Proteintransfer wurden 1,2 mA pro Quadratcentimeter zu übertragende Fläche angelegt, in der Regel 65 mA für 90 Minuten.

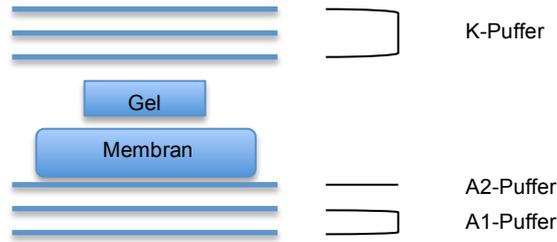


Abbildung 4: Aufbau des „Blotsandwich“, die Linien zeigen die in den jeweiligen Puffern getränkten Filterpapierlagen. K-Puffer: 25 mM Tris, 40 mM 6 Amino-n-caproische Säure, 10% (v/v) Methanol; A1 Puffer: 300 mM Tris, 10% (v/v) Methanol, A2 Puffer: 25 mM Tris, 10% (v/v) Methanol.

Durch die Ponceau-Färbung konnten die auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine reversibel sichtbar gemacht werden. Dazu wurde die Membran maximal eine Minute in Ponceau S geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen der Membran in dH_2O über jeweils 5 Minuten auf einem Schüttler verschwand die Hintergrundfärbung und die gefärbten Banden wurden sichtbar. Die Banden des Molekulargewichtsstandards konnten nun mit einem Stift eingezeichnet werden. Durch dreimaliges Waschen der Membran in TBS wurde die Ponceau-Färbung rückgängig gemacht.

2.3.4 Immundetektion von LI-Cadherin mittels Western Blot

Die auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine wurden durch eine enzymgekoppelte Antikörperreaktion sichtbar gemacht [92, 93]. Die Membranen wurden zunächst mit einem spezifisch gegen LI-Cadherin gerichteten Antikörper inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit einem Sekundärantikörper aus einer anderen Spezies, der gegen den Primärantikörper gerichtet war und mit Meerrettichperoxidase (HRP – horse radish peroxidase) konjugiert war. Durch Umsetzung eines luminiszierenden Substrates an der Stelle der Bindung des Sekundärantikörpers durch die Peroxidase kam es zu einer Lichtemission die auf einem Röntgenfilm detektiert werden konnte (Abbildung 5). Die Hinzunahme eines HRP-konjugierten Antikörpers sparte das direkte Konjugieren der Primärantikörper mit HRP und sorgte zusätzlich für eine geringe Signalverstärkung.

Die Immundetektion wurde mit dem ECL-plus Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) analog des Herstellerprotokolls durchgeführt. Zunächst wurde die PVDF-Membran nach dem Proteintransfer vom Gel 30 Minuten im Trockenschrank bei 37°C getrocknet. Dann wurde die Membran für eine Stunde in

Blockpuffer (5% Magermilchpulver in TBS-T) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Wie alle folgenden Inkubations- und Waschschr tte erfolgte auch das Blocken der Membran auf einem Schüttler. Danach wurde die Membran zweimal in TBS-T gespült. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-hLI-Cadherin K2101 und anti-hLI-Cadherin SC 6974, Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg) für eine Stunde (Verdünnungen siehe Tabelle 11). Nach zweimaligem Spülen mit TBS-T wurde die Membran einmalig in TBS-T für 15 Minuten und im Anschluss zweimal 5 Minuten gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit einem Sekundärantikörper für eine Stunde. Die Spül- und Waschschr tte wurden wie nach Inkubation mit dem Primärantikörper wiederholt. Die ECL-plus Detektions-Lösung wurde im Verhältnis 40:1 aus den mitgelieferten Komponenten A und B hergestellt und die Membran wurde 5 Minuten mit ihr inkubiert (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Nach Abtropfen der ECL-plus Reagenz erfolgte das Einkleben der Membran in eine Filmkassette. Der in der Dunkelkammer eingelegte Röntgenfilm wurde für 30 Sekunden bis maximal 10 Minuten belichtet und anschließend entwickelt.

Antikörper	Verdünnung
Anti-h-LI-Cadherin K2101	1:10.000
Anti-hLI-Cadherin SC 6978	1:1.000
Schwein-anti-Kaninchen, HRP konjugiert	1:10.000
Kaninchen-anti-Ziege, HRP konjugiert	1:10.000

Tabelle 11: Antikörperverdünnungen der im Western Blot eingesetzten Antikörper

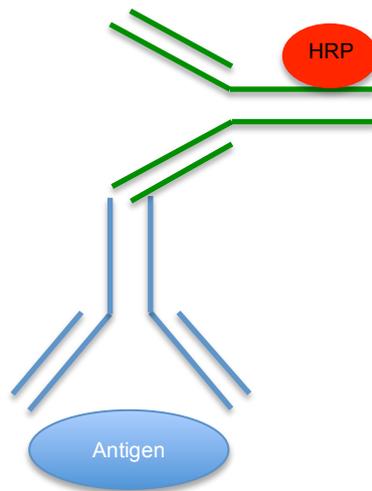


Abbildung 5: Schema der Antikörperbindung im Westernblot. Der Primärantikörper (blau) bindet das Antigen. Der Sekundärantikörper (grün) bindet an den Primärantikörper und ist mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert. HRP: Meerrettichperoxidase.

Zum Vergleich der Sensitivität der beiden gegen die cytoplasmatische Domäne des humanen LI-Cadherin gerichteten Antikörper wurden definierte Gesamtproteinmengen einer Positivkontrollen (Dickdarmgewebe) mittels Western Blot analysiert. Es wurden 10 µg, 1 µg und 0,1 µg Gesamtprotein aus Dickdarmgewebe elektropheretisch aufgetrennt und mittels der angegebenen Antikörperverdünnungen untersucht.

Desweiteren wurden alle Kryogewebeproben von kolorektalen Karzinomen und hepatozellulären Karzinomen qualitativ auf die Expression von LI-Cadherin mit dem sensitiveren der beiden Antikörper untersucht.

2.3.5 Immunhistochemie

Wie beim Western Blot werden auch bei der Immunhistochemie Proteine mittels eines spezifisch bindenden Antikörpers visualisiert. Dies geschieht jedoch am histologischen Präparat, wodurch die genaue Lokalisation von Proteinen im Gewebe möglich ist und bestimmte Proteine bestimmten Zellen zugeordnet werden können. Ähnlich der unter 2.3.5 beschriebenen Methode wird auch bei der Immunhistochemie ein Sekundärantikörper aus einer anderen Spezies eingesetzt. Dieser ist jedoch in dem hier angewendeten Protokoll nicht mit HRP konjugiert, sondern mit Biotin (Vitamin B7). Biotin wiederum hat eine hohe Affinität zu Streptavidin. Letzteres kann bis zu vier Biotinmoleküle binden. Hierdurch kommt es zu einer Signalverstärkung. Das eingesetzte Streptavidin ist mit

einer Meerrettichperoxidase konjugiert. Durch Umsetzung eines Chromogens, in diesem Fall 3,3'-Diaminobenzidin kommt es zu einer bräunlichen Färbung an den Orten des gebundenen und HRP-konjugierten Streptavidins (Abbildung 6). Diese immunhistochemische Methode wird auch als „labelled-streptavidin-biotin“-Methode (LSAB) bezeichnet [94]. Die Immunhistochemie wurde in dieser Arbeit zur Detektion von LI-Cadherin in verschiedenen Gewebeproben und zur Evaluation als möglicher zellulärer Biomarker verwendet. Bei der Färbung der Cholangiokarzinomproben war Dr. Corinna Dietel, Universitätsklinikum Leipzig, behilflich.

In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Analyse dargelegt.

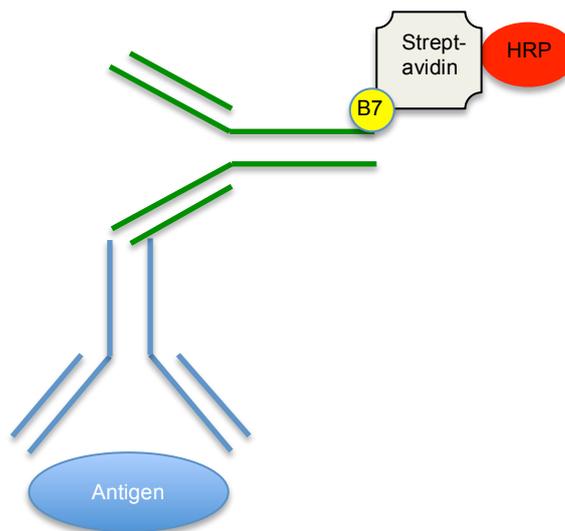


Abbildung 6: Schema der LSAB- Methode in der Immunhistochemie: an ein Antigen bindet ein Primärantikörper (blau), daran wiederum bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper (grün). Das Biotin wird nun von HRP konjugiertem Streptavidin gebunden. B7: Biotin (Vitamin B7), HRP: Meerrettichperoxidase.

2.3.6 Probenvorbereitung

Schneiden

Von den als Paraffinblöcken vorliegenden Proben wurden zunächst histologische Schnitte angefertigt. Dazu wurde der Paraffinblock in ein Schlittenmikrotom eingespannt

und mit einer Einmalklinge in 3 µm dicke Serienschnitte geschnitten. Diese wurden im Wasserbad auf Objektträger (Dako, Hamburg) aufgezogen und über Nacht bei 37° C im Trockenschrank getrocknet. Für eine bessere Haftung bei der Antigendemaskierung war die Anwendung beschichteter Objektträger hilfreich.

Entparaffinieren

Die zu untersuchenden Objektträger wurden in Glasküvetten zweimal 10 Minuten in Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe zweimal 10 Minuten in 100% Ethanol und dann jeweils 10 Minuten in 70% Ethanol, 50% Ethanol und dH₂O entparaffiniert.

Antigendemaskierung

Unter der Vorstellung einer Quervernetzung von Proteinen im Zuge der Fixierung von Geweben mit Formalin wurde vor Applikation der Antikörper eine Antigendemaskierung in einer Mikrowelle in einem Citratpuffer (pH 6) durchgeführt [95, 96]. Zunächst wurden 200 ml des Citratpuffers 2 Minuten ohne Objektträger bei 600 Watt im Mikrowellenofen erhitzt. Dann wurden die Objektträger im vorgewärmten Puffer (200 ml) zweimal 5 Minuten bei 600 Watt erhitzt. Zwischendurch wurde verdampfter Citratpuffer nachgefüllt. Anschließend wurden die Objektträger zunächst 10 Minuten im Puffer belassen, bevor sie vor der weiteren Bearbeitung mindestens 10 Minuten in dH₂O lagen.

2.3.7 Block-Schritte

Endogene Peroxidasen

Um eine spezifischere Färbung zu erreichen, wurden endogene Peroxidasen mit H₂O₂ in 3% Methanol für 5 Minuten geblockt. Die Reagenz dafür war im angewendeten LSAB-Kit (Dako, Hamburg) enthalten. Dieser Schritt verhinderte, dass es bei der Umsetzung des Substrates im letzten Schritt des Färbeprotokolls durch die an Streptavidin gebundene HRP zu unspezifischen Färbungen durch im Gewebe möglicherweise noch aktive endogene Peroxidasen kam. Nach Behandlung mit der Reagenz wurden die Objektträger mit den Gewebeproben 5 Minuten in TBS gewaschen.

Endogenes Biotin und Biotinblock

Einige Gewebe, zum Beispiel Lebergewebe, sind reich an Biotin. Dies führt in der angewendeten LSAB-Methode oft zu falsch-positiven Ergebnissen durch eine unspezifische Färbung im Zytoplasma der Zellen. Das zur Signalverstärkung eingesetzte Streptavidin bindet nicht nur an das Biotin des Sekundärantikörpers, sondern ubiquitär an im Gewebe verfügbares Biotin. Zur Verringerung solcher Färbeartefakte wurden die Gewebeproben vor Inkubation mit dem Primärantikörper 10 Minuten mit Biotin behandelt. Danach wurden sie mit TBS gespült um anschließend 10 Minuten mit Streptavidin behandelt zu werden. Im Gewebe verfügbares Biotin war nun bereits gebunden. Das überschüssige Streptavidin wurde zunächst mit TBS abgespült. Anschließend erfolgt ein Waschriff über 10 Minuten in TBS. Zum Vergleich der Hintergrundfärbung wurden die HCC Proben mit und ohne Biotinblockschrift gefärbt [97].

Unspezifische Bindungen

Ähnlich dem Western Blot Protokoll wurden unspezifische Bindungen mittels einer 15 minütigen Inkubation in TBS mit 1% BSA durchgeführt. Anschließend wurden die Proben einmalig in TBS gespült und 5 Minuten in TBS gewaschen.

2.3.8 Applikation der Antikörper

Die Primärantikörper wurden in TBS mit 1% BSA wie in Tabelle beschrieben verdünnt. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Proben jeweils einmal in TBS gespült und anschließend 5 Minuten in TBS gewaschen. Nach Applikation des Primärantikörpers schloss sich die Anwendung des biotinylierten Multi-Link-Sekundärantikörpers für 20 Minuten an, der sowohl gegen Ziegen-, Maus, als auch Kaninchen-Primärantikörper gerichtet war und unverdünnt entsprechend den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt wurde. Danach kam das HRP-konjugierte Streptavidin (Inkubationszeit 20 Minuten) zum Einsatz. Schließlich wurden die Präparate für maximal 5 Minuten mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu Visualisierung inkubiert. Danach wurden die Proben mit dH₂O ausgiebig gespült.

Antikörper	Verdünnung
Anti-h-LI-Cadherin K2101	1:1.000
Anti-h-LI-Cadherin SC 6978	1:100
Anti-hCdx2 Mu392Uc	1:100

Tabelle 12: Antikörperverdünnungen der Primärantikörper in der Immunhistochemie

2.3.9 Gegenfärbung und Eindeckeln

Die gefärbten Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt und anschließend zunächst mit Leitungswasser gespült und mit dH₂O für 5 Minuten gewaschen. Es erfolgte nun die Bearbeitung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, zweimal 100% Ethanol, zweimal Xylol). Anschließend wurde das glycerolhaltige Eindeckmedium (Shandon Mounting Medium, Gerhard Menzel, Braunschweig) appliziert und die Proben mit einem Deckglässchen versehen. Nach Trocknen des Eindeckmediums über Nacht konnten die Proben ausgewertet werden.

2.3.10 Auswertung

Die Proben wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Carl-Zeiss, Jena) ausgewertet. Proben wurden als positiv aufgefasst, wenn sie eine der Lokalisation der untersuchten Proteine entsprechende Lokalisation im Gewebe aufwiesen: bei LI-Cadherin an den Plasmamembranen, bei Cdx2 im Zellkern. Daneben wurde sowohl die Intensität als auch die Zahl der gefärbten Zellen in einem Gewebeausschnitt bewertet. In 25-facher Vergrößerung wurde zunächst der Ausschnitt mit der größten Färbeintensität herausgesucht. Anschließend erfolgte in 100- und 200facher Vergrößerung die genauere Mikroskopie. Bei fehlender Färbung wurde die Gewebeprobe mit einer „0“ bewertet, bei geringer Färbung (bis 50% der Zellen) mit einer „1“ (niedrige Färbeintensität), bei Färbungen von 50-75% der Zellen mit einer „2“ (mittlere Färbeintensität) und bei 75-100% mit einer „3“ (starke Färbeintensität).

Für die weitere statistische Auswertung werden die Proben mit mittlerer und starker Färbeintensität als „eindeutig positiv“ zusammengefasst. Somit gab es drei Gruppen: „negativ“, „geringe Expression“ und „hohe Expression“.

Die Daten wurden mit Hilfe der Software SPSS ausgewertet. Für kategorische Variablen kam der chi-Quadrat Test und der exakte Test nach Fisher, für kontinuierliche Variablen der Wilcoxon Test zur Anwendung. Zur Analyse von Überlebensdaten diente der log-rank Test. Ein Unterschied galt als Signifikant bei einem $p < 0,05$. Die statistische Analyse wurde mit der freundlichen Unterstützung von PD Dr. Reinhard Geßner und PD Dr. Armin Thelen, Uniklinik Leipzig, durchgeführt.

3 Ergebnisse

Zunächst werden in diesem Kapitel die Ergebnisse der LI-Cadherin Expression in kolorektalen Karzinomen und Fernmetastasen kolorektaler Karzinome in Leber und Lunge vorgestellt. Danach folgen die Ergebnisse zur Expression von LI-Cadherin in Cholangiokarzinomen. Im Anschluss werden die Expressionsanalysen von LI-Cadherin im hepatozellulären Karzinom sowie bei Krebserkrankungen der Lunge dargestellt. Dabei steht die Fragestellung, in wieweit LI-Cadherin ein möglicher zellulärer Staging-Biomarker für kolorektale Karzinommetastasen sein kann im Vordergrund. Abschließend folgen die Ergebnisse der Co-Expressionsanalysen von LI-Cadherin und Cdx2.

