

Aus der
Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Tenascin-C und Neurotensin-Rezeptor-1 als
Markermoleküle des Ösophaguskarzinoms**

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)
vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Markus Helmut Friedrich Peuckert
aus Dinslaken

Datum der Promotion: 22.06.2014

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	5
Zusammenfassung / Abstract.....	6
1. Einleitung	9
1.1 Tumormarker, Tumordiagnostik und Therapie.....	9
1.2 Der Neurotensinrezeptor-1.....	12
1.2.1 Neurotensin und der Neurotensinrezeptor-1, physiologische Bedeutung.	12
1.2.2 Der Neurotensinrezeptor-1 in Tumoren.....	13
1.3 Tenascin-C.....	15
1.3.1 Tenascin-C, Aufbau und physiologische Bedeutung.....	5
1.3.2 Tenascin-C in malignen Tumoren.....	16
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Gewebe.....	20
2.1.2 Zellen.....	20
2.1.3 Medien.....	21
2.1.4 Antikörper.....	22
2.1.5 Radioaktiv markierte Peptide.....	23
2.1.6 Lösungen die bei mehreren Methoden verwendet wurden.....	23
2.1.7 Western Blot.....	25
2.1.8 Proteine.....	26
2.1.8 Verwendete Chemikalien.....	26
2.2 Methoden.....	28
2.2.1 Immunhistochemie.....	28
2.2.1.1 Vorbehandlung von paraffinierten Schnitten.....	28
2.2.1.2 Fixierung von gefrorenen Schnitten.....	28
2.2.1.3 Immunhistologie nach der APAAP Methode.....	29

2.2.1.4 Immunhistologie nach der ABC-Methode.....	30
2.2.1.5 Auswertung der Immunhistochemie.....	31
2.2.2 Zellkultur.....	31
2.2.3 Transfektion.....	32
2.2.4 Immunfluoreszenz Zellkulturen.....	32
2.2.5 Proteinlysate aus Zellkulturen.....	33
2.2.6 Proteinlysate aus Geweben.....	33
2.2.7 Western-Blot.....	34
2.2.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	34
2.2.7.2 Western-Blot.....	35
2.2.8 Autoradiographie.....	35
2.2.9 Statistische Tests.....	36
3. Ergebnisse.....	38
3.1. Neurotensin-Rezeptor.....	38
3.1.1 Evaluierung der Antikörper.....	38
3.1.2 Ergebnisse der systematischen Färbungen	40
3.2 Tenascin.....	44
3.2.1 Optimierung der Färbemethode.....	44
3.2.2 Ergebnisse der systematischen Färbungen.....	44
3.2.2.1 Morphologie der Färbungen.....	44
3.2.2.2 Evaluation der Untersuchungsmethode.....	51
3.2.3.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	52
3.2.2.4 Ergebnisse der systematischen Färbungen an para- ffinierten Tissue-Arrays.....	56
3.2.3 Ergebnisse des Western Blot.....	60
3.2.4 Einflüsse auf die Färbungsfläche und Intensität.....	63
4. Diskussion	66
4.1 Neurotensinrezeptor.....	66
4.1.1 Evaluation.....	66

4.1.2 Ergebnisse.....	67
4.2 Tenascin.....	69
4.2.1 Evaluation.....	69
4.2.2 Ergebnisse der systematischen Färbungen.....	69
4.2.3 Ist Tenascin-C ein gutes Markermolekül für Ösophaguskarzinome?....	71
4.2.4 Hat die Tenascin-C-Expression prognostische Bedeutung?.....	73
4.2.5 Ist Tenascin-C ein potentielles Zielmolekül für bildgebende Verfahren?.....	73
4.2.6 Lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse therapeutisch verwerten?.	73
4.2.7 Ausblick.....	75
5. Literaturverzeichnis.....	76
6. Danksagung.....	91
7. Lebenslauf.....	92
8. Eidesstattliche Erklärung.....	93

Abkürzungsverzeichnis

ABC – Avidin-Biotin-Komplex
Ad - Adeno
Ak - Antikörper
APAAP - Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase
ar. - arithmetisch
Ca – Karzinom
DGVS – Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten
DNA - Dexoxyribonukleinsäure
EDTA - Ethylendiamintetraessigsäure
et al. – et alii – und andere
Fa - Firma
FBS – fetales bovines Serum
gew. - gewichtet
GI - Gastrointestinal
HER-2 – human epidermal growth factor receptor 2
HEPES – N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
Ig - Immunglobulin
IEN – Intraepitheliale Neoplasie
kDa - Kilodalton
Ko - Kontrolle
Mts - Metastase
NT – Neurotensin
NSCLC – Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
NTR – Neurotensin-Rezeptor
PCR – Polymerase - Kettenreaktion
PBS - Phosphate buffered saline
PE - Plattenepithel
PFA – Paraformaldehyd
RNA - Ribonukleinsäure
sc – Santa Cruz (Firma)
SCLC – Kleinzelliges Lungenkarzinom
SDS - Natriumdodecylsulfat
SPECT – Single-Photon-Emissionscomputertomographie
TnC - Tenascin
Tu - Tumor
UICC – Internationale Union gegen den Krebs
WHO - Weltgesundheitsorganisation

Zusammenfassung

Einleitung

Die vorliegende Arbeit untersucht das Vorkommen des Neurotensin-Rezeptors-1 und von Tenascin-C im Plattenepithel- und Adenokarzinom des Ösophagus. Für den Neurotensinrezeptor 1 gab es bisher zwar bei anderen Tumorentitäten Nachweise, jedoch noch keine Hinweise auf eine vermehrte Expression im Ösophaguskarzinom. Tenascin-C war bereits in geringeren Fallzahlen ohne Differenzierung der Spleißvariante im Ösophaguskarzinom untersucht worden.

Material und Methoden:

Es wurden gefrorene Präparate von insgesamt 54 Patienten, die an der Charité operiert worden waren, sowie 60 kommerziell erworbene paraffinierte Proben untersucht. Methodisch stand die Immunhistochemie im Vordergrund. Immunfluoreszenz an Zellkulturen, Transfektion, Western-Blot und Autoradiographie dienten zur Überprüfung der Methode und der gewonnenen Ergebnisse.

Alle Ergebnisse wurden von zwei unabhängigen Untersuchern begutachtet.

Ergebnisse

Für den NTR-1 wurde hier erstmalig ein Vorkommen im Ösophaguskarzinomgewebe bei 10 von 54 untersuchten Proben nachgewiesen.

Die lange Spleißvariante von Tenascin-C fand sich im Bindegewebe von allen untersuchten 114 Proben von Ösophaguskarzinomen. Hier zeigten sich auch signifikante Unterschiede in der Färbungsintensität zwischen gefrorenen und paraffinierten Geweben. Zwar fanden sich auch geringe Vorkommen in den untersuchten 30/36 tumorfreien Kontrollgeweben, jedoch nur in signifikant geringerer Ausprägung.