3.1 LI-Cadherin Expression in kolorektalen Karzinomen und kolorektalen Fernmetastasen

Die vorliegenden Charakteristika der Patienten mit gesunden und kranken Proben des Darmes sind in Kapitel 2.1.1 aufgeführt.

3.1.1 Immunhistochemie von normalem Ileum- und Kolongewebe

Mit dem Antikörper K2101 ließ sich LI-Cadherin in normalem Ileum- und Kolongewebe wie erwartet membranständig in den entsprechenden Epithelien anfärben (Abbildung 7).

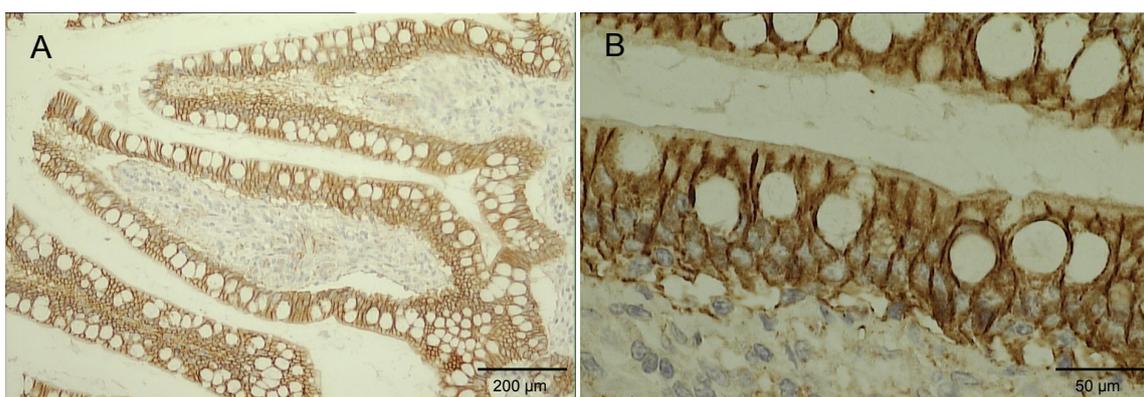


Abbildung 7: Normale Ileumschleimhaut gefärbt gegen LI-Cadherin mit dem Antikörper K2101 mit membranständiger Färbung der epithelialen Zellen, in Übersichts- (A) und Ausschnittsvergrößerung (B).

3.1.2 Vergleich der LI-Cadherin Expression in kolorektalen Adenomen und Karzinomen

Eine Übersicht der Ergebnisse zu den immunhistochemischen Untersuchungen in den Proben aus normaler Kolonschleimhaut, kolorektalen Adenomen und primären kolorektalen Karzinomen ist in Tabelle 13 und Abbildung 8 zu sehen.

Von den 16 untersuchten Patienten mit normalem Kolongewebe und von den 15 untersuchten Patienten mit Adenomen im Dickdarm zeigten alle Proben eine hohe Expression von LI-Cadherin mit mehr als 50% positiven Zellen. Von den untersuchten Proben der 76 Patienten mit primären kolorektalen Karzinomen waren die Proben von 68 Patienten stark positiv (89,5%), von 5 Patienten schwach positiv (6,6%) und von 3 Patienten (3,9%) negativ.

Für E-Cadherin konnte in der Progression kolorektaler Karzinome stadienabhängig eine Abnahme der zellulären Expression gezeigt werden [67]. Um Hinweise über eine Abnahme der Expression von LI-Cadherin in der Progression kolorektaler Karzinome zu erhalten wurden nun alle LI-Cadherin positiven kolorektalen Karzinome mit den korrespondierenden Adenomen verglichen. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von LI-Cadherin in kolorektalen Adenomen und kolorektalen Karzinomen ($p=0,419$). Trotz spezifischer, membranständiger Färbungen der fünf Proben mit schwacher Expression, wurden diese in einem nächsten Schritt zur statistischen Auswertung als LI-Cadherin negativ gewertet. Auch bei Zusammenfassung der schwach positiven und der negativen Proben zeigte sich keine signifikante Abnahme der LI-Cadherin-Expression in der Progression von Adenom zu Karzinom ($p=0,174$).

	Normale Kolon- mucosa	Kolorektale Adenome	Kolorektale Karzinome
Gesamtzahl	16	15	76
LI-Cadherin Expres- sion			
Negativ	--	--	3 (3,9%)
Gering	--	--	5 (6,6%)
Hoch	16 (100%)	15 (100%)	68 (89,5%)

Tabelle 13: LI-Cadherin Expression in normaler Kolonmucosa, kolorektalen Adenomen und kolorektalen Karzinomen.

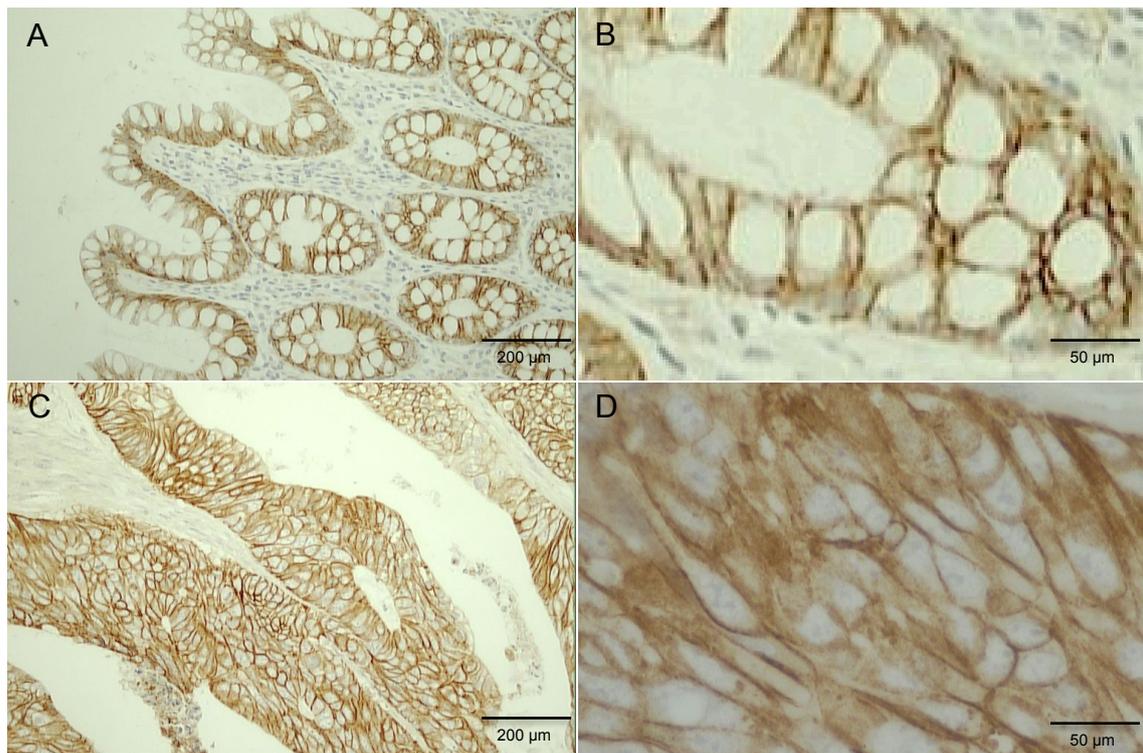


Abbildung 8: Normales Kolongewebe (A, B) und kolorektales Karzinom UICC III (C,D). Beide gezeigten Proben wurden als stark positiv bewertet.

3.1.3 Stadiumabhängige LI-Cadherin Expression in primären kolorektalen Karzinomen

In einem nächsten Schritt wurde nun die LI-Cadherin-Expression in kolorektalen Karzinomen entsprechend ihres UICC-Stadiums ausgewertet.

Die Verteilung der LI-Cadherin-Expression in Bezug zum UICC Stadium ist in Tabelle 14 und Abbildung 9 aufgeführt. Insgesamt zeigten sich in den UICC Stadien I-III mindestens 90% der untersuchten Proben hochgradig LI-Cadherin positiv. Demgegenüber lag der Anteil LI-Cadherin positiver Tumore in UICC Stadium IV bei 72%.

Zur statistischen Analyse wurde die LI-Cadherin Expression in metastasierten Stadien also UICC III und UICC IV mit den nicht-metastasierten Stadien verglichen. In den Stadien UICC III und UICC IV standen 3 LI-Cadherin negative Tumore 42 positiven Tumoren gegenüber, während in den Stadien UICC I und II alle 31 Proben LI-Cadherin positiv waren. Der Unterschied der LI-Cadherin Expression war statistisch nicht signifikant ($p=0,266$). Wie in Kapitel 3.1.2 wurden zur weiteren Auswertung LI-Cadherin negative und niedrig exprimierende Tumore zusammengefasst und mit den stark LI-Cadherin exprimierenden Tumoren verglichen. Auch hierbei zeigte sich keine statistisch signifikant Assoziation ($p=0,085$).

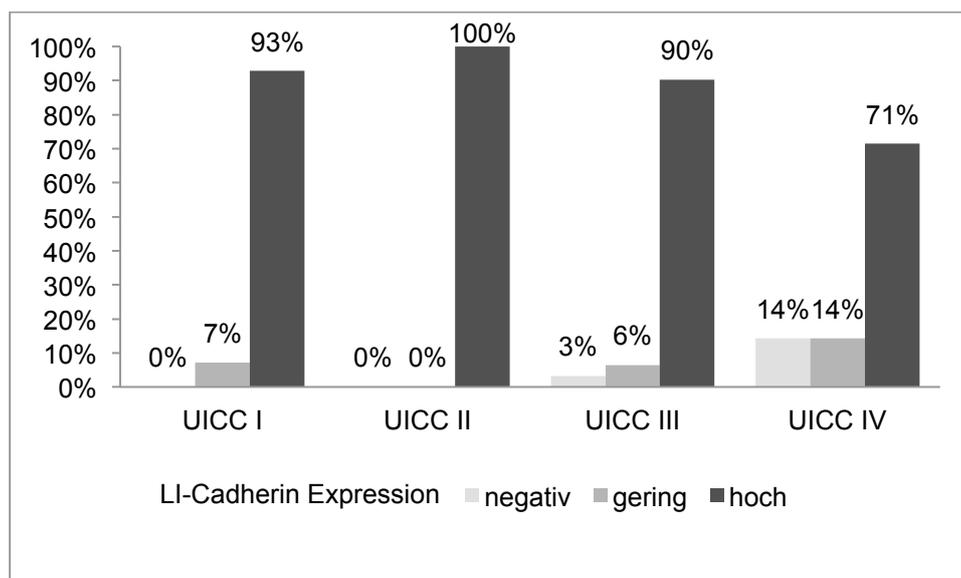


Abbildung 9: Relative Verteilung der LI-Cadherin Expression in unterschiedlichen UICC-Stadien primär kolorektaler Karzinome. Eine negative bzw. geringe LI-Cadherin Expression ist in metastasierten Stadien (UICC III und IV) nicht-signifikant häufiger als in nicht metastasierten Stadien. Insbesondere in UICC Stadium IV ist der relative Anteil hoch-LI-Cadherin exprimierender Karzinome geringer.

LI-Cadherin Expression	UICC I	UICC II	UICC III	UICC IV
negativ	0	0	1	2
gering	1	0	2	2
hoch	13	17	28	10

Tabelle 14: Absolute Verteilung der LI-Cadherin Expression in unterschiedlichen Stadien kolorektaler Karzinome.

LI-Cadherin ist sowohl im gesunden Gewebe des Dickdarms als auch in pathologisch verändertem Kolongewebe hochgradig exprimiert. Es zeigt sich lediglich eine Tendenz zu einer Abnahme der LI-Cadherin Expression in den Stadien UICC III und insbesondere in Stadium IV.

3.1.4 LI-Cadherin Expression in kolorektalen Fernmetastasen

Analog der reduzierten Expression von E-Cadherin in fortgeschrittenen Stadien kolorektaler Karzinome und kolorektaler Karzinommetastasen, wurde auch für LI-Cadherin eine verminderte Expression in kolorektalen Fernmetastasen angenommen. Entgegen dieser Hypothese zeigten alle Proben der 28 untersuchten Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen eine hochgradige LI-Cadherin Expression (Tabelle 15, Abbildung 10). Bei 15 von 18 Patienten (83,3%) mit Lungenmetastasen kolorektaler Karzinome zeigte sich eine starke LI-Cadherin Expression, bei einem Patienten (5,6%) eine schwache und bei 2 Patienten (11,1%) keine LI-Cadherin Expression.

	Kolorektale Lebermetastasen	Kolorektale Lungenmetastasen
Gesamtzahl	28	18
LI-Cadherin Expression		
Negativ	--	2 (11,1%)
Gering	--	1 (5,6%)
Hoch	28 (100%)	15 (83,3%)

Tabelle 15: LI-Cadherin Expression in Leber- und Lungenmetastasen kolorektaler Karzinome.

Somit konnte hier eine hohe LI-Cadherin-Expression in kolorektalen Fernmetastasen nachgewiesen werden. Von 4 Patienten existierte sowohl Gewebe von Primärtumoren als auch von korrespondierenden Lebermetastasen. Bei allen 4 Patienten zeigte sich eine hochgradige Expression von LI-Cadherin sowohl in den Primärtumoren als auch in den zugehörigen Lebermetastasen.

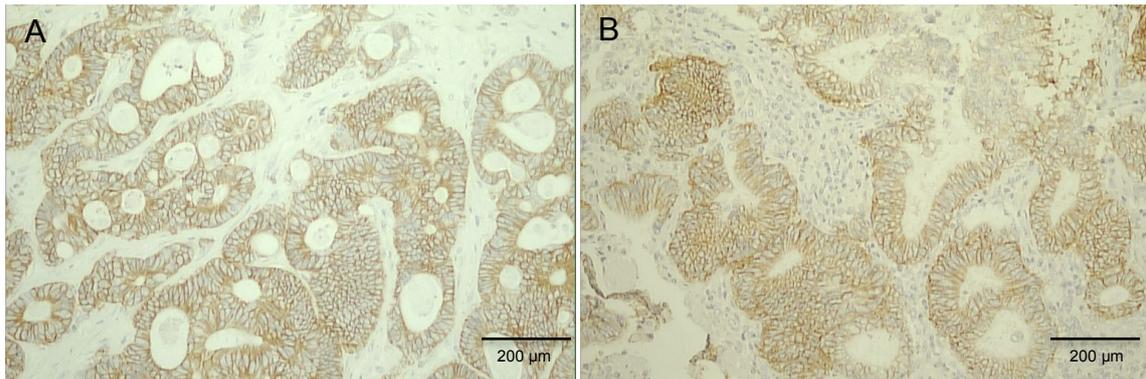


Abbildung 10: Hochgradige LI-Cadherin Expression in kolorektalen Metastasen der Leber (A) und der Lunge (B).

3.2 LI-Cadherin Expression im Cholangiokarzinom

3.2.1 Immunhistochemische Analyse der Proben des Tissue-Micro-Arrays

Zur Analyse der LI-Cadherin Expression in Cholangiokarzinomen wurden zunächst die Proben der Patienten auf dem Tissue-Microarray (TMA, Oligene, Berlin) untersucht. Bei bislang dünner Datenlage bezüglich der Expression von LI-Cadherin in Cholangiokarzinomen ging es bei diesen Proben um eine rein qualitative Analyse der LI-Cadherin-Expression. Als Vergleichsgewebe dienten 22 Proben gesunder Leber, die ebenfalls auf einem TMA vorlagen.

In keiner der 22 Proben aus normalem Lebergewebe konnte – wie erwartet – LI-Cadherin nachgewiesen werden. Demgegenüber zeigten insgesamt 17 von 54 Patientenproben (31,5%) mit Cholangiokarzinomen eine LI-Cadherin Expression. Diese war bei 12 Patienten (22,2%) stark und bei 5 Patienten (9,3%) schwach ausgeprägt (Tabelle 16).