Diskussion

Die Antikörperbindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ist insgesamt schwierig. Dennoch fanden sich mit Immunfluoreszenzuntersuchungen an transfizierten Zellkulturen Hinweise darauf, daß die Bindung des verwendeten Antikörpers spezifisch an den NTR-1 erfolgte. Weitere Versuche sollten jedoch folgen.

Die lange Spleißvariante des Tenascin-C ist nach den vorliegenden Daten ein gutes histologisches Markermolekül bei Adeno- und Plattenepithelkarzinomen des

Ösophagus, welches mit einer gute Sensitivität und Spezifität zwischen malignem und nicht tumorbefallenem Gewebe differenzieren kann. Eine klinische Anwendung existiert bei gastrointestinalen Karzinomen noch nicht. Diese existiert bei anderen Tumorentitäten. Diese Arbeit gibt weitere Hinweise darauf, daß Tenascin-C auch beim Ösophaguskarzinom ein vielversprechendes Ziel für klinische Anwendungen sein könnte.

Abstract

Introduction

This study examines the prevalence of Neurotensin Receptor 1 and Tenascin-C in Esophageal Squamous cell and Adenocarcinoma. Neurotensin Receptor 1 (NTR-1) is overexpressed in many tumours of the gastrointestinal tract, but until now its overexpression in esophageal cancer had not been investigated. Tenascin-C (TnC) is a hexamer glycoprotein of the extracellular matrix. Especially the long unspliced isoform of TnC is known to be overexpressed in malignomas. While there are two small studies showing Tenascin-C to be overexpressed in esophageal squamous cell and adenocarcinoma until this point there has been no bigger systematic study of Tenascin-C in oesophageal cancer. Furthermore no existing study focuses on the long unspliced isoform of Tenascin-C.

Material and Methods

54 samples were obtained from patients with oesophageal adenocarcinoma (AC) or squamous cell carcinoma (SCC) operated at Charité Campus Virchow Klinikum. Oesophageal tissue without tumour infiltration existed for 36 of these patients and was used as control sample. In addition we used a commercial tissue array with 60 samples of AC and SCC coated with paraffin wax. In total we had 68 SCC samples, 40 AC samples and six rare tumour entities.

To detect NTR-1 and TnC mainly immunohistochemical methods were applied. Immunofluorescence in cell cultures, transfection, Western-Blot and Autoradiography were used to proof the methods and the results obtained.

Results

The presence of NTR-1 in esophageal carcinoma is first described here in 10 of 54 tissue samples. The long splicing variant of TnC was detected in the connective tissue of all 114 tissue samples of esophageal cancer. There were significant differences in the intensity of staining between frozen and paraffine-coated tissue samples. The presence of TnC in control tissues was significantly lower.

Discussion

G-Protein-coupled receptors like NTR-1 are known to be a difficult target in immunohistochemistry. Nevertheless the positive staining of transfected cells found within this study gives some evidence as to the specificity of this staining.

The long splicing form of TnC is a good histologic marker of oesophageal cancer, which can distinguish between malignant and non-malignant tissue with good sensitivity and specificity. Up to now there is no clinical application of TnC-Antibodies in gastrointestinal tumours. This study shows that TnC is a promising target for clinical applications.

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1 Tumormarker, Tumordiagnostik und Therapie

1.2 Der Neurotensinrezeptor-1

1.2.1 Neurotensin und der Neurotensinrezeptor-1, physiologische Bedeutung

1.2.2 Der Neurotensinrezeptor-1 in Tumoren

1.3 Tenascin-C

1.3.1 Tenascin-C, Aufbau und physiologische Bedeutung

1.3.2 Tenascin-C in malignen Tumoren

1.4 Zielsetzung der Arbeit

1.1 Tumormarker, Tumordiagnostik und Therapie bei Ösophaguskarzinomen

Bösartige Tumoren des Gastrointestinaltraktes gehören zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt 2010). Die Bösartigkeit eines Tumors zeigt sich nach Hanahan und Weinberg (2000 und 2011) an sechs biologischen Eigenschaften: fortlaufenden Wachstumssignalen, dem Umgehen von wachstumshemmenden Signalen, der Aktivierung von Gewebeinvasion und Metastasierung, replikativer Unsterblichkeit, der Induzierung von Angiogenese und dem Widerstehen gegenüber dem Zelltod. Medizinisch sind vor allem die Fähigkeit zur Ausdehnung über Zell- und Gewebsgrenzen hinaus, sowie die Metastasierung die bedrohlichen Prozesse für den Menschen (vgl. Riede et al. 2004, 339f). Eine frühe Erkennung eines bösartigen Prozesses kann daher lebensrettend sein, da der Prozess zu diesem Zeitpunkt noch nicht weit ausgebreitet ist und sich somit leichter kontrollieren lässt.

So liegt beim hier behandelten Ösophaguskarzinom die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) bei Tumoren im UICC-Stadium I (T1, N0, M0), bei dem die (teilweise auch endoskopische) Resektion die aktuelle Standardtherapie darstellt, bei 50-94%. Bei einem lokal weiter ausgebreiteten Prozess (T2 oder T3 und damit Stadium IIA) wird zwar immer noch eine Resektion angestrebt, die 5-JÜR liegt jedoch nur noch bei 15-65%. Nachweis von lokalem Lymphknotenbefall verschlechtert die Prognose drastisch auf eine 5-JÜR von 5-25%. Bei Fernmetastasen liegt die mediane

Überlebenszeit bei nur sechs Monaten die 5-JÜR bei <5%. (vgl. Stahl et al. 2007, Preiß et al. 2012).

Tumormarker sind Stoffe, die im maligne veränderten Gewebe spezifisch gebildet werden. Sie werden häufig genutzt, um den Therapieerfolg und Verlauf einer Erkrankung zu kontrollieren, in sehr begrenztem Ausmaß auch zur Diagnose einer malignen Erkrankung (Diamandis 2002). So läßt z.B. ein Wiederanstieg eines Tumormarkers nach einer Operation auf ein Rezidiv oder eine Metastase schließen. Lediglich das Prostataspezifische Antigen (PSA) wird bisher routinemäßig zur Früherkennung von Tumoren eingesetzt, allerdings ist auch dessen Verwendung umstritten. (Schröder 2009).

Prinzipiell umfaßt die Behandlung von bösartigen Tumoren drei Säulen: die Operation, die zytostatische Chemotherapie und die Strahlentherapie. Der Bereich der klassischen zytostatischen Chemotherapie wird seit einigen Jahren durch die sogenannten Biologicals, gegen bestimmte Tumorantigene gerichtete Antikörper oder andere Proteine, erweitert. Diese bergen die Möglichkeit einer gezielten Therapie. Bekannt ist hier z.B. der HER-2-Antikörper Trastuzumab, der in der Behandlung des HER-2-positiven Mammakarzinoms eine wichtige Therapiemöglichkeit darstellt (Leitlinienprogramm Onkologie 2012) und in jüngerer Zeit nach den Ergebnissen der Toga-Studie (Bang et al. 2010) auch Eingang in die leitliniengerechte Therapie des Magenkarzinoms gefunden hat (Moehler et al. 2011) Das hier besprochene Tenascin-C wird beispielsweise als Antigen bei Glioblastomen bereits mit lebensverlängernder Wirkung als Zielmolekül verwendet (s. Diskussion)

Bösartige Tumoren des Ösophagus sind zu weit über 90 % Plattenepithel- und Adenokarzinome, sowie deren Mischformen (Bareiß et al. 2002; Daly et al. 2000). Andere seltene Tumorentitäten sind Sarkome und Melanome, diese sollen in dieser Arbeit nicht behandelt werden. Adenokarzinome entstehen nach aktuellem Stand der Forschung vermutlich über Zwischenschritte aus pathologisch veränderter Schleimhaut im Ösophagus, dem sogenannten Barrett-Epithel. Barrett-Epithel entsteht als Reaktion auf chronisch aufsteigende Magensäure. Dabei handelt es sich um einen Umbau des Plattenepithels in ein drüsenhaltiges Zylinderepithel wie in der Cardia, oder das Einwachsen von Cardiaepithel in den Ösophagus (Shaheen und Richter 2009). In diesem besteht die Möglichkeit, dass sich die normale histologische

Architektur weiter auflöst, es kommt zu Dysplasien. Niedriggradige Dysplasien bergen ein geringes Risiko, in ein Karzinom überzugehen, während dies bei hochgradigen Dysplasien¹ je nach Studie zu etwa 2 bis 11 % pro Patientenjahr tun (Daly et al. 2000, Schnell et al. 2001, Reid et al. 2001).

Die Prognose von Karzinomen des Ösophagus ist schlecht. Derzeit liegt die Fünfjahresüberlebensrate aller Stadien bei unter 10% (Bareißen et al. 2002). Dies hat verschiedene Gründe. Zum einen sind die Tumoren meist relativ symptomlos, bis sie weit fortgeschritten sind. Symptome wie Dysphagie und Regurgitation von Nahrungsresten treten meist erst bei einer signifikanten Einengung des Lumens auf. Zu diesem Zeitpunkt ist eine kurative Therapie häufig nicht mehr möglich.

Schließlich sind Karzinome des Ösophagus aufgrund der häufig intrathorakalen Lage im Mediastinum zwischen Trachea und Wirbelsäule schwer zu operieren (Vallböhmer et al. 2011), die Operation aber ist die wesentliche kurative Option in der Behandlung von limitierten Ösophaguskarzinomen, obwohl es auch kurative Ansätze von Radio- bzw. Radiochemotherapie gibt. (Enzinger und Mayer 2003, Baumhoer und Ramadori 2005, Cooper et al. 1999, Minsky et al 2002, Stahl, Wilke und Pöttgen 2007).

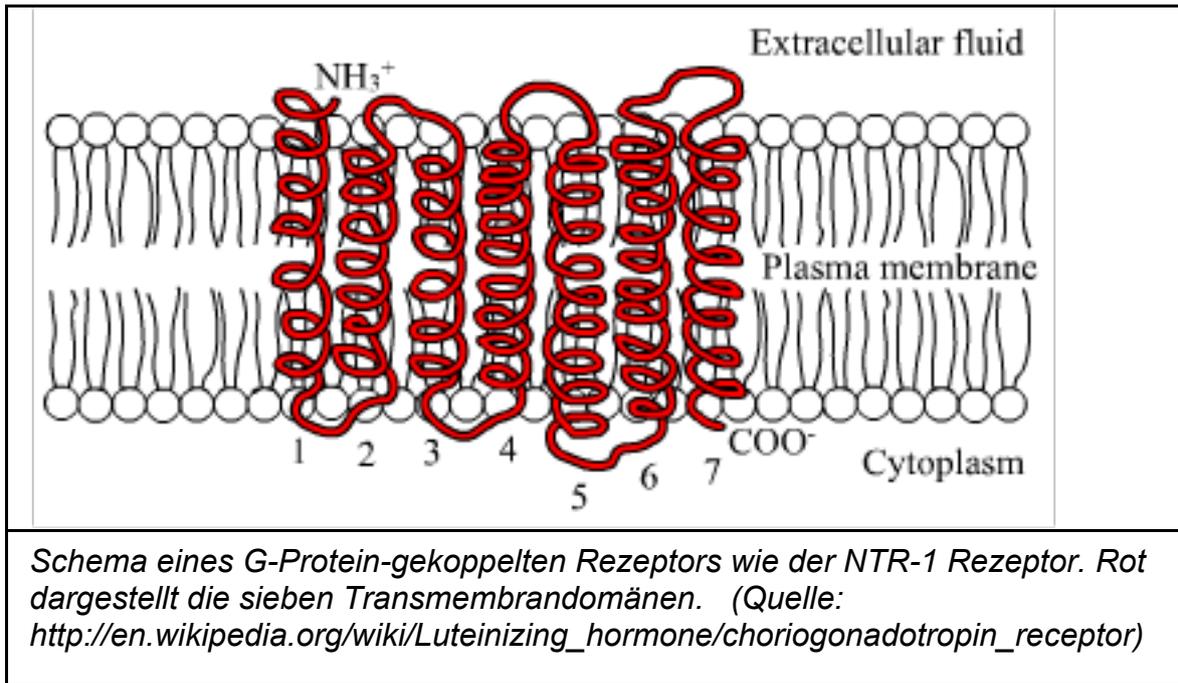
Zudem bestehen die Möglichkeiten der Radiotherapie, der zytostatischen Therapie und der Kombination von Therapieverfahren im Sinne (neo-) adjuvanter Therapieverfahren bzw. einer Radiochemotherapie (Stahl, Weber und Schütte 2007). Eine Erörterung der Einzelheiten soll hier aus Gründen des damit verbundenen Umfangs vermieden werden.

¹ Der Begriff der Dysplasie ist gemäß der Wien-Klassifikation von 1998 verlassen worden und im Wesentlichen durch den Begriff der Intraepithelialen Neoplasie (IEN) ersetzt worden (Schlemper et al 2000). Da sich diese Nomenklatur jedoch bisher nicht allgemein durchsetzen konnte und die verwendeten Proben nach überkommener Nomenklatur von pathologischer Seite klassifiziert waren, wird in dieser Arbeit weiter der Begriff Dysplasie verwendet.