	Lebergewebe	Cholangiokarzinome (TMA)
Gesamtzahl	22	54
LI-Cadherin Expression		
Negativ	22 (100%)	37 (68,5%)
Gering	--	5 (9,3%)
Hoch	--	12 (22,2%)

Tabelle 16: LI-Cadherin Expression in Cholangiokarzinomen des Tissue Microarrays (TMA)

3.2.2 LI-Cadherin Expression in Klatskin-Tumoren

Nach dem generellen Nachweis der LI-Cadherin-Expression in einigen Cholangiokarzinomen wurden zwei gut definierte Kollektive mit bekannten Daten zu Gesamtüberleben, krankheitsfreiem Überleben und Rezidivraten zum Einen von Patienten mit Cholangiokarzinomen der Hepatikusgabel (Klatskin-Tumore) und zum anderen von Patienten mit intrahepatischen Cholangiokarzinomen (Kap 3.2.3) untersucht.

Die Patientencharakteristika der 60 Patienten mit Klatskin-Tumore sind in Kapitel 2.1.3 und Tabelle 7 beschrieben. Von den untersuchten Patienten zeigten 28 (46,7%) eine Expression von LI-Cadherin, die in 22 Fällen (36,7%) schwach und in 6 Fällen (10%) stark ausgeprägt war (Tabelle 17, Abbildung 11).

	Klatskin-Tumore
Gesamtzahl	60
LI-Cadherin Expression	
Negativ	32 (53,3%)
Gering	22 (36,7%)
Hoch	6 (10%)

Tabelle 17: LI-Cadherin Expression in Klatskin-Tumoren

3.2.3 Vergleich der LI-Cadherin-Expression mit klinischen und histopathologischen Parametern in Klatskin-Tumoren

Für die weitere statistische Auswertung wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt: Patienten mit LI-Cadherin positiven Proben wurden mit Patienten mit LI-Cadherin negativen Proben verglichen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 18 zu sehen.

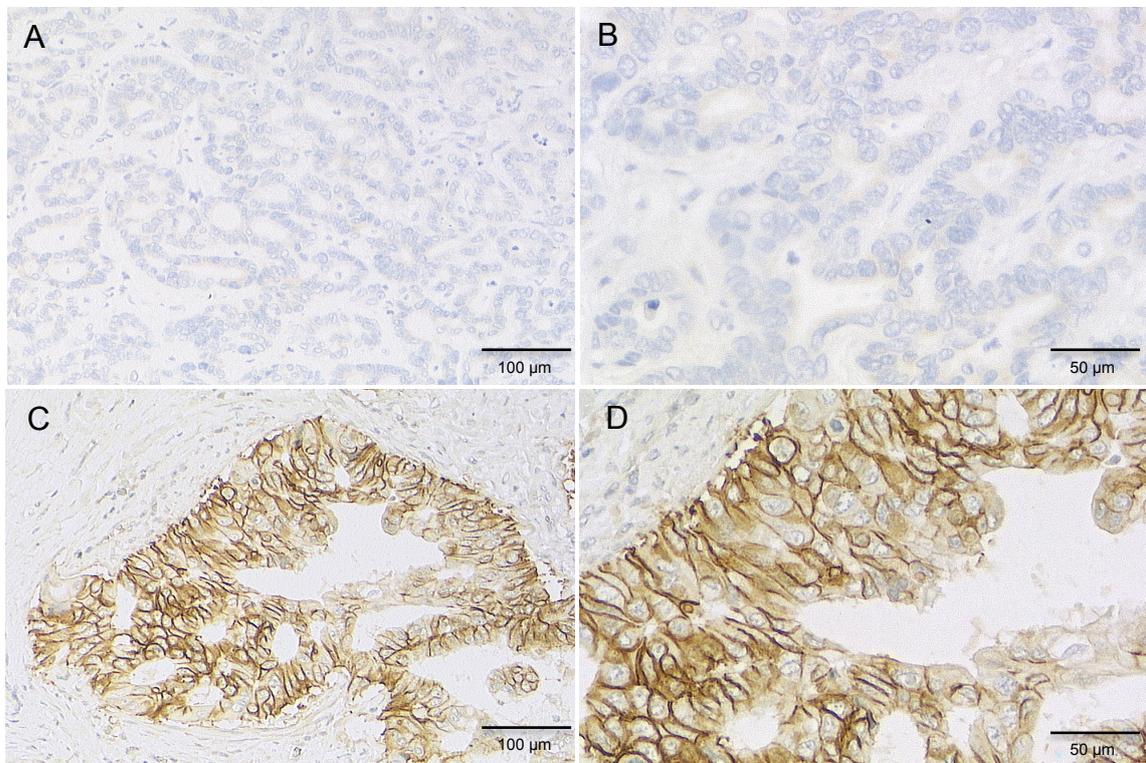


Abbildung 11: LI-Cadherin Expression in Cholangiokarzinomen. Proben mit fehlender LI-Cadherin Expression (A und B) und mit hochgradiger LI-Cadherin Expression (C und D).

Klatskin Tumore	LI-Cadherin positiv	LI-Cadherin negativ	p
Gesamtzahl	28	32	0,605
Männlich	15 (54%)	15 (47%)	
Weiblich	13 (46 %)	17 (53%)	
Alter			0,448
< 60J	15 (54%)	14 (44%)	
> 60J	13 (46 %)	18 (56%)	
Infiltrationsgrad			0,039
T2	6 (21%)	15 (47%)	
T3	22 (79%)	17 (53%)	
Lymphknotenbefall			0,342
N0	15 (54%)	21 (66%)	
N1/2	13 (46 %)	11 (34%)	
Differenzierungsgrad			0,031
G1/G2	25 (89%)	21 (66%)	
G3	3 (11%)	11 (34%)	
Mit Rezidiv	15 (54%)	13 (41%)	0,316
Ohne Rezidiv	13 (46 %)	19 (59%)	
Mit Lokalrezidiv	16 (57%)	17 (53%)	0,755
Ohne Lokalrezidiv	12 (43%)	15 (47%)	
Metastasen im Rezidiv	2 (7%)	12 (37%)	0,006
Ohne Metastasen im Rezidiv	26 (93%)	20 (63%)	
OS in %			0,915
1-Jahr	76,5%	75,3%	
3-Jahre	55,4%	44,0%	
5-Jahre	34,1%	29,4%	
DFS in %			0,270
1-Jahr	77,2%	59,5%	
3-Jahre	44,6%	36,1%	
5-Jahre	37,2%	30,1%	

Tabelle 18: Übersicht der Assoziation klinischer und histopathologischer Parameter mit der LI-Cadherin Expression in Klatskin-Tumoren. OS=overall survival, Gesamtüberleben, DFS= disease free survival krankheitsfreies Überleben

Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Assoziation der LI-Cadherin-Expression mit der Infiltrationstiefe. Patienten mit LI-Cadherin positiven Tumoren hatten signifikant häufiger ein T3-Karzinom (79%) als Patienten ohne LI-Cadherin Expression (53%, $p=0,039$). Desweiteren korrelierte die LI-Cadherin Expression signifikant mit dem Differenzierungsgrad der Klatskin-Tumore. Von den 28 LI-Cadherin positiven Tumoren waren 25 gut und mittelgradig differenziert (89%) während dies bei LI-Cadherin negativen Tumoren für 21 von 32 (66%) zutraf. Fehlende LI-Cadherin Expression war signifikant häufiger mit einem entdifferenzierten Karzinom assoziiert ($p=0,031$). Die Gesamtrezidivrate und die Rate an Lokalrezidiven war in beiden Gruppen gleich verteilt. Eine LI-Cadherin-Expression war jedoch mit einer signifikant niedrigeren Zahl von Fernmetastasen im Rezidiv assoziiert. Während nur 2 von 28 Patienten mit LI-Cadherin exprimierenden Tumoren Fernmetastasen im Rezidiv aufwiesen, traten diese bei 20 von 32 Patienten mit LI-Cadherin negativen Tumoren auf ($p=0,006$). LI-Cadherin Expression in Klatskin-Tumoren war also insgesamt mit höherer Infiltrationstiefe, besserer Differenzierung und einer geringeren Metastasierung im Rezidiv assoziiert.

Bezüglich des Gesamtüberlebens der Patienten in diesem Kollektiv zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 18). Das krankheitsfreie Überleben lag in der Gesamtkohorte bei 64,2%, 36,4% und 30,3% nach einem, 3 und 5 Jahren. In der Patientengruppe mit LI-Cadherin positiven Tumoren lag das krankheitsfreie Überleben in denselben Zeiträumen bei 77,2%, 44,6% und 37,2%, in der LI-Cadherin negativen Gruppe bei 59,5%, 36,1% und 30,1%. Die Tendenz zu einem längeren krankheitsfreien Überleben in der Gruppe LI-Cadherin positiver Klatskin-Tumore war statistisch jedoch nicht signifikant ($p=0,270$).

3.2.4 LI-Cadherin Expression in intrahepatischen Cholangiokarzinomen

Es folgte die immunhistochemische Analyse der LI-Cadherin Expression in intrahepatischen Cholangiokarzinomen. Das Patientenkollektiv ist in Kapitel 2.1.3 beschrieben (Tabelle 8).

Von den untersuchten Proben der 110 Patienten hatten 47 Patienten Tumore mit positiver LI-Cadherin Expression (42,7%). Davon war die Expression bei 31 Patienten

(28,2%) schwach und bei 16 Patienten (14,5%) stark ausgeprägt (Tabelle 19). Die relative Verteilung der LI-Cadherin Expression entsprach damit der bei Klatskin-Tumoren.

Intrahepatische Cholangiokarzinome	
Gesamtzahl	110
LI-Cadherin Expression	
Negativ	63 (57,2%)
Gering	31 (28,2%)
Hoch	16 (14,5%)

Tabelle 19: Verteilung der LI-Cadherin Expression in intrahepatischen Cholangiokarzinomen.

Zur weiteren statistischen Auswertung wurden erneut LI-Cadherin positive mit LI-Cadherin negativen Tumoren verglichen (Tabelle 20). Bei den klinischen und histopathologischen Daten gab es keine signifikanten Unterschiede in den beiden Gruppen. Zwar war bei den intrahepatischen Cholangiokarzinomen analog der Klatskin-Tumore eine Tendenz zur besseren Differenzierung bei LI-Cadherin positiven Tumoren zu erkennen (79% gegenüber 68% G1/G2-Tumore). Doch war dieser Unterschied hier nicht statistisch signifikant ($p=0,223$).

In der Gruppe der Patienten mit LI-Cadherin-Expression zeigte sich ein Trend zu einem schlechteren Gesamtüberleben. Im Gesamtkollektiv lagen die Überlebensraten nach einem, 3 und 5 Jahren bei 54,8%, 23,3% und 16,4%. In der Gruppe der Patienten mit LI-Cadherin exprimierenden Tumoren lag das Gesamtüberleben nach einem Jahr zwar bei 57,1% (LI-Cadherin negative Tumore 53,1%), nach drei Jahren lebten jedoch nur noch 11,3% der Patienten im Vergleich zu 28,7% in der LI-Cadherin negativen Gruppe und nach fünf Jahren lebte keiner der Patienten in der LI-Cadherin positiven Gruppe im Vergleich zu 24,6% der Patienten in der Gruppe mit LI-Cadherin negativen Tumoren. Dieser Trend zu einem schlechteren Gesamtüberleben bei LI-Cadherin exprimierenden intrahepatischen Cholangiokarzinomen erreichte keine statistische Signifikanz ($p=0,249$).

Intrahepatische Cholangi- okarzinome	LI-Cadherin positiv	LI-Cadherin negativ	p
Gesamtzahl	47	63	0,333
Männlich	23 (49%)	25 (40%)	
Weiblich	24 (51%)	38 (60%)	
Alter			0,891
< 60J	23 (49%)	30 (48%)	
> 60J	24 (51%)	33 (52%)	
Infiltrationsgrad			0,415
T1	28 (60%)	32 (51%)	
T2/3	19 (40%)	31 (49%)	
Lymknotenbefall			0,980
N0	26 (55%)	35 (56%)	
N1/2	21 (45%)	28 (44%)	
Differenzierungsgrad			0,223
G1/G2	37 (79%)	43 (68%)	
G3	10 (21%)	20 (32%)	
Mit Rezidiv	16 (34%)	34 (54%)	0,206
Ohne Rezidiv	31 (66%)	29 (46%)	
OS in %			0,249
1-Jahr	57,1%	53,1%	
3-Jahre	11,3%	28,7%	
5-Jahre	0%	24,6%	
DFS in %			0,038
1-Jahr			
3-Jahre	31,2%	52,6%	
5-Jahre	0%	27,7%	
	0%	23,2%	

Tabelle 20: Übersicht der assoziation klinischer und histopathologischer Parameter mit der LI-Cadherin Expression in intrahepatischen Cholangiokarzinomen. OS=overall survival, Gesamtüberleben, DFS=disease free survival, krankheitsfreies Überleben.

Das krankheitsfreie Überleben im Gesamtkollektiv lag bei 43,3%, 20,6% und 18,3% nach einem, 3 und 5 Jahren. Bei LI-Cadherin negativen intrahepatischen Cholangiokarzinomen lagen die Werte nach denselben Zeiträumen bei 52,6%, 27,7% und 23,2%. Demgegenüber lag das krankheitsfreie Überleben in der LI-Cadherin-positiven Gruppe nach einem Jahr bei 31,2% und nach zwei Jahren bei 18,9%. Nach drei Jahren hatten alle Patienten mit LI-Cadherin positiven Tumoren eine Krankheitsprogression. LI-Cadherin war damit in der univariaten Analyse ein Parameter für die Prognose des krankheitsfreien Überlebens in diesem Kollektiv von Patienten mit intrahepatischen Cholangiokarzinomen ($p=0,038$, Konfidenzintervall 0,827-2,079) (Abbildung 12).

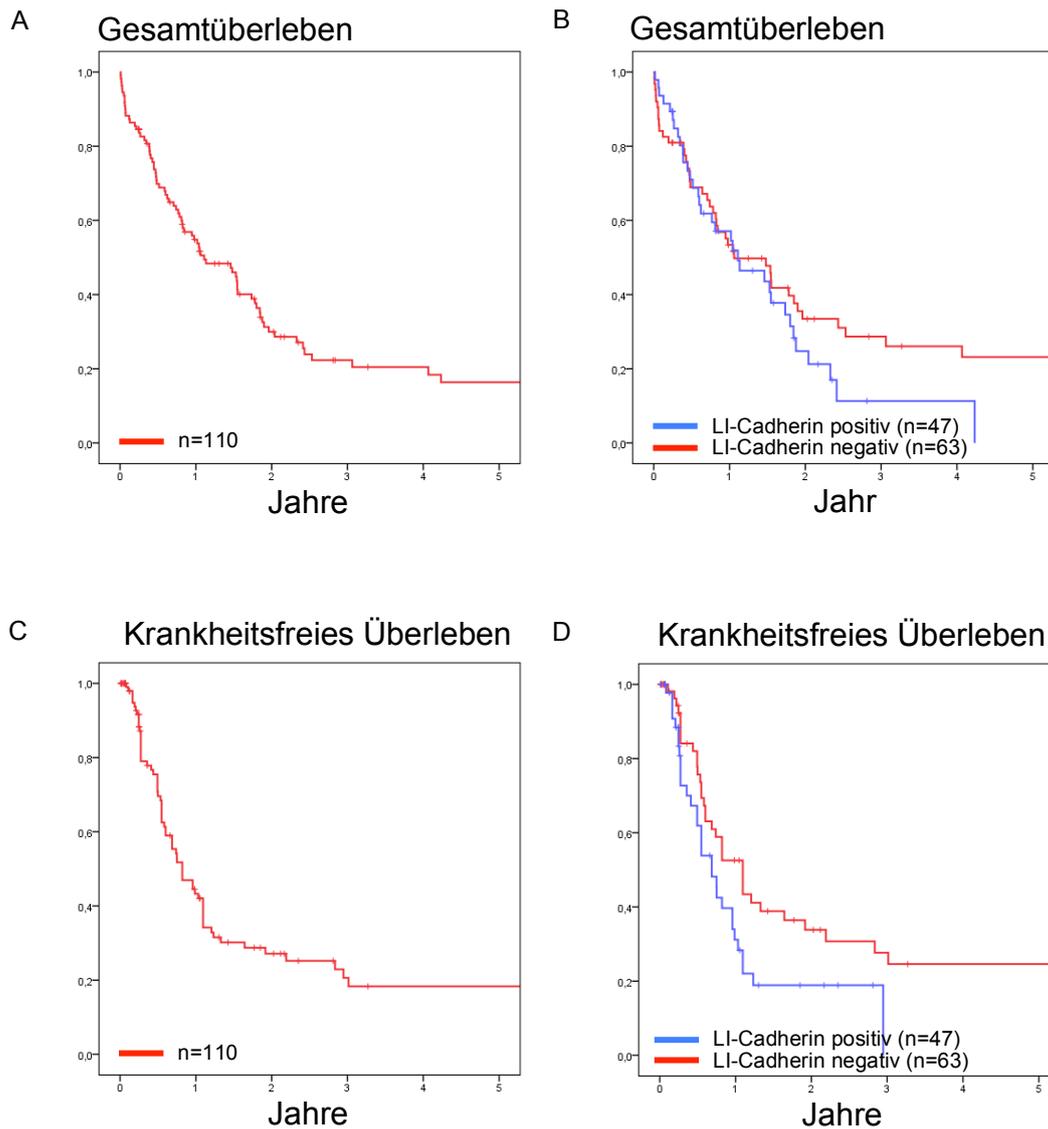


Abbildung 12: Relatives Gesamtüberleben (A,B) und krankheitsfreies Überleben (C,D) des Gesamtkollektivs (A,C) der Patienten mit intrahepatischen Cholangiokarzinomen und im Vergleich LI-Cadherin positiver und negativer Tumore (B,D). Die blauen Kurven in B und D zeigen die Gruppe der Patienten mit LI-Cadherin positiven Tumoren. Erstellung der Graphik durch PD Dr. A. Thelen, Universitätsklinikum Leipzig.

3.3 LI-Cadherin im hepatozellulären Karzinom

3.3.1 Vergleich der LI-Cadherin-Antikörper im Western Blot

Wong et al. setzten bei beim Nachweis von LI-Cadherin im HCC einen kommerziellen Antikörper (SC 6978) gegen die cytoplasmatische Domäne des humanen LI-Cadherins ein [79]. Zunächst wurde die Sensitivität und Spezifität des kommerziellen Antikörpers mit dem Antikörper K2101 [81] verglichen, der ebenfalls gegen die cytoplasmatische Domäne des humanen LI-Cadherins gerichtet war.

Dazu wurde eine Western Blot Analyse mit 10 µg, 1µg und 0,1µg Gesamtproteinmenge einer nichttumorösen Kolonprobe durchgeführt. Die Kryoprobe des Kolongewebes wurde lysiert, die Gesamtproteinmenge mittels BCA-Assay bestimmt und nach SDS-PAGE eine Western Blot Analyse durchgeführt. Der Antikörper K2101 wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt, während der kommerzielle Antikörper SC 6978 1:1.000 verdünnt wurde.

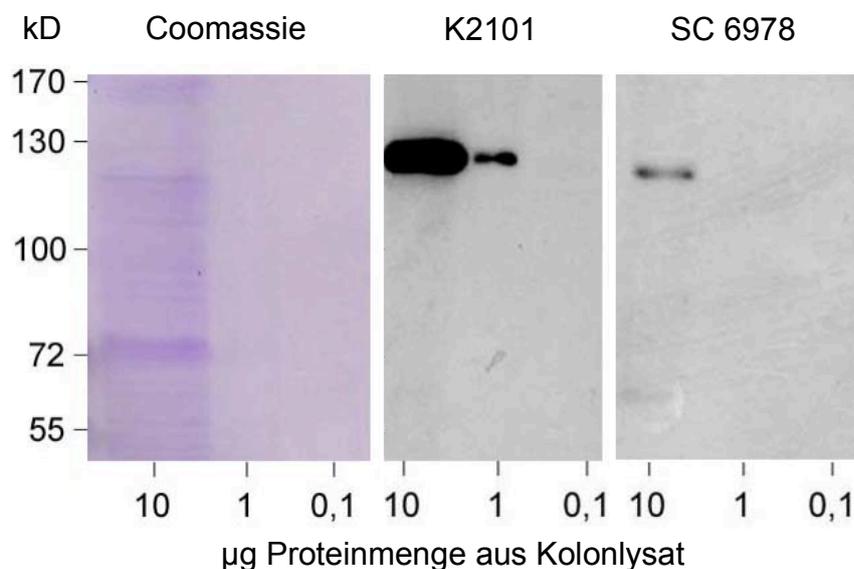


Abbildung 13: Vergleich der Antikörper SC 6978 und K2101 gegen die cytoplasmatische Domäne humanen LI-Cadherins, aufgetragen sind jeweils 10 µg, 1 µg und 0,1 µg Gesamtproteinmenge aus humanem Kolonlysate. Während der Antikörper K2101 bei 1 µg noch eine klar erkennbare Bande zeigt ist dies beim kommerziellen Antikörper nicht der Fall. Verdünnung K2101 1:10000, SC 6978 1:1000.

Abbildung 13 verdeutlicht das Ergebnis. Beide Antikörper waren spezifisch und zeigten eine Bande beim erwarteten Molekulargewicht von 120 kD bei wenig Hintergrundfärbung. Der Antikörper K2101 zeigte dabei jedoch bei 1 µg Gesamtproteinmenge noch eine klare Bande, während dies beim Antikörper SC 6978 nicht der Fall war. Auch bei

niedrigerer Verdünnung des eingesetzten Antikörpers SC 6978 kam es zu keiner Verbesserung der Sensitivität.

3.3.2 Immunhistochemische Analyse von LI-Cadherin im hepatozellulären Karzinom

Für die immunhistochemische Analyse standen von 21 Patienten formalinfixierte und paraffineingebettete Gewebeproben zu Verfügung. Alle Proben wurden sowohl mit dem Antikörper K2101 und mit dem Antikörper SC 6978 gefärbt. In keine der untersuchten Proben zeigte sich eine Expression von LI-Cadherin (Abbildung 14).

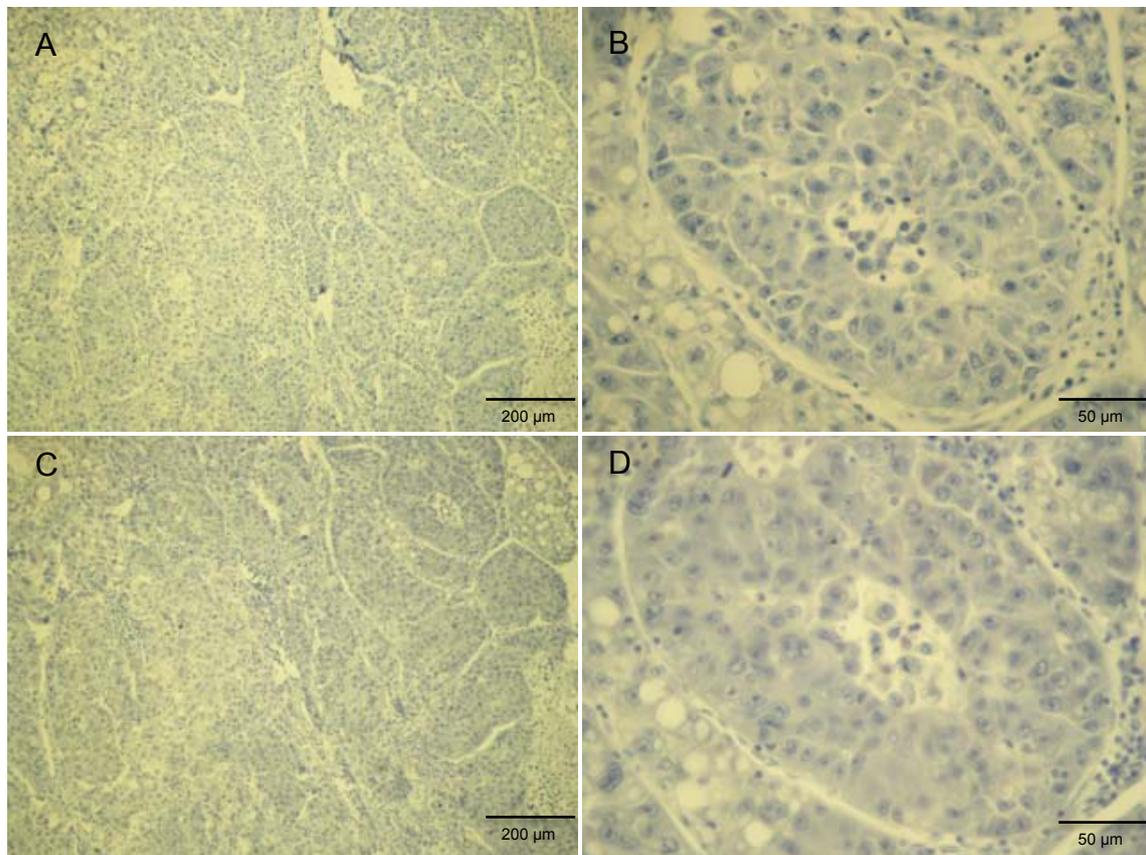


Abbildung 14: Konsekutive Schnitte eines hepatozellulären Karzinoms gefärbt gegen LI-Cadherin mit den Antikörpern SC6978 (A und B) sowie K2101 (C und D).

3.3.3 Biotinblock im hepatozellulären Karzinom

Nachdem sich im untersuchten Kollektiv überraschend keine Färbung bei den eingesetzten Antikörpern zeigte, wurde das Färbeprotokoll analog dem von Wong et al adap-

tiert. Wie in Kapitel 2.3.7 beschrieben, kommt es in der hier eingesetzten LSAB-Methode durch die Bindung von Streptavidin an einen biotinylierten Antikörper zu einer Signalverstärkung. In Geweben mit hohem Biotinanteil kann dies zu unspezifischen cytoplasmatischen Signalen führen. Hier wurden nun konsekutive Schnitte von hepatozellulären Karzinomen mit und ohne Vorbehandlung mit Avidin und Biotin zum Blocken des endogenen Biotins vor Antikörperinkubation behandelt (Abbildung 15). Es zeigte sich in den nicht geblockten Gewebeproben eine cytoplasmatische Färbung, die bei den gegen endogenes Biotin geblockten Proben nicht zu sehen war.

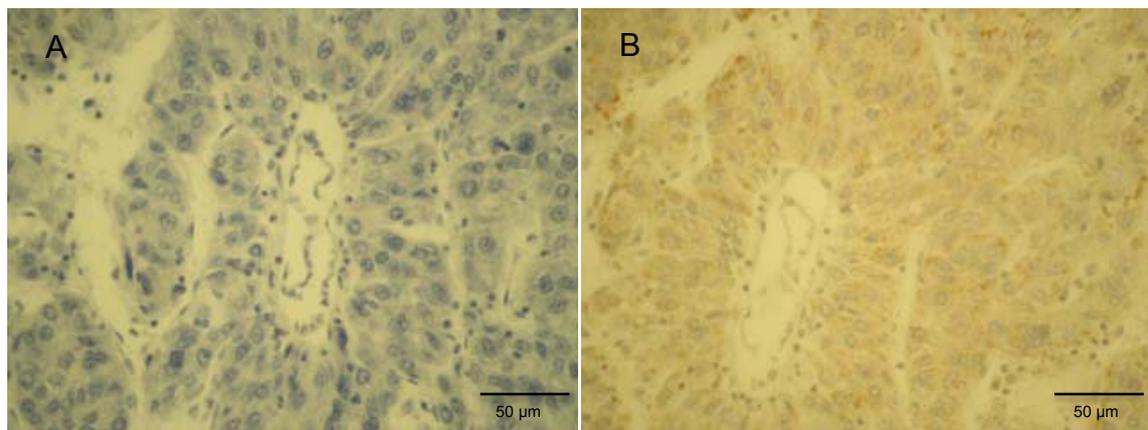


Abbildung 15: Konsekutive Schnitte hepatozellulärer Karzinome gefärbt gegen LI-Cadherin mit (A) und ohne (B) Blockprozedur gegen endogenes Biotin, in diesem Fall mit dem Antikörper SC 6978 gegen humanes LI-Cadherin. In B zeigt sich eine diffuse Färbung der Zellen.

In Gewebeschnitten von kolorektalen Lebermetastasen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Spezifität für LI-Cadherin positives Gewebe nicht verloren geht. In diesen Schnitten war jedoch auch zu sehen, dass bei fehlendem Biotinblock das an die Metastase angrenzende Lebergewebe eine cytoplasmatische Färbung aufzuweisen schien. Die Färbung gegen tatsächlich LI-Cadherin positive Gewebe wurde durch die eingesetzte Blockprozedur also nicht beeinträchtigt (Abbildung 16).

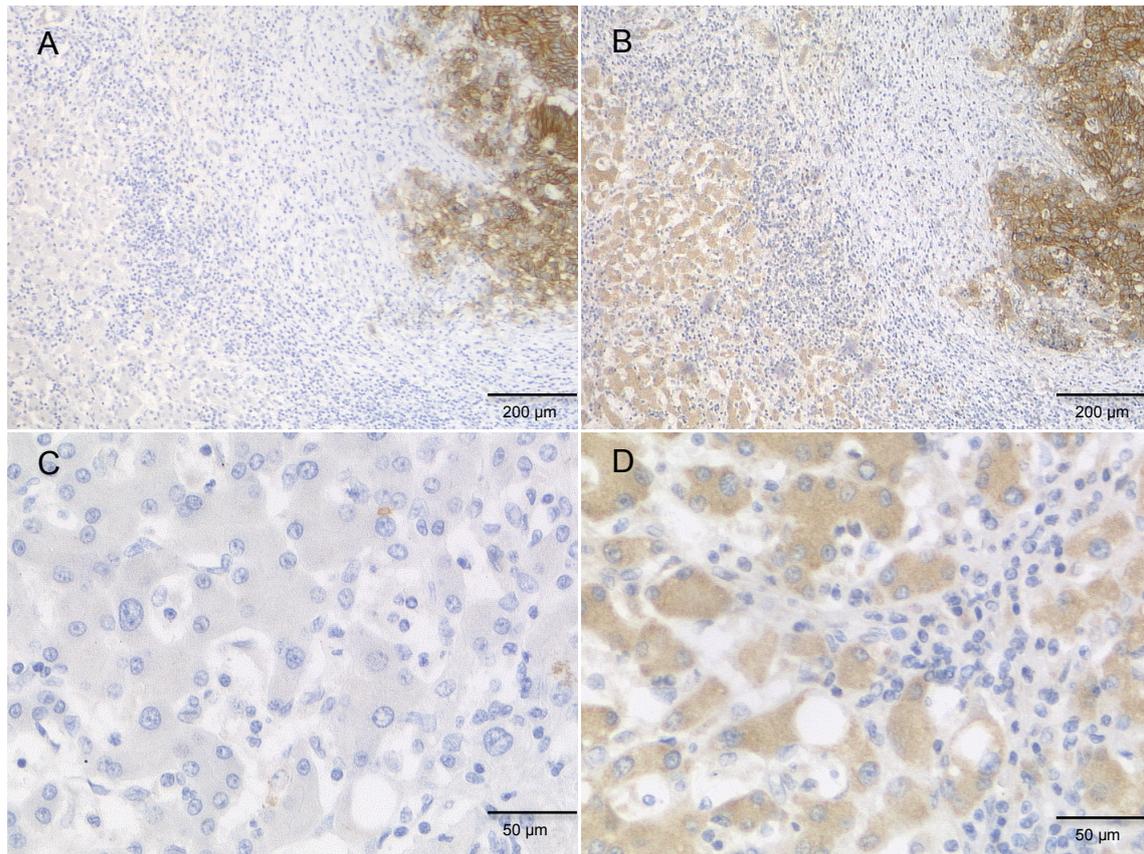


Abbildung 16: Konsekutive Schnitte einer kolorektalen Lebermetastase mit (A,C) und ohne (B,D) Biotinblock. Am rechten Bildrand ist in A und B jeweils das metastatische Gewebe mit der membranbetonten Färbung gegen LI-Cadherin zu sehen. Links befindet sich Lebergewebe mit scheinbar zyttoplasmatischer Färbung (B) die beim Blocken endogenen Biotins jedoch nicht mehr zu sehen ist. In der höheren Vergrößerung (C und D) zeigt sich in den Ausschnitten mit dem die Metastase umgebenden Lebergewebe die zyttoplasmatische Färbung nur bei fehlender Blockprozedur gegen endogenes Biotin (D).

3.3.4 Western Blot Analyse im HCC

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden zusätzlich 10 Kryoproben von Patienten mit gesicherten HCCs mittels Western Blot analysiert. Diese Methode gilt zum Proteinnachweis als deutlich sensitiver als die Immunhistochemie. Die Proben wurden mit beiden Antikörpern gegen humanes LI-Cadherin untersucht. Auch hier zeigte sich in keiner der untersuchten Gewebeproben ein Nachweis von LI-Cadherin (Abbildung 17).

Insgesamt waren damit entgegen der angenommenen Datenlage die Proben aller 31 untersuchten Patienten mit HCCs negativ auf die zelluläre Expression von LI-Cadherin.