1.2 Der Neurotensinrezeptor 1

1.2.1 Neurotensin und der Neurotensinrezeptor-1, physiologische Bedeutung

Neurotensin (NT) ist ein Tridecapeptid, welches 1973 zum ersten Mal von Carraway und Leeman aus dem bovinen Hypothalamus isoliert wurde und 1976 von den gleichen Forschern in noch wesentlich höherer Konzentration im Gastrointestinaltrakt von Ratten gefunden wurde. NT kommt im auch im humanen Gastrointestinaltrakt ubiquitär vor, jedoch hauptsächlich im Epithel des Jejunums und des Ileums. Für die Sekretion von NT sind die sogenannten N-Zellen zuständig. (Zhao & Pothoulakis, 2006) Hauptstimulus für die Abgabe von NT ist die Erhöhung des Fettgehaltes im Lumen des Intestinums. Interessanterweise scheinen ungesättigte Fettsäuren ein Stimulus zu sein, während gesättigte Fettsäuren keinen NT-Anstieg bewirken. (Barber et al., 1991) Die Wirkungen des NT auf den GI-Trakt sind vielfältig. So wird die Sekretion des Pankreas gesteigert, die von Magensäure jedoch gesenkt, die Motilität von Magen und Dünndarm reduziert, die des Colons dagegen gesteigert, ebenso wie die Resorption von Fettsäuren gesteigert. Die Proliferation der Mukosa des GI-Traktes wird ebenfalls gesteigert v.a. in Antrum, dem gesamten Dünndarm und Kolon. (Thomas et al., 2003; Zhao & Pothoulakis, 2006). Diese Wirkungen werden über drei bisher bekannte NT-Rezeptoren (NTR) vermittelt. NTR-1 und NTR-2 sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, während NTR-3 identisch ist mit gp95/sortilin, einem 100kDa Protein, welches eine Transmembrandomäne aufweist (Vincent et al. 1999; Zhao & Pothoulakis, 2006). Der humane NTR-1 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor bestehend aus 418 Aminosäuren, die sieben Transmembrandomänen bilden (Vincent et al. 1999).



Funktional scheinen sich die Rezeptoren insofern zu unterscheiden, dass NTR-1 alle bisher bekannten Funktionen des NT vermittelt, während den anderen Rezeptoren bisher weniger Funktionen zugeordnet werden konnten (Zhao & Pothoulakis, 2006).

1.2.2 Der Neurotensinrezeptor-1 in malignen Tumoren

Bei verschiedenen Tumoren ist ein Vorkommen von Neurotensin belegt. Sowohl NT-Sekretion von Tumoren als auch NT als Wachstumsstimulus für Tumoren sind nachgewiesen. So wird zum einen vermutet, dass der Zusammenhang von fettreicher Ernährung und einigen Malignomen durch die erhöhte NT-Sekretion miterklärt werden könnte (Carraway & Plona 2006), zum anderen dass NT als autokriner Wachstumsstimulus für einige Tumoren notwendig sein könnte (Reubi 2003).

In Mamma-, Prostata- und Lungenkarzinomen (SCLC und NSCLC) ist das Vorkommen von NT bzw. dem NTR gut belegt (Evers 2006; Reubi 2003, Alifano et al. 2009). Alifano et al. (2009) fanden, dass Patienten mit NSCLC, die NTR-1 positiv waren, eine signifikant schlechtere Prognose hatten, als Patienten, deren Karzinome frei von diesem Rezeptor waren.

Im Bereich der gastrointestinalen Tumoren gibt es deutliche Hinweise darauf, dass NT und NTR eine bedeutende Rolle spielen. Vor allem ist dies bei Pankreastumoren der Fall (Reubi et al. 1998), aber auch bei anderen Entitäten ist gibt es deutliche Hinweise darauf. So fanden Maoret et al. (1994) in 9 von 19 Kolon-Ca-Zelllinien NTR mit Hilfe von RT-PCR und ^{125}I markiertem Neurotensin. In einer weiteren Untersuchung von Maoret et al. (1999) zeigte sich, dass NT das Wachstum von Kolon-Ca-Zelllinien stimulieren konnte, wenn diese NTR-1 exprimierten. Auch Dal Farra et al. (2001) untersuchten sechs verschiedene Colon-Ca-Zelllinien auf NTR-mRNA und fanden in jeder NTR-3, sowie NTR1 in 5 von 6. NTR 2 wurde in keiner der Zelllinien gefunden. Die Bindung des NT-Analogs ^{251}I -Tyr³-NT bestätigte diese Ergebnisse. Anders Reubi et al. (1999), die allerdings keine Zelllinien sondern Gewebe untersuchten. hier wurden nur in 1/25 der Kolon--Ca, sowie in 1/27 der getesteten Magen-Ca NTR gefunden. Allerdings band der Radioligand durchaus außerhalb der Tumoren an „kontaminierende“ Muskelzellen und Nervenzellen.

Souazé et al. (2005) untersuchten den Zusammenhang zwischen dem Tcf/ β Catenin-Pathway und der Expression von NTR-1. Dabei fanden sie heraus, dass bei aktiviertem Wnt/APC-pathway der NTR-1 Rezeptor exprimiert wird. Da dies in etwa 80% der Kolon-Ca der Fall ist, könnte der NTR-1 Rezeptor genauso häufig zu finden sein. Dafür spricht auch, dass Gui et al. (2008) in 25/25 Colon-Ca NTR-1 mRNA fanden.

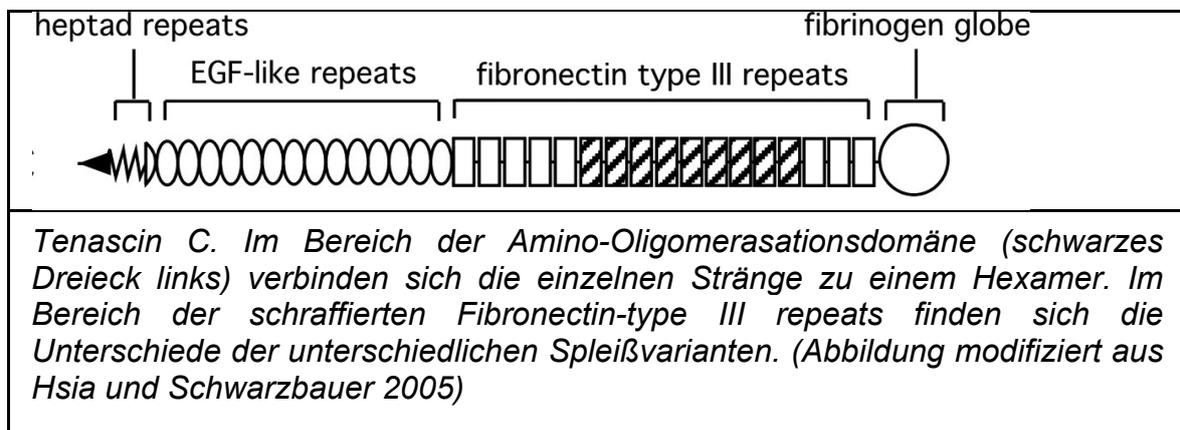
Zu NTR-1 in Ösophaguskarzinomen sind bisher keine Daten veröffentlicht.

1.3 Tenascin-C

1.3.1 Tenascin-C , Aufbau und physiologische Bedeutung

Bei Tenascin-C handelt es sich um ein Molekül der extrazellulären Matrix, das im Körper des Erwachsenen in praktisch allen Organen, wenn auch in meist sehr geringer Ausprägung vorkommt (vgl. Chiquet-Ehrismann, 2003). Zuerst beschrieben wurde es 1983 als ein extrazelluläres Matrixprotein, das vermehrt im Stroma von Gliomen vorkommt (Bourdon et al., 1983). Das Wort Tenascin wurde 1986 von Chiquet-Ehrismann et al. eingeführt, indem die lateinischen Worte tenere (halten) und nascere (geboren werden) zusammengesetzt wurden. Biochemisch handelt es sich um ein hexameres Glykoprotein. Die sechs Arme bestehen aus einer variablen Anzahl sich wiederholender Domänen. Am N-Terminus sind die sechs Arme verbunden.