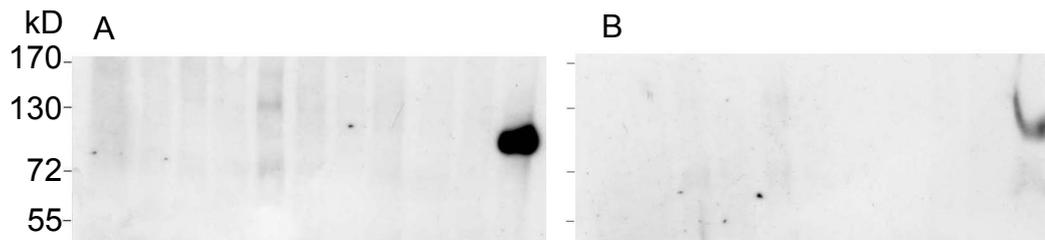


Abbildung 17: Western Blot mit den Antikörper K2101 (A) und SC 6978 (B) gegen humanes LI-Cadherin von 10 hepatozellulären Karzinomen. Lediglich Kolongewebe als Positivkontrolle zeigt eine positive Färbung.

3.4 Vergleich der LI-Cadherin Expression in Lebergewebe

Insgesamt wurden 22 Patienten mit gesundem Lebergewebe, 31 Patienten mit HCCs, 224 Patienten mit Cholangiokarzinomen und 28 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen untersucht. Während keiner der Patienten mit gesundem Lebergewebe oder HCCs eine positive LI-Cadherin aufwies, exprimierten insgesamt 92 (41,1%) aller Patienten mit Cholangiokarzinomen und 100% aller Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen LI-Cadherin.

Zur Diskriminierung von Cholangiokarzinomen und kolorektalen Lebermetastasen wurden 92 von 224 LI-Cadherin positiven Cholangiokarzinomen mit 28 von 28 LI-Cadherin positiven kolorektalen Lebermetastasen verglichen. Hier zeigte sich ein statistisch hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) bei allerdings unterschiedlichen Größen der jeweiligen Kohorten. Sensitivität und positiv prädiktiver Wert zur sicheren Diskriminierung von kolorektalen Karzinomlebermetastasen von Cholangiokarzinomen lagen dementsprechend jeweils bei nur 23,3% bei einer Spezifität von 58,9%.

Für die sichere Diskriminierung von HCCs und Cholangiokarzinomen galt für LI-Cadherin-negative Tumore das Gleiche: zwar zeigte sich ein statistisch hoch signifikanter Unterschied in der Expression von LI-Cadherin bei allerdings großen Unterschieden in der Größe der Kollektive und damit niedriger Sensitivität (19,0%) und positiv prädiktivem Wert (19,0%) bei einer Spezifität von 41,1%.

3.5 LI-Cadherin Expression in Lungenkarzinomen

Es wurden von insgesamt 54 Patienten mit Lungenkrebs formalinfixierte und paraffin- eingebettete Proben auf die Expression von LI-Cadherin immunhistochemisch unter- sucht. Davon hatten 4 Patienten ein kleinzelliges Karzinom, 22 Patienten ein Platt- enepithelkarzinom und 27 Patienten ein Adenokarzinom der Lunge.

Bei 2 Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge zeigten sich positive Färbungen gegen LI-Cadherin (Tabelle 21, Abbildung 18).

	Normales Lun- gengewebe	SCLC	PEC	Adenokarzinom
Gesamtzahl	3	4	22	27
LI-Cadherin Ex- pression				
Negativ	3 (100%)	4 (100%)	22 (100%)	25 (92,6%)
Gering	0	0	0	1 (3,7%)
Hoch	0	0	0	1 (3,7%)

Tabelle 21: LI-Cadherin Expression in Lungenkarzinomen, SCLC: kleinzellige Lungenkarzinome, PEC: Plattenepithelkarzinome

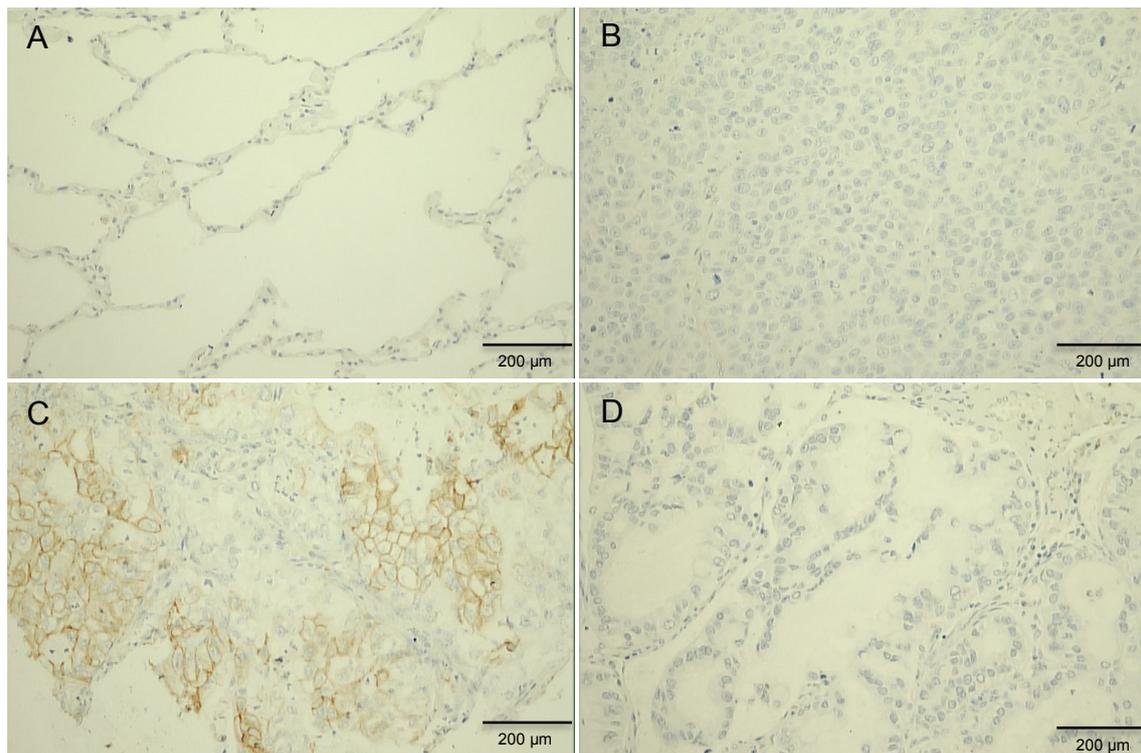


Abbildung 18: Lungennormalgewebe (A), Plattenepithelkarzinom der Lunge (B) und Lungenadenokarzinome (C,D). Die Probe in C weist eine positive LI-Cadherin Expression auf mit der typischen membranständigen Färbung.

3.6 Vergleich der LI-Cadherin Expression im Lungengewebe

Eine positive LI-Cadherin Expression konnte in 16 von 18 Metastasen kolorektaler Karzinome und in 2 von 27 Lungenadenokarzinomen festgestellt werden. Der Unterschied in der Expression in diesem Kollektiv war nach dem exakten Test von Fisher hochsignifikant ($p < 0.0001$). Die Sensitivität zur Erkennung kolorektaler Lungenmetastasen gegenüber Lungenadenokarzinomen lag bei 88,9%, die Spezifität bei 92,6%. Der positiv-prädiktive Werte lag bei 88,9%.

3.7 Co-Expression von LI-Cadherin und Cdx2

Das kaudale Homeoboxprotein Cdx2 ist – wie in Kapitel 1.4 dargelegt – als notwendiger Transkriptionsfaktor für die Expression von LI-Cadherin beschrieben worden. Des Weiteren wurde es als Marker für gastrointestinale Adenokarzinome beschrieben. Die Proben der kolorektalen Karzinome samt kolorektaler Karzinometastasen, der Lungenkarzinome und der auf dem TMA vorhandenen Cholangiokarzinome wurden in konsekutiven Schnitten immunhistochemisch auch gegen Cdx2 gefärbt.

Die Ergebnisse der Co-Expression von LI-Cadherin und Cdx2 in den entsprechenden Proben sind in Tabelle 22 dargestellt.

Gewebe	LI+/CDX2+	LI+/CDX2-	LI-/CDX2+	LI-/CDX2-
CRC	71	2	1	2
CRC Lebermetastase	27	1	0	0
CRC Lungenmetastase	14	2	0	2
Lungen ADC	1	1	1	24
Cholangiokarzinom	0	17	0	37

Tabelle 22: Verteilung der LI-Cadherin und Cdx2 Co-Expression in kolorektalen Karzinomen (CRC) und deren Metastasen sowie in Lungenadenokarzinomen (Lungen ADC) und in Cholangiokarzinomen.

In den Proben kolorektaler Karzinome, kolorektaler Karzinometastasen und Lungenadenokarzinome zeigten sich wie erwartet hohe Raten der Co-Expression von LI-Cadherin und Cdx2. Insgesamt waren hier 113 von 149 Proben sowohl LI-Cadherin als auch Cdx2 positiv und 28 von 149 Proben sowohl LI-Cadherin als auch Cdx2 negativ. Damit war eine konkordante Co-Expression in 94,6% der Fälle gegeben. Es zeigte sich jedoch auch in 6 Proben (2 primäre kolorektale Karzinome, eine Leber-, eine Lungenmetastase, ein Lungenadenokarzinom) LI-Cadherin Expression ohne Cdx2 Expression (4,0%). Umgekehrt waren je ein kolorektales Karzinom und ein Lungenadenokarzinom Cdx2 positiv und LI-Cadherin negativ (1,3%).

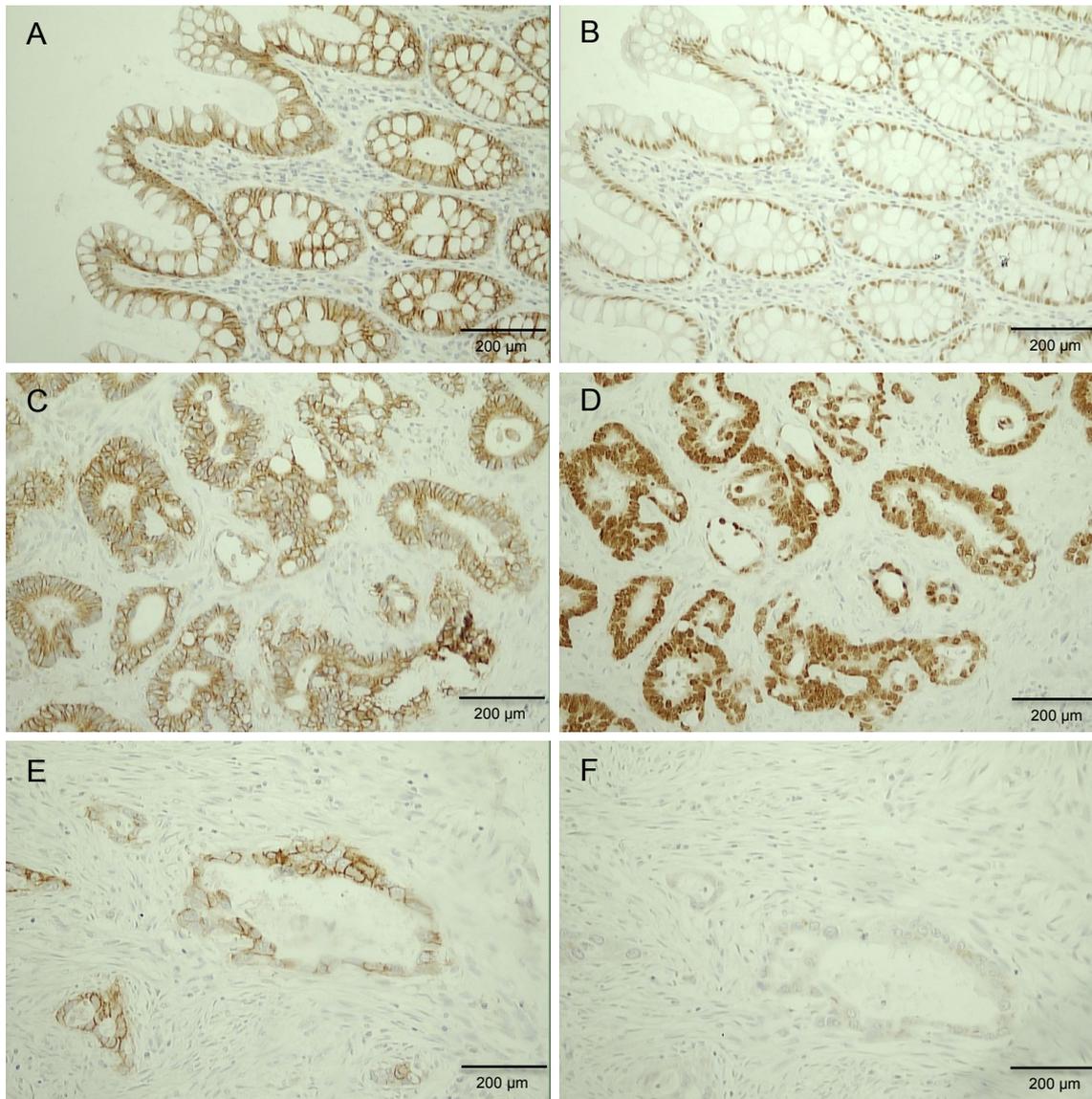


Abbildung 19: Konsekutive Schnitte von normalem Kolongewebe (A,B) und primären Kolonkarzinomen (C-F) gefärbt gegen LI-Cadherin (A,C,E) und Cdx2 (B,D,F). Während im normalen Kolon und in der Karzinomprobe in C/D LI-Cadherin und Cdx2 co-exprimiert werden, ist in der Probe E/F nur eine LI-Cadherin Expression nachweisbar

Bei den Cholangiokarzinomen konnte dies nicht bestätigt werden: hier war überraschenderweise in keiner der 17 LI-Cadherin-positiven Proben auf dem TMA eine Expression von Cdx2 zu verzeichnen.

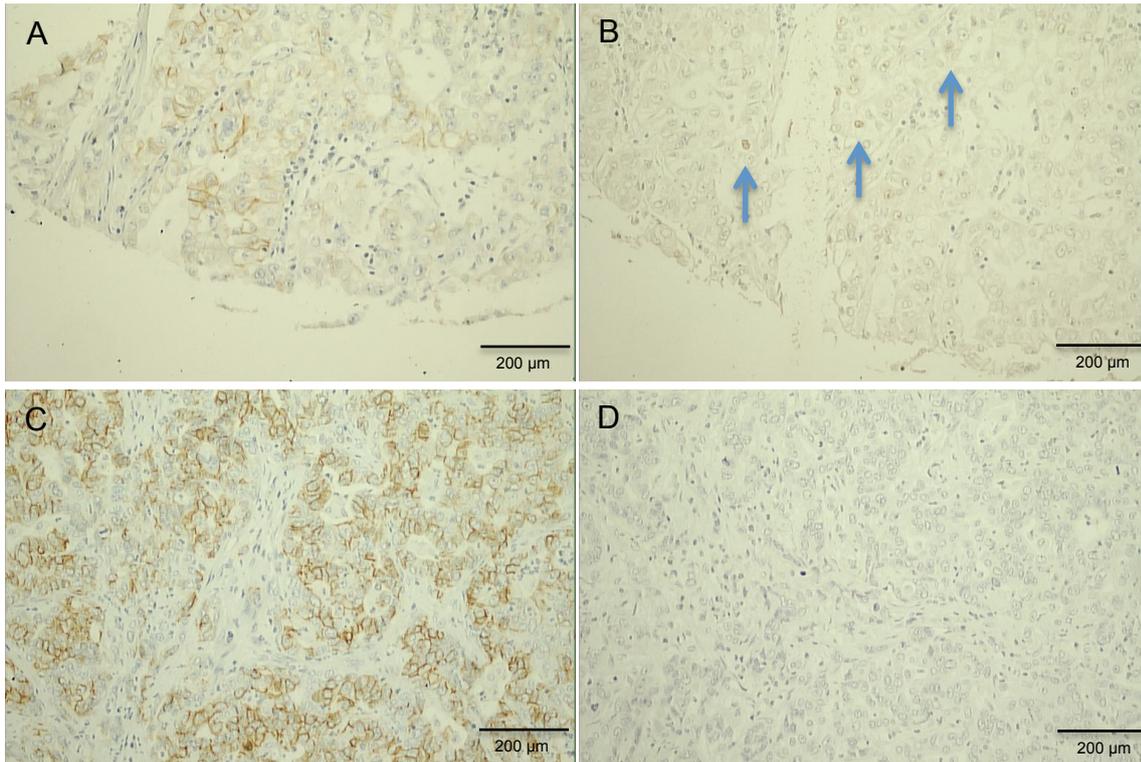


Abbildung 20: Lungenadenokarzinom (A,B) und Cholangiokarzinom (C, D). In A ist eine geringe LI-Cadherin Expression bei geringer Cdx2 Expression zu sehen (B, Pfeile), während eine Co-Expression von LI-Cadherin (C) und Cdx2 im Cholangiokarzinom (D) nicht festzustellen ist.