Es existieren unterschiedliche Spleißvarianten, so dass die monomere Größe von rund 200 kDa eine starke Variationsbreite aufweist - von unter 100 kDa bis zu über 300 kDa. (Mighell et al., 1997; Hsia & Schwarzbauer, 2005; Chiquet-Ehrismann & Chiquet, 2003; Chiquet-Ehrismann, 2003).



Die Hauptfunktion von Tenascin ist wohl die Modulation von Zelladhäsionen, dabei interagiert es mit anderen Molekülen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Annexin II, Syndecan und den Integrinen $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 9\beta 3$. Auffällig ist hierbei, dass zwar in den meisten, aber nicht in allen Fällen die Zelladhäsion herabgesetzt wird. Es scheint, dass Zellen, die normalerweise fest verankert sind, durch Tenascin-C aus ihren Verbänden gelöst werden, während wenig verankerte Zellen in ihrer

Beweglichkeit gehemmt werden. (Jones & Jones 2000, Orend, 2005, Chiquet-Ehrismann & Chiquet, 2003) . Dies erklärt sein physiologisches Vorkommen vor allem in der Embryogenese, bei der Aussprossung peripherer Nerven (Chiquet-Ehrismann, 2004). Die Beteiligung an der Angiogenese und an Immunprozessen wird diskutiert. Bei Entzündungsprozessen ist Tenascin-C fast grundsätzlich hochreguliert und somit ein Entzündungsmarker. Regulatorisch werden hierfür verschiedene Zytokine verantwortlich gemacht, hauptsächlich inflammatorische, aber auch antiinflammatorische Zytokine - wie v.a. der transforming growth factor β (TGF β) – sind hier als Mediatoren beschrieben. Auch mechanischer Streß ist wahrscheinlich ein Faktor, der für die Sekretion von Tenascin-C verantwortlich ist (Chiquet-Ehrismann & Chiquet, 2003). Tenascin-C Knock-Out Mäuse zeigen Verhaltensauffälligkeiten sowie Störungen der Wundheilung (Hsia & Schwarzbauer, 2005).

Im Gastrointestinaltrakt des Erwachsenen kommt Tenascin-C unter physiologischen Bedingungen im Wesentlichen im Bereich der Basalmembran vor (Broll et al., 1995). Sein Vorkommen und seine Funktion im malignen Tumorgewebe soll im Folgenden kurz dargestellt werden.

1.3.2 Tenascin-C in malignen Tumoren

Tenascin-C kommt in zahlreichen soliden Tumoren vor. Zuerst wurde es als Molekül der extrazellulären Matrix bei Gliomen beschrieben (Bourdon et al., 1983). Weiterhin sind Tenascin-C-Anreicherungen bei Mund- und Larynxkarzinomen (Mighell et al., 1997), Lungenkarzinomen (Silacci et al. 2006), Mamma-Karzinomen (Borsi et al. 1992), Nierenzellkarzinomen (Lohi et al., 1995), malignen Melanomen (Ilmonen et al. 2004), Magenkarzinomen (Broll et al. 1995), Colonkarzinomen (Sugawara et al. 1991, Riedl et al. 1992), Urothelkarzinomen (Berndt et al. 2006), Pankreaskarzinomen (Lindner et al. 2001, Gong et al. 2010) Prostatakarzinomen (Lindner et al. 2001), Uteruskarzinomen (Sedele et al. 2002), Osteosarkomen (Xiong et al. 2009) und Chondrosarkomen (Evers 2006) zu finden. In Tumoren der peripheren Nervenscheiden, wird TnC sogar als histodiagnostisches Kriterium diskutiert (Dugu et al. 2010). TnC in Tumoren des Gastrointestinaltraktes wird weiter unten ausführlicher vorgestellt.

In zahlreichen Tumorentitäten fanden sich Hinweise darauf, dass die lange Isoform des TnC (die wahrscheinlich alle alternativ gespleißten Domänen enthält – vgl. Abb. 2) bei Erwachsenen fast ausschließlich in der Umgebung des pathologisch veränderten (entzündeten, maligne entarten) Gewebes und in der fetalen Entwicklung vorkommt. (Katenkamp et al. 2004; Brack et al. 2006, Carnemolla et al. 1999). Daher wird zuweilen auch von onkofetalem Tenascin-C (=oncfet-TnC) geschrieben (Galler et al. 2012, Van Obberghen-Schilling 2011 Berndt et al. 2010,) In ihren Reviews diskutieren Chiquet-Ehrismann und Chiquet (2003) sowie Orend (2005) die auslösenden Faktoren für die Tenascin-C Expression, sowie die Funktion des Tenascin-C in malignen Tumoren. Als auslösender Reiz für die Entstehung von Tenascin-C bei malignen Tumoren werden tumorassoziierter mechanischer Streß und tumorassozierte Entzündungsmediatoren (s.o.) diskutiert. Aber es werden auch Rückwirkungen des Tenascin-C auf das maligne entartete Gewebe diskutiert. So scheint es, dass Tenascin-C Signalwege aktiviert, die Onkogene enthalten. Auch zeigte sich, dass Melanome in Mäusen, die kein Tenascin-C produzierten, kleiner und weniger vaskularisiert waren als in Wildtyp-Mäusen (Tanaka et al., 2004). Dies deutet auf eine Bedeutung des Tenascin auf die Vaskularisation des Tumors hin. Zudem fanden Huang et al. (2010) deutliche Hinweise darauf, dass Tenascin-C die T-Zell-assoziierte Immunantwort gegen Gliome hemmen kann; zu vermuten ist, dass dieser bisher nur bei Gliomen gezeigte Mechanismus auch bei anderen TnC-exprimierenden Tumoren auftritt.

Des Weiteren gilt Fibronectin durch seine adhäsive Wirkung im Zellverbund und bei der Migration von Entzündungszellen als tumorsuppressiv wirksam. Tenascin-C reduziert die Wirkung von Fibronectin und führt damit zu einer erhöhten Tumoraktivität (Van Obberghen-Schilling et al. 2011) Außerdem scheint es, dass feste Zelladhäsionen einen genomstabilisierenden Effekt haben, der durch Tenascin-C reduziert wird. (Allen und Jones 2011)

Auch im Bereich der Therapie wird Tenascin-C bereits als Zielmolekül gesehen. So gibt es zahlreiche Studien zu antikörpergesteuerten Radioimmuntherapie von Glioblastomen. Hierbei werden Radioisotope an einen Tenascin-C-Antikörper gekoppelt und durch diesen selektiv im pathologisch veränderten Hirngewebe angereichert (Chiquet-Ehrismann & Chiquet, 2003; De Santis et al., 2003; De Santis et al., 2006).