4. Diskussion

Das Zelladhäsionsmolekül LI-Cadherin wurde als erstes Mitglied der Familie der 7D-Cadherine 1994 im Darm und der Leber der Ratte beschrieben. Demgegenüber ist beim Menschen die physiologische Expression auf den Darm beschränkt. LI-Cadherin sorgt dort für eine stark calciumabhängige Adhäsion der lateralen Zellmembranen der intestinalen Epithelzellen und wird zum einen für die Differenzierung zu hochprismatischen Epithelien und für den interzellulären passiven Wassertransport mitverantwortlich gemacht [55, 98].

Eine ektope Expression von LI-Cadherin konnte bislang in mehreren malignen Neoplasien des Gastrointestinaltraktes gesehen werden, u.a. im Magenkarzinom und der intestinalen Metaplasie des Magens, im hepatozellulären Karzinom und im duktalem Pankreasadenokarzinom [77-79]. Desweiteren ist das kaudale intestinale Homeobox Protein Cdx2, welches ebenfalls als Biomarker für gastrointestinale Neoplasien gilt, als notwendiger Transkriptionsfaktor für die LI-Cadherin-Transkription beschrieben worden [75, 76].

In dieser Arbeit wurde das Potential der LI-Cadherin Expression als zellulärer Biomarker in Karzinomen der Lunge und Leber sowie in kolorektalen Karzinomen und deren Fernmetastasen untersucht.

4.1 LI-Cadherin Expression in Adenomen und Karzinomen des Kolons sowie in kolorektalen Fernmetastasen

LI-Cadherin wird sowohl in gesunden Darmepithelien als auch in Adenomen und Karzinomen des Kolons hochgradig exprimiert wird. In gesunden Darmepithelien als auch in Adenomen lag die Expression bei 100% der Patienten und war bei allen Patienten stark ausgeprägt. Auch in kolorektalen Karzinomen konnte eine starke Expression nachgewiesen werden. Insgesamt zeigten nur 3 der untersuchten Patientenproben mit kolorektalen Karzinomen keine Expression von LI-Cadherin. Diese drei Proben entstammten Patienten in Erkrankungsstadien mit Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen. Eine statistisch signifikante Assoziation mit einer geringeren LI-Cadherin-Expression ließ sich in den UICC-Stadien III und IV jedoch nicht nachweisen. Es zeigte sich lediglich ein Trend zu einer insgesamt schwächeren Expression von LI-Cadherin, insbesondere in UICC

Stadium IV. Während hier 71% aller untersuchten Patienten eine hochgradige Expression von LI-Cadherin aufwiesen, lag der relative Anteil einer starken LI-Cadherin-Expression in den UICC-Stadien I bis III jeweils über 90% (Abbildung 9, Tabelle 14).

Somit zeigt LI-Cadherin in der Karzinogenese und in fortgeschrittenen Stadien kolorektaler Karzinome – anders als angenommen – ein anderes Verhalten als E-Cadherin. Kolorektale Karzinome in metastasierten Stadien (UICC III und IV) weisen eine deutlich geringere Expression von E-Cadherin auf. Zusätzlich zeigen Karzinome in entdifferenzierteren Stadien eine geringe Expression von E-Cadherin, während es im Zuge der Epithelial-mesenchymalen Transition zu einem Cadherin-switch von E-Cadherin zu N-Cadherin kommt. Dem Verlust der adhäsiven Eigenschaften von E-Cadherin wurde hierbei von einigen Autoren eine entscheidende Rolle bei der Fähigkeit von Tumorzellen zu invasivem Wachstum und Metastasierung zugesprochen [67, 69, 70]. LI-Cadherin wird an intestinalen Epithelien zwar mit E-Cadherin co-exprimiert. LI-Cadherin und E-Cadherin sind an den Zellmembranen jedoch nicht co-lokalisiert [55]. LI-Cadherin scheint im Gegensatz zu E-Cadherin vom Prozess der Epithelial-mesenchymalen Transition nicht betroffen zu sein. Trotz der quantitativ gleich starken adhäsiven Eigenschaften von LI-Cadherin und E-Cadherin scheint eine alleinige Expression von LI-Cadherin somit kein Hindernis für invasives Wachstum und für Metastasierung darzustellen [62].

Diese These wird durch die durchweg hohe Expression von LI-Cadherin in Fernmetastasen kolorektaler Karzinome weiter gestützt. Von den 28 untersuchten Lebermetastasen waren alle LI-Cadherin positiv, während 16 von 18 kolorektalen Lungenmetastasen eine LI-Cadherin exprimierten. Auch hier zeigt sich ein Unterschied zu E-Cadherin, welches nicht nur in metastasierten Primärtumoren, sondern auch in den eigentlichen Metastasen stark herunterreguliert wird [66]. Im komplexen Prozess der Metastasierung ist neben den vielfältigen Vorgängen bei Invasion und Verlassen des Zellverbands mit Gewinn der migratorischen Fähigkeiten einer Zelle auch der Prozess der Adhäsion der metastatischen Tumorzelle im Zielgewebe noch weitgehend ungeklärt. Zu untersuchen bleibt, ob dem Zelladhäsionsmolekül LI-Cadherin bei diesem Prozess eine funktionelle Bedeutung zukommt.

In dieser Arbeit wurden lediglich 4 Gewebeproben aus primären kolorektalen Karzinomen und korrespondierenden Lebermetastasen untersucht. Alle 4 Proben zeigten über-

einstimmend eine hohe LI-Cadherin Expression sowohl im Primarius als auch in den Metastasen. Für den Nachweis der Persistenz einer LI-Cadherin Expression in Metastasen im Vergleich zum Primärtumor ist die Fallzahl zu gering. Es scheint bei der insgesamt hohen Expressionrate von LI-Cadherin in Fernmetastasen jedoch unwahrscheinlich zu sein, dass eine verminderte zelluläre Expression von LI-Cadherin im Primarius auch mit einer erhöhten Fernmetastasierungsrate korreliert, wie an anderer Stelle für Lymphknotenmetastasen beschrieben [82].

Für zukünftige Studien könnte eine Untersuchung zirkulierenden LI-Cadherins beispielsweise mit einem ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) nützlich sein. Auf diese Weise ist eine Messung des Proteins im Blut denkbar. Somit könnte LI-Cadherin als humoraler Biomarker genutzt werden und wäre in der Praxis durch eine einfache Blutentnahme leichter zugänglich als über invasive Verfahren zur Probenentnahme direkt aus Tumoren. Ähnliche Assays sind für N-Cadherin und E-Cadherin bereits vorhanden [99, 100]. Bei UICC Stadium III und IV kolorektalen Karzinomen und bei Patientin mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP), einer für das kolorektale Karzinom prädisponierenden erblichen Erkrankung, konnten im Serum erhöhte Werte löslichen E-Cadherins gemessen werden [100]. Es ist denkbar, dass auf Grund der höheren Sensitivität eines ELISAs stadienabhängige Unterschiede in der Konzentration von LI-Cadherin vorliegen könnten, auch wenn die Ergebnisse der Immunhistochemie in dieser Arbeit nicht darauf hinweisen. Somit gäbe es ein Werkzeug zur nichtinvasiven Stadienbestimmung kolorektaler Karzinome. Eine alleinig erhöhte Konzentration von LI-Cadherin bei kolorektalen Karzinomen würde immerhin die Möglichkeit eines Monitoring-Markers eröffnen, also eines Biomarkers, der im Erkrankungsfall Hinweise über das Therapieansprechen und mögliche Rezidive gibt. Aktuell wird vor allem das carcinoembryonale Antigen (CEA) als Monitoring-Marker bei Tumorerkrankungen bestimmt. Insbesondere bei Patienten ohne erhöhtes CEA könnte ein möglicher sensitiver Verlaufsparemeter hilfreich im Erkrankungsverlauf sein.

Die durchweg hohe Expressionsrate von LI-Cadherin in allen Stadien und Lokalisationen kolorektaler Karzinome könnte LI-Cadherin zu einem nützlichen Instrument in der Detektion von sogenannten disseminierten und zirkulierenden Tumorzellen machen. In unterschiedlichen Karzinomen, u.a. im kolorektalen Karzinom, konnten diese Zellen in geringer Zahl und bei einigen Patienten in hoher Persistenz bereits in frühen Stadien

detektiert werden. Dabei konnte das Vorhandensein dieser Zellen mit unterschiedlichen Prognoseindizes assoziiert werden. Weiterhin wird vermutet, dass zirkulierende Tumorzellen die Grundlage für mögliche Fernmetastasierung bilden [101]. Die hohe Expression von LI-Cadherin in allen Stadien kolorektaler Karzinome und Metastasen ließe vermuten, dass auch in zirkulierenden Tumorzellen LI-Cadherin exprimiert wird. Wenn es gelänge, LI-Cadherin in diesem Zusammenhang in einem einfachen Assay zu nutzen, könnten auch bei nicht metastasierten Stadien kolorektaler Karzinome im Idealfall Aussagen über Prognose und Metastasierungswahrscheinlichkeit getroffen werden. Entsprechend könnten Vorsorge- und therapeutische Maßnahmen (z.B. Intensität adjuvanter Chemotherapien) dem individuellen Patientenprofil angepasst werden.

4.2. LI-Cadherin Expression in Hepatozellulären Karzinomen

Entgegen den Ergebnissen von Wong et al. [79] konnte in dieser Arbeit keine Expression von LI-Cadherin in hepatozellulären Karzinomen festgestellt werden. Insgesamt wurden hepatozelluläre Karzinome von 21 Patientin immunhistochemisch und von weiteren 10 Patienten mittels Western Blot analysiert. Bei keiner der untersuchten Proben zeigte sich in diesem Kollektiv eine positive Expression von LI-Cadherin. Auch mit einem sensitiveren Antikörper als dem von Wong et al. eingesetzten und mit einer sensitiveren Proteindetektionsmethode, dem Western Blot, konnte in den hier durchgeführten Experimenten keine Expression von LI-Cadherin im humanen hepatozellulären Karzinom nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Daten mindestens einer anderen Arbeitsgruppe [102] und steht in scharfem Gegensatz zu den Ergebnissen von Wong et al. Dort wiesen in der Immunhistochemie etwa 80% aller Patienten eine positive LI-Cadherin Expression auf. Ein Grund für diese Diskrepanz könnte in den ethnischen Unterschieden der Patientin liegen, vorwiegend kaukasisch in der vorliegenden Arbeit und asiatisch in den von Wong et al. publizierten Daten. Diskrepanzen in der Expression von Proteinen in verschiedenen ethnischen Gruppen konnten in anderen Zusammenhängen beispielsweise für das Mammakarzinom und das Prostatakarzinom gezeigt werden [103, 104]. Wahrscheinlicher sind jedoch methodische Mängel bei Wong et al. In dieser Arbeit konnte auch für den Einsatz von anti-LI-Cadherin Antikörpern gezeigt werden, dass bei Anwendung der LSAB-Methode in der Immunhistochemie insbesondere in Lebergewebe es zu einer diffusen Anfärbung der Zellen kommt, wenn endoge-

nes Biotin nicht geblockt wird. Da zur Signalverstärkung die Bindung von Streptavidin an biotinylierte Antikörper genutzt wird, kommt es bei hoher Expression von Biotin in der Gewebeprobe zu einer diffusen Bindung des Streptavidins an das endogene Biotin und – wie in Abbildung 15 und 16 gezeigt – letztendlich zu einer diffusen zytoplasmatischen Anfärbung. Bei entsprechenden Blockprotokollen kann diese unspezifische Bindung deutlich unterdrückt werden, ohne dass ein tatsächlich positives Signal unterdrückt wird. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine Proteinexpression von LI-Cadherin in hepatozellulären Karzinomen beim Menschen nicht vorliegt.

4.3. LI-Cadherin Expression Cholangiokarzinomen

Zur Überprüfung der Expression von LI-Cadherin in Cholangiokarzinomen wurde zunächst die Expression in Tumoren auf einem Tissue-Micro-Array untersucht. Hier lagen keine weiteren Daten zur Lokalisation der Tumore vor (intrahepatisch, extrahepatisch, Tumore der Hepatikusgabel). Bei 17 von 54 Patientenproben (31,5%) konnte eine positive LI-Cadherin Expression nachgewiesen werden. Andere Arbeitsgruppen fanden eine positive Expression von LI-Cadherin in 27% bzw. 53% von Cholangiokarzinomen bei ähnlicher Kollektivgröße [102, 105].

Bei Mensch und Maus ist eine physiologische Expression von LI-Cadherin in der Leber nicht zu finden [55]. Während der Embryogenese der Maus existiert jedoch nach initialer Expression von LI-Cadherin im Darmepithel beginnend an Tag 12,5 auch eine transiente Expression im Ductus hepatocholedochus und im urogenitalen Sinus [65]. Entdifferenzierungsvorgänge im Rahmen der Karzinogenese könnten die erneute Expression von LI-Cadherin auch im humanen Cholangiokarzinom erklären.

Zur weiteren Evaluation der Expression von LI-Cadherin wurden zwei zuvor beschriebene Kollektive mit Klatskin Tumoren (60 Patienten) bzw. intrahepatischen Cholangiokarzinomen (110 Patienten) untersucht. Operationsmethodik und Überlebensdaten waren vergleichbar mit anderen Patientenkollektiven mit gleichen Diagnosen [88, 89]. Die Unterscheidung von Cholangiokarzinomen in unterschiedliche Entitäten hat nicht nur anatomische, sondern auch therapeutische Konsequenzen, da sich zum Beispiel die chirurgische Herangehensweise unterscheiden kann [106].

4.3.1 LI-Cadherin Expression in Klatskin-Tumoren – Korrelation mit Differenzierung und Infiltrationstiefe

Klatskin-Tumore machen etwa die Hälfte aller Cholangiokarzinome aus [107]. In dem hier untersuchten Kollektiv konnte in 28 von 60 Fällen (46,7%) eine positive LI-Cadherin Expression festgestellt werden. Im Gegensatz zum Expressionsmuster beim kolorektalen Karzinom war beim Klatskin Tumor deutlich häufiger eine schwache Expression festzustellen, nämlich in 78,6% der LI-Cadherin positiven Fälle.

In den statistischen Untersuchungen konnte eine signifikante Assoziation von LI-Cadherin Expression und Karzinomdifferenzierung festgestellt werden. Während 89% der LI-Cadherin exprimierenden Tumore gut bis mittelgradig differenziert waren, traf dies auf 66% der nicht-LI-Cadherin exprimierenden Tumore zu ($p=0,031$). Im Rezidiv waren LI-Cadherin exprimierende Tumore signifikant seltener von Fernmetastasen betroffen (7% gegenüber 37%, $p=0,006$). Demgegenüber war die Infiltrationstiefe bei LI-Cadherin exprimierenden Tumoren signifikant höher: 79% der LI-Cadherin exprimierenden Tumoren waren T3 Tumore, während dies auf nur 53% der nicht-LI-Cadherin exprimierenden Tumore zutraf ($p=0,039$). Bezüglich der Infiltrationstiefe bleibt anzumerken, dass T4-Tumore in diesem Patientenkollektiv nicht erfasst wurden. Grund dafür ist die Möglichkeit der kurativen Operation bei Einschluss der Patienten in dieses Studienkollektiv. Für zukünftige Untersuchungen wäre die Analyse des Expressionsgrades von LI-Cadherin bei T4-Tumoren jedoch hochinteressant. LI-Cadherin-Expression scheint ein Marker für eine bessere Differenzierung der Tumore und eine geringere Metastasierungshäufigkeit im Rezidiv zu sein. Eine Assoziation mit einer höherer Invasivität ist daher eher überraschend.

Eine signifikante Assoziation von LI-Cadherin Expression zum Gesamtüberleben oder krankheitsfreien Überleben zeigte sich in dieser Kohorte nicht. LI-Cadherin ist daher kein prognostischer Biomarker. Dennoch könnten prospektive Einsatzgebiete der LI-Cadherin Expression beim Klatskin-Tumor in der aggressiveren Suche nach Fernmetastasen in der postoperativen Nachsorge und unter Umständen sogar in einer radikaleren adjuvanten Therapie liegen, sollte ein Karzinom LI-Cadherin nicht exprimieren. Diese Fragestellung wird Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Wie in Kapitel 1.2.5 beschrieben, gibt es beispielsweise in der Therapie des kolorektalen Karzinoms oder des Lungenkarzinoms mit dem EGFR oder K-ras Markermoleküle, deren Mutationsstatus das Ansprechen bzw. Nicht-Ansprechen auf bestimmte Medikamente vorhersagen kann. Solche prädiktiven Biomarker machen einen gezielteren Einsatz von Medikamenten möglich und verhindern auf der anderen Seite eine unter Umständen nebenwirkungsträchtige „Über“-Therapie von Krebspatienten. Die Möglichkeiten des Einsatzes von LI-Cadherin als prädiktivem Biomarker könnten bei Klatskin-Patienten in prospektiven Therapiestudien mitevaluiert werden.