Ebenso gibt es tierexperimentelle Hinweise darauf, dass die zielgerichtete Chemotherapie, gekoppelt an Antikörper gegen die alternativ gespleißte A1 – Domäne des TnC, prognostisch günstig ist (Märlind et al 2008).

Nicht zuletzt finden sich bei einigen Malignomen, so beim Osteosarkom (Xiong 2009), bei Riesenzelltumoren (Pazzaglia et al. 2010) beim Harnblasenkarzinom (Richter et al. 2009) und bei Gliomen (Hirata et al. 2009) sich Belege dafür, dass die gesteigerte TnC-Expression mit einem erhöhten Rezidiv und Invasivitätsrisiko einhergeht. Aber auch in anderen Bereichen ist TnC prognostisch wichtig, Gong et al. (2010) beschreiben, dass in vitro bei Pankreaskarzinom-Zellen eine erhöhte Resistenz gegen das Standardchemotherapeutikum Gemcitabine durch Interaktion zwischen einer alternativ gespleißten Domäne des TnC und Annexin A2 induziert wird.

Im Bereich des Gastrointestinaltraktes sind noch keine Therapiestudien begonnen worden. Dennoch zeigen sich auch hier mit bemerkenswerter Deutlichkeit Anreicherungen von Tenascin in Karzinomen. Bereits Sugawara et al. (1991) beschreiben eine vermehrte Anreicherung von Tenascin-C in Kolorektalen Karzinomen. Diese Befunde wurden im Folgenden bestätigt von Riedl et al. (1992), Broll et al. (1995), Dueck et al. (1999) und Gulubova und Vlaykova (2006). Auch als Tumormarker im Serum bei kolorektalen Karzinomen wird Tenascin-C von Riedl et al. (1995) untersucht; hierbei zeigt sich, dass die Erhöhung des Serumspiegels mit einer Spezifität von 95 % bei einer Sensitivität von 25 % einhergeht. Dies entspricht CEA, einem etablierten Tumormarker bei kolorektalen Karzinomen. Takeda et al. (2007) untersuchten ebenfalls den Tn-C Serumspiegel bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen, allerdings mit Fokus auf große Spleißvarianten, und fanden ebenfalls heraus, dass es sich hierbei um einen guten potentiellen Tumormarker handelt. Bereits Dueck et al. (1999) fanden Hinweise darauf, dass unterschiedliche Spleißvarianten unterschiedlich gut als Tumormarker dienlich sein könnten.

Beim Magenkarzinom fanden Broll et al. (1994) und Gulubova & Vlaykova (2006) ebenfalls eine deutliche Anreicherung von Tn-C.

Im Bereich des Ösophagus fanden sowohl Broll et al. (1995) bei Plattenepithelkarzinomen als auch Salmela et al. (2001) bei Adenokarzinomen eine vermehrte Anreicherung. Allerdings waren jeweils nur kleine Fallzahlen untersucht worden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen Tenascin-C und der Neurotensinrezeptor-1 als mögliche Markermoleküle von Ösophaguskarzinomen untersucht werden.

Für NTR-1 gab es in Bezug auf Ösophaguskarzinome bisher keine Daten. Aufgrund der regelhaften Expression in anderen Tumoren des Gastrointestinaltraktes lag nahe, dass zumindest in Adenokarzinomen eine Expression möglich wäre. Hier soll die Frage beantwortet werden, ob NTR-1 in der Zellmembran maligne entarteter Ösophaguszellen vermehrt vorkommt.

Bei der langen Spleißvariante von Tenascin-C lagen bereits deutliche Hinweise darauf vor, dass dies ein vielversprechender Marker sein könnte, da es in anderen Tumoren des Gastrointestinaltraktes regelhaft nachgewiesen wird und es auch Ansätze von Untersuchungen im Bereich der Ösophaguskarzinome gab. In Anbetracht der zunehmenden Relevanz von TnC als Zielmolekül in der Tumorthherapie und Diagnostik soll dies mit einer wesentlich größeren Stichprobe überprüft werden. Des Weiteren sollen Tumorgewebe und gesundes Gewebe der gleichen Patienten geprüft werden.

Da die Arbeit sich zum Ziel gesetzt hat mögliche Grundlage für antikörperbasierte Therapie oder Diagnostik des Ösophaguskarzinoms zu sein, soll hauptsächlich immunhistochemisch vorgegangen werden.

Letztlich sollen in Bezug auf Tenascin-C folgende Fragen geklärt werden:

Ist Tenascin-C ein gutes Markermolekül für Ösophaguskarzinome?

Hat die Tenascin-C Expression prognostische Bedeutung?

Ist Tenascin-C ein potentiell Zielmolekül für bildgebende Verfahren?

Lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse therapeutisch verwerten?

Diese Fragen werden in der Diskussion noch einmal aufgenommen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Die verwendeten Antikörper und radioaktiv markierten Peptide werden in dieser Arbeit zuerst aufgeführt, anschließend werden die verwendeten Lösungen aufgeführt. Abschließend werden sämtliche verwendeten Substanzen samt Bezugsquellen in alphabetischer Ordnung aufgelistet.

2.1.1 Gewebe

Für die Arbeit wurden sowohl mikroskopisch tumorfreie Kontrollgewebe, als auch Tumorgewebeschnitte des Ösophagus verwendet. Eine Aufstellung der Gewebe findet sich unter den Ergebnissen. Bei allen Geweben handelte es sich um Resektate oder Biopsien von Patienten der Kliniken für Viszeralchirurgie und Hepatologie und Gastroenterologie der Charité.

Weiter wurden in Paraffin eingebettete Tissue-Arrays verwendet. Diese wurden bezogen aus dem Institut für Pathologie der Charité (Prof. Dr. Dietel) und von der Firma Biocat, Heidelberg (CTA CS02-02-004) sowie von der Firma Superbiochips Laboratories, Korea (BC4-A07 und CR1-B02)

Zudem wurden zum Test der Antikörper verschiedene gefrorene und paraffineingebettete Schnitte von Pankreas, Kleinhirn, Ileum, Magen und Colon, sowie der entsprechenden Tumoren verwendet. Auch diese entstammten dem Bestand der Charité. Für die Verwendung der Gewebe wurde die Zustimmung der Ethikkommission der Charité eingeholt (Ref. 62/2002).

2.1.2 Zellen

CHO-Zellen

Zelllinie	CHO-K1 (ATCC Nr.: CCL-61)
Organismus	<i>Cricetulus griseus</i> (Hamster, Chinese)
Herkunft	Ovar eines erwachsenen chinesischen Hamsters; 1957
Morphologie und Wachstum	Fibroblasten, adhärent wachsend

Wachstumsbedingungen	Hams F12 Medium, 2 mM L-Glutamine, 1.5 g/L NaHCO ₃ , 10% FKS, 37 °C, 5 % CO ₂
Verdopplungszeit	24 h

MiaPaCa-2-Zellen

Zelllinie	Mia-PaCa2 (ATCC Nr.: CRL-1420)
Organismus	<i>Homo sapiens</i>
Herkunft	Pankreaskarzinom 1975 (A. Yunis)
Morphologie und Wachstum	adhärent, epithelial
Wachstumsbedingungen	ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's (Nr.30-2002) + Fetales bovines Serum (Zielkonz. 10%) + Pferdeserum (Zielkonz. 2,5%); Temp. 37°C
Verdopplungszeit	40 h

HEK 293

Zelllinie	HEK 293 (ATCC Nr.: CRL-1573.3)
Organismus	<i>Homo sapiens</i>
Herkunft	Embryonale Niere 1973 (van der Eb)
Morphologie und Wachstum	Runde Zellen
Wachstumsbedingungen	SFM II (Invitrogen, Catalog No. 11686-029) + 2mM L-Glutamin (ATCC 30-2214) Temp. 37°C, O ₂ 95%; Co ₂ 5%
Verdopplungszeit	34 h

2.1.3 Medium für Zellkultur

RPMI 1640 Medium (1x) (Biochrom)

OptiMEM ® I (Gibco 31985-047)

2.1.4 Antikörper

Gegen Neurotensin-Rezeptor 1

- abcam 13041, polyklonaler Antikörper rabbit against human N-Terminus
- santa cruz sc-25042 polyklonaler Antikörper goat against human N-Terminus 200 µg/ml
- santa cruz sc 7596 polyklonaler Antikörper goat against human C-Terminus 200 µg/ml

Gegen LI-Cadherin

- Santa Cruz sc6462, goat polyclonal IgG

Gegen Rab 7

- Santa Cruz sc-6563, goat polyclonal IgG

Gegen Vimentin

- Chemicon MAB 3400 mouse monoclonal IgG, 1 mg/ml

Gegen Tenascin C

- Anti TnC 608, monoklonaler AK gegen lange Spleißvarianten des TnC mit unbekannter Bindungsdomäne, Prof. Faissner, Bochum (persönliche Kommunikation)
- Anti TnC 578, monoklonaler Ak gegen FNIII/Domäne D, Prof. Faissner, Bochum (publiziert in Rigato et al. 2002)

Blockierung

- Avidin-Biotin-Blockierungskit (Fa. Dako X-0590)

Sekundärantikörper für Immunhistochemie

- Biotinylated Anti-Mouse, affinity purified, made in horses (Vector Laboratories Inc)
- Brücken-Antikörper Mous IgG (Dako #Z0259)
- APAAP-Ak mouse (Dako#K0699)

Sekundär-Antikörper für Westernblot

- Anti Goat IgG-HRP sc2056 (santa cruz)
- Anti Goat IgG-HRP sc2020 (santa cruz)
- Anti Mouse IgG-HRP

Sekundär-Antikörper für Immunfluoreszenz

- Texas Red rabbit anti goat 305-075-045 Dianova

2.1.5 Radioaktiv markierte Peptide

(3-(125I)Iodotyrosyl 3) -*Neurotensin*, 10uCi, Activity Date 3. Juli 2006 (Amersham Biosciences ED 1807-IM163)

(2-(125I)Iodotyrosyl 11) *Somatostatin* 14 (Tyr 11), 10 uCi, Activity Date 29. Mai 2006 (Amersham Biosciences ED 1808- IM 161)

2.1.6 Lösungen

Anodenpuffer I

0,3 M Tris -> 36,34 g Tris
20% Methanol -> 200ml
ad 1l aqua dest

Anodenpuffer II

0,025 M Tris -> 3,02 g
20% Methanol -> 200 ml
ad 1l aqua dest

Phosphate buffered saline= PBS

Dulbecco R und Vogt M; Exp Med. 99,167-182 (1954)
Stammlösung 20x
8 g KCl (Merck Nr. 4936)
320 g NaCl (Merck Nr. 6404)

8 g KH_2PO_4

56 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck Nr. 6580)

auf 2 Liter destilliertes Wasser

1xPBS= 100ml Stammlösung mit 1900ml destilliertem Wasser verdünnen

Para-Formaldehyd=PFA-Lösung

10 g PFA reinst (H_2O)_n (Merck Nr. 2213) in 100ml destilliertem Wasser unter Wärme lösen, NaOH (1 mol/l) zugeben, bis die Mischung klar wird. 40 ml dieser 10-prozentigen Formaldehyd-Lösung mit 15 ml KH_2PO_4 (Merck Nr. 6580) –Lösung (800 mmol/l, pH 7,2) auf 100 ml aqua dest geben. Damit ist die gebrauchsfertige 4%-Formaldehyd-Lösung hergestellt.

Hämalaun

1 g Hämatoxylin (Merck 15938)

0,2 g Natrium (Merck 6525)

50 g Kalialaun = Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat (Merck 1042)

in 1 l Aqua dest lösen und über Nacht rühren

25 g Chloralhydrat (Merck 102425)

0,5 g Zitronensäure (Merck 100244)

Zugeben und wieder über Nacht rühren

Citratpuffer

2,1g Zitronensäure (10mM) auf 500ml aqua dest., anschließend mit Natronlauge auf pH 6,0 bringen und auf 1 l auffüllen.

K-Puffer

0,04 M 6-Aminohexansäure -> 5,24 g

20% Methanol -> 200 ml

ad 1l aqua dest

10x Kathodenpuffer

1) 250 mM TRIS -> 30,28 g

2) 1,9 M Glycin ->14 4g

3) SDS 1% -> 10 g

Mit einem Liter aqua bidest lösen.

Gebrauchslösung 1:10 verdünnt.

Detection reagent für Western Blot

Mischung von Detection reagent 1 mit Detection reagent 2 (Amersham)1:1

Methanol:Aceton

Mischung von Methanol und Aceton 1:1

HEPES 1M pH7,4

23,8 g Hepes auf 100 ml aqua dest, mit Natriumhydroxid auf pH7,4 titrieren.

Sammelgel (5%)

(2 große Gele, 10 x 15 cm): 13,6 ml Aqua dest., 3,4 ml Acrylamide Bis Solution (30%), 2,5 ml Tris (1000 mM, pH 6.8), 0,2 ml SDS (10%), 0,2 ml APS (10%), 0,02 ml TEMED.

Trenngel (6%)

(2 große Gele, 10 x 15 cm): 21.2 ml Aqua dest., 8 ml Acrylamide Bis Solution (30%), 10 ml Tris (1500 mM, pH 8.8), 0,4 ml SDS (10%), 0,4 ml APS (10%), 0,032 ml TEMED

Trenngel (10%)

(2 große Gele, 10 x 15 cm): 15,9 ml Aqua dest., 13,3 ml Acrylamide Bis Solution (30%), 10 ml Tris (1500 mM, pH 8.8), 0,4 ml SDS (10%), 0,4 ml APS (10%), 0,016 ml TEMED

Stripping Buffer (ECL) pH6,7

1) Tris 62,5mM ~3,79 g

2) SDS 2% ~50ml 10% SDS

3) 2-Mercaptoethanol 100 mM ~3,9 ml

auf 400 ml aqua dest, anschließend pH auf 6,7 mit Salzsäure einstellen.