4.3.2 LI-Cadherin Expression in intrahepatischen Cholangiokarzinomen – ein prognostischer Biomarker

In biliären intraepithelialen Neoplasien intrahepatischer Cholangiokarzinome wurde eine LI-Cadherin-Expression zuvor bereits beschrieben [108]. Eine systematische Untersuchung mit Korrelation zu Patientendaten lag jedoch bislang nicht vor. Von den untersuchten 110 intrahepatischen Cholangiokarzinomen war in 47 Fällen (42,7%) eine positive LI-Cadherin-Expression festzustellen. Ähnlich den Klatskin Tumoren zeigte sich auch hier eine überwiegend schwache Expression in 66,0% der LI-Cadherin-positiven Fälle. Zwar war auch bei den intrahepatischen Cholangiokarzinomen eine Tendenz hin zu einer besseren Differenzierung der LI-Cadherin positiven Tumore zu erkennen (79% mit guter bis mittelgradiger Differenzierung gegenüber 68% der LI-Cadherin negativen Tumore). Allerdings war dieser Trend statistisch nicht signifikant ($p=0,223$). Demgegenüber zeigten sich Hinweise für eine Assoziation zwischen Gesamtüberleben und LI-Cadherin Expression. Zwar lebten nach einem Jahr in der LI-Cadherin positiven Gruppe mit 57,1% noch relativ mehr Patienten als in der LI-Cadherin negativen Gruppe (53,1%), doch diese Tendenz kehrte sich nach drei Jahren und fünf Jahren um: nach drei Jahren waren in der LI-Cadherin positiven Gruppe noch 11,3% der Patienten am Leben und nach fünf Jahren keiner der Patienten, während in der LI-Cadherin negativen Gruppen diese Zahlen bei 28,7% nach drei Jahren und 24,6% nach 5 Jahren lagen ($p=0,249$). Noch deutlicher wurde diese Tendenz beim krankheitsfreien Überleben: In der LI-Cadherin positiven Gruppe waren nach einem Jahr 31,2% der Patientin krankheitsfrei gegenüber 52,6% in der Gruppe LI-Cadherin negativer Patienten. Nach 3 bzw. 5 Jahren hatten alle Patienten in der LI-Cadherin positiven Gruppe einen Progress der Erkrankung, während in der LI-Cadherin negativen Gruppe nach 3 Jahren 27,7% und

nach 5 Jahren 23,2% erkrankungsfrei waren. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant ($p=0,038$). LI-Cadherin ist somit ein zellulärer prognostischer Biomarker für das krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit intrahepatischen Cholangiokarzinomen.

Bei Patienten mit intrahepatischen Cholangiokarzinomen ist zu überlegen, ob eine engmaschigere Nachsorge und eine aggressivere adjuvante Chemotherapie bei Patienten mit LI-Cadherin-exprimierenden Tumoren den möglichen Überlebensnachteil ausgleichen kann. Dies sollte in zukünftigen Studien ebenso untersucht werden, wie der mögliche Einsatz von LI-Cadherin als prädiktivem Biomarker.

In den verschiedenen Entitäten von Cholangiokarzinomen zeigten sich in dieser Arbeit unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des krankheitsfreien Überlebens. In Klatskin-Tumoren war eine Tendenz zu einem längeren krankheitsfreien Überleben zu erkennen, während sich bei intrahepatischen Cholangiokarzinomen ein statistisch signifikanter Unterschied zu Ungunsten einer LI-Cadherin Expression in Hinblick auf das krankheitsfreie Überleben nachweisen ließ. Die verschiedenen Entitäten von Cholangiokarzinomen unterschieden sich in ihrer anatomischen Lokalisation und werden zum Teil chirurgisch unterschiedlich therapiert. Die Assoziation eines ektop exprimierten Zelladhäsionsmoleküls mit divergierendem outcome in dieser Arbeit legen zusätzlich Spekulationen über Unterschiede in der Onkogenese von intrahepatischen Cholangiokarzinomen und Klatskin-Tumoren nahe.

4.4 LI-Cadherin als zellulärer Staging-Marker in der Leber

Sowohl die Expression von LI-Cadherin in allen 28 untersuchten kolorektalen Lebermetastasen als auch die fehlende Expression von LI-Cadherin in HCCs waren unerwartet. Für die Diskriminierung dieser beiden Tumorentitäten wäre LI-Cadherin nach den Daten dieser Arbeit ein hervorragender zellulärer Staging Marker. Die entsprechende Differentialdiagnose stellt Kliniker und Pathologen in der Regel jedoch nicht vor allzu große Schwierigkeiten. In dieser Arbeit wurden insgesamt 224 Cholangiokarzinome auf LI-Cadherin Expression untersucht, das bis heute größte Kollektiv. Betrachtet man alle Cholangiokarzinome, die in dieser Arbeit untersucht wurden, so waren von insgesamt 224 Tumoren 92 LI-Cadherin positiv. Zwar war auch der Unterschied in der Expression von LI-Cadherin sowohl im Vergleich von kolorektalen Karzinometastasen zu Cholangi-

okarzinomen als auch von hepatozellulären Karzinomen und Cholangiokarzinomen statistisch hochsignifikant, Sensitivität und positiv prädiktiver Wert lagen jedoch für die Diagnose von kolorektalen Metastasen jeweils bei nur 23% und für HCCs jeweils bei 19%. Dies lag zum einen an der unterschiedlichen Stichprobengröße der Gruppen (deutlich mehr untersuchten Cholangiokarzinomen), zum anderen aber auch an der relativ gleichen Verteilung von LI-Cadherin-positiven und -negativen Cholangiokarzinomen. Letztendlich lässt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit bei LI-Cadherin positiven Proben aus der Leber ein HCC ausschließen. Potential als zellulärer Staging-Marker für die untersuchten Tumorentitäten in der Leber besteht jedoch für LI-Cadherin nur, wenn Cholangiokarzinome in der Fragestellung keine mögliche Differentialdiagnose darstellen.

4.5 LI-Cadherin als zellulärer Staging-Marker in der Lunge

In primären Lungenkarzinomen zeigte sich in den insgesamt untersuchten 54 Patientenproben bei 2 von 27 Patienten (7,4%) mit Lungenadenokarzinomen LI-Cadherin-Positivität. Die übrigen Proben (22 Plattenepithelkarzinome, 4 kleinzellige Lungenkarzinome) waren wie erwartet LI-Cadherin negativ.

Die Fragestellung der histopathologischen Unterscheidung von kolorektalen Lungenmetastasen und primären Adenokarzinomen der Lunge hat mehrere klinisch relevante Hintergründe. Zum einen unterscheiden sich Therapie und Prognose wie in Kapitel 1.1.4 beschrieben zwischen nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen und kolorektalen Karzinomen erheblich. Zum anderen ist die Zuordnung eines oder mehrerer Lungenrundherde zu einer Tumorentität klinisch nicht immer leicht. Lungenrundherde können primäre Lungenkarzinome oder Metastasen unterschiedlicher Primärkarzinome sein. Dabei besteht die Möglichkeit, dass der Primarius in der Bildgebung und in anderen gerätetechnischen Untersuchungen entweder nicht offensichtlich oder es handelt sich um ein Rezidiv nach bereits zurückliegender Entfernung eines Primarius. Schließlich können Patienten sowohl an einem kolorektalen Karzinom als auch an einem Lungenkarzinom erkranken. Gerade die histopathologische Differentialdiagnose von Lungenadenokarzinomen und Adenokarzinometastasen kann hierbei schwierig sein [109]. Bislang wurden als histopathologische Staging-Marker meist Zytokeratine eingesetzt. Dabei ist vor allem die Ratio der Zytokeratine CK 7 und CK 20 entscheidend. Während CK 20 in über

90% aller kolorektalen Karzinome exprimiert wird, ist es nur in etwa 8% von Lungenadenokarzinomen zu finden, wobei diese Zahl bei metastasierten Lungenadenokarzinomen auf bis zu 20% ansteigt. CK 7 wird in 16% aller kolorektalen Karzinome und über 95% aller Lungenkarzinome exprimiert. Kolorektale Karzinome sind in 78% der Fälle CK 20 positiv und CK 7 negativ, Lungenadenokarzinome umgekehrt in 84% der Fälle CK 20 negativ und CK 7 positiv [29]. Dennoch sehen einige Autoren eine nicht ausreichende Sensitivität zur Differentialdiagnose mittels Zytokeratinen, so dass in der Vergangenheit zusätzliche Biomarker vorgeschlagen wurden, z.B. der thyreoidale Transkriptionsfaktor 1 (TTF-1) oder das intestinale homeobox Protein Cdx2, welches auch Transkriptionsfaktor für die Transkription von LI-Cadherin ist [109, 110].

Auch LI-Cadherin könnte bei der Differentialdiagnose von Lungenadenokarzinomen und kolorektalen Lungenmetastasen von Nutzen sein. In dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv waren 88,9% aller kolorektalen Lungenmetastasen und nur 7,4% der Lungenadenokarzinome LI-Cadherin positiv. Dieser Unterschied war statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$). LI-Cadherin konnte kolorektale Lungenmetastasen mit einer Sensitivität von 88,9%, einer Spezifität von 92,6% und einem positiv prädiktiven Wert von 88,9% erkennen. Auch für Cdx2 zeigte sich in diesem Kollektiv ein hochsignifikanter Unterschied zwischen kolorektalen Lungenmetastasen und Lungenadenokarzinomen. Während die Sensitivität von Cdx2 für diese Fragestellung mit 77,8% niedriger war als die von LI-Cadherin, waren Spezifität (96,3%) und positiv prädiktiver Werte (93,3%) geringfügig höher. Natürlich bedürfen diese Daten der Validierung in größeren und vor allem vergleichenden Studien. Jedoch scheint LI-Cadherin ein dem Cdx2 mindestens ebenbürtiger potentieller zellulärer Staging Marker für kolorektale Karzinometastasen in der Lunge zu sein.

4.6 LI-Cadherin und Cdx2 Co-Expression

Zur Bestätigung der These, dass für die Expression von LI-Cadherin das intestinale Homeoboxprotein Cdx2 ein notwendiger Transkriptionsfaktor ist [75], wurden in einigen der untersuchten Kollektive in konsekutiven histologischen Schnitten immunhistochemische Färbungen gegen Cdx2 und LI-Cadherin durchgeführt. In 94,6% der Fälle von kolorektalen Karzinomen und Metastasen und Lungenadenokarzinomen (insgesamt 149 Proben) zeigte sich eine konkordante Expression von LI-Cadherin und Cdx2, d.h. die

Proben waren entweder LI-Cadherin positiv und Cdx2 positiv oder LI-Cadherin negativ und Cdx2 negativ. Nur 4% oder 6 Proben waren LI-Cadherin positiv und Cdx2 negativ und nur 1,3% der Proben waren Cdx2 positiv und LI-Cadherin negativ. Diese hohe Konkordanz war erwartet.

Überraschend waren die Ergebnisse bezüglich der Co-Expression von LI-Cadherin und Cdx2 in Cholangiokarzinomen. Hier war in keiner der Proben reproduzierbar und mit entsprechenden Positivkontrollen in den Färbeserien eine Cdx2-Expression nachweisbar. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre die Existenz von anderen Transkriptionsfaktoren, die hinreichend für eine LI-Cadherin-Transkription wären und auch erklären würden, warum immerhin 4% der Kolon- und Lungenkarzinomproben ebenfalls LI-Cadherin positiv und Cdx2 negativ waren. Ein solcher Faktor könnte der Hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1 α) sein [76]. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse und Hypothesen auch mit sensitiveren Methoden ist jedoch dringend indiziert und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

4.7 Fazit und Ausblick

LI-Cadherin zeigt im Fortschreiten kolorektaler Karzinome im Gegensatz zu E-Cadherin keine Herunterregulierung. In kolorektalen Fernmetastasen der Lunge bleibt LI-Cadherin hochreguliert und bietet einen möglichen zellulären Screeningmarker zur Diskriminierung kolorektaler Lungenmetastasen von Lungenadenokarzinomen. In etwaigen zukünftigen Studien ist hier zu bedenken, dass auch in Fernmetastasen anderer gastrointestinaler Adenokarzinome (Magen-, Pankreas und Cholangiokarzinomen) eine LI-Cadherin Expression möglich ist.

Entgegen der bisher geltenden Datenlage konnte gezeigt werden, dass in hepatozellulären Karzinomen LI-Cadherin nicht exprimiert wird. Im Gegensatz dazu wird in Klatskin Tumoren eine Korrelation mit Differenzierung, Infiltrationstiefe und Metastasierung im Rezidiv und in intrahepatischen Cholangiokarzinomen mit vermindertem krankheitsfreiem Überleben beobachtet, LI-Cadherin ist hier ein potentiell prognostischer Biomarker.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit Proben von 475 Patienten untersucht. Die zufällig ausgewählten Patienten zeigten in einigen Gesichtspunkten in den unterschiedlichen

Kohorten Diskrepanzen zum Median der erkrankten Gesamtbevölkerung, wie zum Beispiel bei der ungleichen Geschlechterverteilung beim kolorektalen Karzinom und dessen Fernmetastasen zu sehen ist. Zur endgültigen Etablierung der vorgeschlagenen Biomarkerfähigkeiten von LI-Cadherin ist daher in den Folgestudien nicht nur auf einen repräsentativen Patientenschnitt zu achten, sondern auch in vielen der Unterkohorten auf größere Fallzahlen. Desweiteren ist ein Vergleich mit etablierten oder anderen vorgeschlagenen Markern nicht nur für den Einsatz als Screening Marker zur Diskriminierung von Fernmetastasen und Primärtumoren beispielsweise in der Lunge sinnvoll. Auch vergleichende Studien mit möglichen anderen prognostischen Markern für die unterschiedlichen Formen des Cholangiokarzinoms sollten in Zukunft durchgeführt werden [111].

Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits erwähnt, bieten sich darüber hinaus aus den qualitativen Ergebnissen dieser Arbeit heraus Vorlagen zur Evaluation von LI-Cadherin als prädiktivem Biomarker in der Chemotherapie des Cholangiokarzinoms.

Desweiteren könnte die Etablierung eines Assays zur Nutzung von LI-Cadherin als humoralem Marker, beispielsweise in Form eines ELISA, erfolgversprechend sein. Andererseits könnten unter Umständen auch früh zirkulierende Tumorzellen gemessen werden und die in dieser Arbeit gesehene Tendenz zu einer geringeren Expression von LI-Cadherin in primären kolorektalen Karzinomen höheren UICC-Stadiums könnte objektiviert werden.

Letztlich sind neben der Etablierung von LI-Cadherin als Biomarker weitere funktionelle Untersuchungen in Zukunft notwendig, um die Frage eines therapeutischen Potentials dieses Zelladhäsionsmoleküls bei nun vielfach gezeigter ektopter Expression in humanen Krebserkrankungen beantworten zu können.

5 Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
2. *Krebs in Deutschland 2007/2008.* 8 ed: Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; Berlin, 2012.
3. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(6):366-78.
4. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer.* 2010;46(4):765-81.
5. Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002;31(4):925-43.
6. Center MM, Jemal A. International trends in liver cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(11):2362-8.
7. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2012;379(9822):1245-55.
8. Singh P, Patel T. Advances in the diagnosis, evaluation and management of cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol.* 2006;22(3):294-9.
9. Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 2011;54(1):173-84.
10. Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung cancer. *The Lancet.* 2000;355(9202):479-85.
11. van Meerbeeck JP, Fennell DA, De Ruyscher DK. Small-cell lung cancer. *Lancet.* 2011;378(9804):1741-55.
12. Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, et al. Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer: interdisciplinary guideline of the German Respiratory Society and the German Cancer Society. *Pneumologie.* 2011;65(1):39-59.
13. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, International Union against Cancer., ebrary Inc. *TNM classification of malignant tumours.* 7th ed. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell,; 2009:1 online resource.
14. Tannapfel A, Wittekind C. [The current TNM system for gastrointestinal tumors part II]. *Pathologe.* 2010;31(5):348-52.
15. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic basis of disease.* 6. ed ed. Philadelphia [u.a.]: Saunders; 1999.
16. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319(9):525-32.
17. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-67.
18. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut.* 2011;60(1):116-29.
19. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;768:101-10.
20. de Sousa EM, Vermeulen L, Richel D, Medema JP. Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells. *Clin Cancer Res.* 2011;17(4):647-53.
21. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;360(14):1408-17.
22. Fauci AS. *Harrison's principles of internal medicine : editors, Anthony S. Fauci ... [et al.].* 17th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2008.

23. Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, et al. [Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]. *Z Gastroenterol.* 2008;46(8):799-840.
24. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol.* 2009;27(12):2091-6.
25. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95.
26. Scharnagl H ST, März W. Biomarker in Forschung und Diagnostik. In: Götte D, Endres S., Bertsch K., ed. *Biomarker: Bedeutung für den medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung* First ed. Stuttgart: Schattauer; 2008:17-22.
27. Wolter C, Luppä P, Breul Jr, et al. *Humorale Tumormarker: Praxisorientierte Vorschläge für ihren effizienten Einsatz.* *Dtsch Arztebl International.* 1996;93(50):3346-.
28. Puntmann VO. How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease. *Postgrad Med J.* 2009;85(1008):538-45.
29. Tot T. Cytokeratins 20 and 7 as biomarkers: usefulness in discriminating primary from metastatic adenocarcinoma. *European Journal of Cancer.* 2002;38(6):758-63.
30. Kroll W. Biomarkers - Predictors, Surrogate parameters - A Concept Definition In: Götte D, Endres S., Bertsch K., ed. *Biomarker: Bedeutung für den medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung* First ed. Stuttgart: Schattauer; 2008:1-14.
31. Greene KL, Albertsen PC, Babaian RJ, et al. Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. *J Urol.* 2009;182(5):2232-41.
32. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006;66(8):3992-5.
33. McDermott U, Settleman J. Personalized cancer therapy with selective kinase inhibitors: an emerging paradigm in medical oncology. *J Clin Oncol.* 2009;27(33):5650-9.
34. Inoue Y, Saigusa S, Iwata T, et al. The prognostic value of KRAS mutations in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2012;28(5):1579-84.
35. Kang H, Min BS, Lee KY, et al. Loss of E-cadherin and MUC2 expressions correlated with poor survival in patients with stages II and III colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(3):711-9.
36. Lamerz R, Stieber P. [Tumour markers]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2004;129(50):2722-30.
37. Henß H, Berger, DP. Tumormarker. In: Berger D, Engelhardt, R, Mertelsmann, R, ed. *Das rote Buch.* 4 ed. Heidelberg: ecomed Medizin; 2010:89-91.
38. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 1996;84(3):345-57.
39. Smith CW. 3. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(2 Suppl):S375-9; quiz S414.
40. Joseph-Silverstein J, Silverstein RL. Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest.* 1998;16(3):176-82.
41. Zimmermann P, David G. The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB J.* 1999;13 Suppl:S91-S100.

42. Blobel CP, White JM. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. *Curr Opin Cell Biol.* 1992;4(5):760-5.
43. Takeichi M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol.* 1977;75(2 Pt 1):464-74.
44. Edelman GM. Expression of cell adhesion molecules during embryogenesis and regeneration. *Exp Cell Res.* 1985;161(1):1-16.
45. Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:283-323.
46. Nair KS, Naidoo R, Chetty R. Expression of cell adhesion molecules in oesophageal carcinoma and its prognostic value. *J Clin Pathol.* 2005;58(4):343-51.
47. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110(6):673-87.
48. McEver RP. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(5):581-6.
49. Saito M, Tucker DK, Kohlhorst D, Niessen CM, Kowalczyk AP. Classical and desmosomal cadherins at a glance. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 11):2547-52.
50. Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 4):625-6.
51. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(8):622-34.
52. Cavallaro U, Dejana E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(3):189-97.
53. Shapiro L, Weis WI. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(3):a003053.
54. Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Peifer M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(2):91-100.
55. Gessner R, Tauber R. Intestinal cell adhesion molecules. Liver-intestine cadherin. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;915:136-43.
56. Green KJ, Simpson CL. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol.* 2007;127(11):2499-515.
57. Simpson CL, Patel DM, Green KJ. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(9):565-80.
58. Sano K, Tanihara H, Heimark RL, et al. Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J.* 1993;12(6):2249-56.
59. Morishita H, Yagi T. Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(5):584-92.
60. Frank M, Kemler R. Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(5):557-62.
61. Wendeler MW, Jung R, Himmelbauer H, Gessner R. Unique gene structure and paralogy define the 7D-cadherin family. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(13):1564-73.
62. Wendeler MW, Praus M, Jung R, et al. Ksp-cadherin is a functional cell-cell adhesion molecule related to LI-cadherin. *Exp Cell Res.* 2004;294(2):345-55.
63. Kreft B, Berndorff D, Bottinger A, et al. LI-cadherin-mediated cell-cell adhesion does not require cytoplasmic interactions. *J Cell Biol.* 1997;136(5):1109-21.
64. Thomson RB, Aronson PS. Immunolocalization of Ksp-cadherin in the adult and developing rabbit kidney. *Am J Physiol.* 1999;277(1 Pt 2):F146-56.

65. Angres B, Kim L, Jung R, Gessner R, Tauber R. LI-cadherin gene expression during mouse intestinal development. *Dev Dyn.* 2001;221(2):182-93.
66. van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(23):3756-88.
67. Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1198(1):11-26.
68. Carneiro F, Oliveira C, Suriano G, Seruca R. Molecular pathology of familial gastric cancer, with an emphasis on hereditary diffuse gastric cancer. *J Clin Pathol.* 2008;61(1):25-30.
69. Stemmler MP. Cadherins in development and cancer. *Mol Biosyst.* 2008;4(8):835-50.
70. Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):a003129.
71. Berndorff D, Gessner R, Kreft B, et al. Liver-intestine cadherin: molecular cloning and characterization of a novel Ca²⁺-dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine. *J Cell Biol.* 1994;125(6):1353-69.
72. Zitt A. Klonierung und Charakterisierung des humanen LI-Cadherins. Freie Universität; 1997.
73. Wendeler MW, Drenckhahn D, Gessner R, Baumgartner W. Intestinal LI-cadherin acts as a Ca²⁺-dependent adhesion switch. *J Mol Biol.* 2007;370(2):220-30.
74. Coskun M, Troelsen JT, Nielsen OH. The role of CDX2 in intestinal homeostasis and inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(3):283-9.
75. Hinoi T, Lucas PC, Kuick R, et al. CDX2 regulates liver intestine-cadherin expression in normal and malignant colon epithelium and intestinal metaplasia. *Gastroenterology.* 2002;123(5):1565-77.
76. Zhu R, Wong KF, Lee NP, Lee KF, Luk JM. HNF1alpha and CDX2 transcriptional factors bind to cadherin-17 (CDH17) gene promoter and modulate its expression in hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem.* 2010;111(3):618-26.
77. Grotzinger C, Kneifel J, Patschan D, et al. LI-cadherin: a marker of gastric metaplasia and neoplasia. *Gut.* 2001;49(1):73-81.
78. Takamura M, Sakamoto M, Ino Y, et al. Expression of liver-intestine cadherin and its possible interaction with galectin-3 in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Sci.* 2003;94(5):425-30.
79. Wong BW, Luk JM, Ng IO, et al. Identification of liver-intestine cadherin in hepatocellular carcinoma--a potential disease marker. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311(3):618-24.
80. Inoue M, Ajioka Y, Wakai T, et al. Liver-intestine cadherin in intraepithelial neoplasia of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2011;58(112):2045-51.
81. Wendeler MW. Charakterisierung der molekularen Bindungseigenschaften von 7D-Cadherinen. Freie Universität Berlin; 2003.
82. Takamura M, Ichida T, Matsuda Y, et al. Reduced expression of liver-intestine cadherin is associated with progression and lymph node metastasis of human colorectal carcinoma. *Cancer Lett.* 2004;212(2):253-9.
83. Park SS, Kang SH, Park JM, et al. Expression of liver-intestine cadherin and its correlation with lymph node metastasis in gastric cancer: can it predict N stage preoperatively? *Ann Surg Oncol.* 2007;14(1):94-9.

84. Ko S, Chu KM, Luk JM, et al. Overexpression of LI-cadherin in gastric cancer is associated with lymph node metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319(2):562-8.
85. Ko S, Chu KM, Luk JM, et al. CDX2 co-localizes with liver-intestine cadherin in intestinal metaplasia and adenocarcinoma of the stomach. *J Pathol.* 2005;205(5):615-22.
86. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998;4(7):844-7.
87. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest.* 1986;55(2):244-8.
88. Thelen A, Jonas S, Benckert C, et al. Tumor-associated lymphangiogenesis correlates with prognosis after resection of human hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2009;16(5):1222-30.
89. Thelen A, Scholz A, Weichert W, et al. Tumor-associated angiogenesis and lymphangiogenesis correlate with progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(5):1123-32.
90. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85.
91. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
92. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4.
93. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(7):3116-20.
94. Boenisch T, Henne C, DakoCytomation GmbH. *Handbuch immunchemische Färbemethoden.* 3. Aufl ed. Hamburg; 2003.
95. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol.* 1993;171(2):83-98.
96. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 1991;39(6):741-8.
97. Wood GS, Warnke R. Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *J Histochem Cytochem.* 1981;29(10):1196-204.
98. Ahl M, Weth A, Walcher S, Baumgartner W. The function of 7D-cadherins: a mathematical model predicts physiological importance for water transport through simple epithelia. *Theor Biol Med Model.* 2011;8:18.
99. De Wever O, Derycke L, Hendrix A, et al. Soluble cadherins as cancer biomarkers. *Clin Exp Metastasis.* 2007;24(8):685-97.
100. Weiss JV, Klein-Scory S, Kubler S, et al. Soluble E-cadherin as a serum biomarker candidate: elevated levels in patients with late-stage colorectal carcinoma and FAP. *Int J Cancer.* 2011;128(6):1384-92.
101. Steinert G, Scholch S, Koch M, Weitz J. Biology and significance of circulating and disseminated tumour cells in colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 2012;397(4):535-42.

102. Panarelli NC, Yantiss RK, Yeh MM, Liu Y, Chen YT. Tissue-specific cadherin CDH17 is a useful marker of gastrointestinal adenocarcinomas with higher sensitivity than CDX2. *Am J Clin Pathol.* 2012;138(2):211-22.
103. Porter PL, Lund MJ, Lin MG, et al. Racial differences in the expression of cell cycle-regulatory proteins in breast carcinoma. *Cancer.* 2004;100(12):2533-42.
104. Thatai LC, Banerjee M, Lai Z, Vaishampayan U. Racial disparity in clinical course and outcome of metastatic androgen-independent prostate cancer. *Urology.* 2004;64(4):738-43.
105. Su MC, Yuan RH, Lin CY, Jeng YM. Cadherin-17 is a useful diagnostic marker for adenocarcinomas of the digestive system. *Mod Pathol.* 2008;21(11):1379-86.
106. Wiedmann M, Schoppmeyer K, Witzigmann H, et al. [Current diagnostics and therapy for carcinomas of the biliary tree and gallbladder]. *Z Gastroenterol.* 2005;43(5):473-5.
107. Patel T. Cholangiocarcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2006;3(1):33-42.
108. Takamura M, Yamagiwa S, Wakai T, et al. Loss of liver-intestine cadherin in human intrahepatic cholangiocarcinoma promotes angiogenesis by up-regulating metal-responsive transcription factor-1 and placental growth factor. *Int J Oncol.* 2010;36(1):245-54.
109. Chhieng DC, Cangiarella JF, Zakowski MF, et al. Use of thyroid transcription factor 1, PE-10, and cytokeratins 7 and 20 in discriminating between primary lung carcinomas and metastatic lesions in fine-needle aspiration biopsy specimens. *Cancer.* 2001;93(5):330-6.
110. Saad RS, Cho P, Silverman JF, Liu Y. Usefulness of Cdx2 in separating mucinous bronchioloalveolar adenocarcinoma of the lung from metastatic mucinous colorectal adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2004;122(3):421-7.
111. Briggs CD, Neal CP, Mann CD, et al. Prognostic molecular markers in cholangiocarcinoma: a systematic review. *Eur J Cancer.* 2009;45(1):33-47.

6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Deepak Vangala versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "LI-Cadherin als potentieller Biomarker bei Krebserkrankungen von Darm, Leber und Lunge" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Deepak B. Vangala hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Vangala DB, Lage H, Thelen A, Jonas S, Geßner R: LI-cadherin expression in distant metastases of colorectal carcinoma: A potential differentiation marker. J Clin Oncol 28, 2010 (suppl; abstr e14087). 2010 ASCO annual meeting.

Beitrag im Einzelnen: Experimentelle Arbeit, Anfertigung und Einreichen des Abstracts

Publikation 2: Vangala DB, Lage H, Thelen A, Jonas S, Geßner R: LI-cadherin ist ein Differenzierungsmarker von Hepatozellulären- und Cholangiokarzinomen. FV104, Onkologie 2010;33(suppl 2): 12

Beitrag im Einzelnen: Experimentelle Arbeit, Anfertigung des Vortragsmanuskripts und Abstracts, Vortrag beim Deutschen Krebskongress 2010, Berlin

Publikation 3: Vangala DB, Lage H, Dietel C, Thelen A, Benckert C, Jonas S, Geßner R, , *LI-cadherin: a differentiation marker for colorectal lung and liver metastases*. 7th Leipzig research festival for life sciences, 12. Dezember 2008, Leipzig, Germany. Herausgeber: J. Thiery, A. Beck-Sickinger, T. Arendt. Verlag: Universität Leipzig.

Beitrag im Einzelnen: Experimentelle Arbeit, Mitarbeit bei der Postererstellung

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8 Publikationsliste

Vangala DB, Schmiegel W, Pox C, Dyspnea and weight loss in a 70-year-old man. Internist (Berlin), June 2013, e-pub ahead of print.

Abstracts und Posterbeiträge

Vangala DB, Lage H, Thelen A, Jonas S, Geßner R: LI-cadherin expression in distant metastases of colorectal carcinoma: A potential differentiation marker. J Clin Oncol 28, 2010 (suppl; abstr e14087). 2010 ASCO annual meeting.

Vangala DB, Lage H, Thelen A, Jonas S, Geßner R: LI-cadherin ist ein Differenzierungsmarker von Hepatozellulären- und Cholangiokarzinomen. FV104, Onkologie 2010;33(suppl 2): 12

Vangala DB, Lage H, Dietel C, Thelen A, Benckert C, Jonas S, Geßner R: *LI-cadherin: a differentiation marker for colorectal lung and liver metastases*. 7th Leipzig research festival for life sciences, 12. Dezember 2008, Leipzig, Germany. Herausgeber: J. Thiery, A. Beck-Sickinger, T. Arendt. Verlag: Universität Leipzig.

Vangala DB, Lage H, Jonas S, Geßner R: *LI-cadherin is a differentiation marker for hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma*. Max-Hirsch-Programm 2007, DRFZ Berlin, 13. Januar 2007, Berlin, Germany.

Weimann A, Gross M, Danevad M, Feineis S, Vangala DB, Geßner R, *Transcriptional Regulation of the LI-cadherin Gene and Its Potential Role in Metaplasia of the Stomach and Gastric Adenocarcinoma*. Annual Meeting of the DGKL e.v., 22.-24.11.2004, Düsseldorf, Germany.

9 Danksagungen

Ich danke allen Menschen, die mich auf dem langen und nicht immer einfachen Weg dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben. Insbesondere danke ich Silke Feineis, Corinna Dietel, Armin Thelen und Markus Wendeler für die methodische Unterstützung und Hermann Lage und Sven Jonas für ihre Hilfe bei der Beschaffung von Proben. Dank geht an die gesamte "nette Truppe" für Spaß und Freude an der experimentellen Arbeit. Vielen Dank an Reinhard Geßner für die Betreuung dieser Doktorarbeit.

Ich danke Eckart Köttgen für die Möglichkeit der Nutzung der Laborräume des ILP und Andreas von Deimling und seiner Arbeitsgruppe für essentiellen Input bezüglich der Immunhistochemie.

Ganz besonders möchte ich Wolff Schmiegel danken für die Hilfe, diese Arbeit entgegen aller Widerstände zum Abschluss bringen zu können und mich wissenschaftlich zu unterstützen - auch ohne Dokortitel.

Letztendlich gibt es aber die Menschen, die einem bedingungslos zu Seite stehen und ohne deren moralische Unterstützung diese Arbeit nur schwer und vieles andere im Leben gar nicht zu Stande gekommen wäre: die anderen fünf der Berliner 6, Stefan (Danke für's Manuskript lesen), die Westhofener, Mama, Papa, Suman und natürlich Püppa: Danke!