Entwickler

Entwickler Kodak D-19 1:1 mit aqua dest mischen

Stopplösung

0,5 % Essigsäure in aqua dest

Fixierer

30% Natriumthiosulfat in aqua dest

2.1.7 Proteine

Pronase= Protease, Type XIV, bacterial from Streptomyces griseus (Sigma P5147)

Trypsin Type II crude from porcine pancreas (Sigma T8128)

2.1.8 verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller / Nr.
ABC-Reagenz	Vector Laboratories Inc.)
Acrylamid 30%= Rotiphorese Gel 30	Roth 3029.1
Aceton	J.T.Baker 8002
6-Aminohexansäure	Merck 12797
ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's Medium	ATCC 302002
Chloralhydrat	Merck 102425
Detection reagent 1	Amersham RPN2106V1
Detection reagent 2	Amersham RPN2106V2
Essigsäure 100%, wasserfrei	Merck 1.00063.2511
Ethanol 99,8%	Roth 9065.2
Fetales bovines Serum (=FBS = FKS)	Gibco 10437028
L- Glutamin	ATCC 30-2214
Glyceringelatine	Merck 1.09242.0100
Glyzin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Serva 23390
Hämatoxylin	Merck 15938
Hams F12 Medium	Biochrom F0815
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma H-3375
Isopropanol	Lagerware

Kalialaun = Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck 1042
KCl	Merck Nr. 4936
KH ₂ PO ₄	Merck Nr. 6580
2-Mercaptoethanol	Merck 1.15433.0100
Methanol pro analysi	Merck 1.06009
NaHCO ₃	Merck 106323
Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O	Merck Nr. 6580
NaCl	Merck Nr. 6404
Natrium	Merck 6525
Natriumazid	Merck 106687
Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)	Merck 1.06498
Natriumthiosulfat 99,5%	Sigma-Aldrich 217247
Non-fat-dry-milk =Magermilchpulver	Bio Reed 170-6404
NP-40 = Polyethylenglycol(40)- nonylphenoether	Sigma 9002-93-1
OptiMEM I	Gibco 31985-047
PFA reinst (H ₂ O)	Merck Nr. 2213
Pferdeserum = Donor Horse Serum	Biochrom S9133
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich P7170
Rotihistol	Roth 66401
RPMI 1640 Medium	Biochrom
Salzsäure 36,5-38%	Sigma H1758
SDS = Natriumdodecylsulfat	Serva 20765
SFM II (Serum free medium)	Gibco 11686-029
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (=TRIS)	Merck 1.0382.2500
Wasserstoffperoxid 30%, medizinisch, reinst, stabilisiert	Merck Nr. 1.08597.1000
Zitronensäure	Merck 100244

2.2 Methoden

2.2.1 Immunhistochemie

Bei immunhistochemischen Methoden geht es prinzipiell darum, ein bestimmtes Antigen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern sichtbar zu machen. Die einzelnen Methoden unterscheiden sich in der Art der Anfärbung der Antigene. Grundsätzlich wird der für das Antigen spezifische Primärantikörper durch einen zweiten Antikörper, der mit einem Signalgeber versehen ist, markiert. Dieser Signalgeber wird durch spezifische Entwicklungsmethoden, oder im Falle der Immunfluoreszenz mit Hilfe von Licht einer bestimmten Wellenlänge genutzt, um den Antikörper sichtbar zu machen. Für diese Arbeit wurden drei verschiedene immunhistochemische Methoden genutzt. Die Färbung mit Hilfe von ABC-Komplexen, die Färbung mit der sogenannten APAAP-Methode und bei Zellkulturen Immunfluoreszenz. Im Folgenden sollen diese Methoden genauer beschrieben werden.

2.2.1.1 Vorbehandlung von paraffinierten Schnitten

Um das Antigen für Antikörper zugänglich zu machen, ist es nötig, die Schnitte zu entparaffinieren. Dies geschieht über die sogenannte Entparaffinierungsreihe. Hierbei handelt es sich um Chemikalienbäder, die die Schnitte nacheinander durchlaufen: Als erstes zwei Bäder in Rotihistol je 10 min, anschließend je 5 min in Isopropanol und Ethanol in den Verdünnungen 96%, 80%, 70% und 50%. Dann werden die Präparate 2 min. in Acetatpuffer gekocht und weiter nach der ABC oder APAAP-Methode verarbeitet.

2.2.1.2 Fixierung von gefrorenen Schnitten

Gefrorene Schnitte wurden aus Geweben hergestellt, die direkt nach Entnahme aus dem Operationssitus in flüssigem Stickstoff fixiert wurden. Um die hieraus hergestellten - nach Verarbeitung bei -80°C gelagerten – Schnitte vor Weiterverarbeitung zu fixieren wurden zwei verschiedene Fixierungsmethoden verwendet: Zum einen die Fixierung für 20 min. in 4% Paraformaldehyd, zum

anderen die Fixierung für 2-5 min. in Methanol-Aceton. Welche Fixierung sich bei welchem Antikörper am besten eignete, wurde vor den eigentlichen Versuchen in Probereihen ausgetestet. Diese werden im Ergebnisteil beschrieben.

2.2.1.3 Immunhistologie in der APAAP Methode

Die APAAP- Methode (Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase) wurde in dieser Arbeit zum Nachweis von Tenascin-C an paraffinierten Schnitten verwendet. Sie wurde erstmalig von Cordell et al. (1984) beschrieben, und dient wie die ABC-Methode dazu, mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion ein Substrat sichtbar zu machen. In diesem Falle wird an den Primärantikörper, welcher an TnC bindet (Anti-TnC 608) ein Brückenantikörper gebunden (Dako # Z 0259), an diesen wiederum bindet der enzymmarkierte APAAP Antikörper (Maus Fa Dako # Z 0259). An letzterem wurde das Substrat Naphtholphosphatester mit Hilfe des Enzyms Alkalische Phosphatase zu Phosphaten und Phenolanteilen hydrolysiert. Dieses bildete mit Neufuchsin (Fast-Red Dako #0699) einen unlöslichen Farbstoff, womit letztlich die Bindungsstelle sichtbar markiert wurde.

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert (vgl. 2.2.1.1), anschließend 2x 5min in TBS-TX100 (TBS mit 0,1% Triton X100) gewaschen. Anschließend erfolgte das Kochen der Schnitte für 3 Minuten im Citratpuffer. Der Primärantikörper Anti TnC 608 wurde in Verdünnungslösung (Dako S-3022) in unterschiedlichen Verdünnungen (s. 3.2.1) verwendet, letztlich stellte sich eine Verdünnung von 1:100 als sinnvollste heraus. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Kühlschrank (4°C). Anschließend wurden die Schnitte viermal fünf Minuten in TBS gewaschen. Der Brücken-Antikörper wurde zugegeben, nachdem er 1:50 in RPMI mit 10% Humanserum verdünnt wurde, die Inkubation erfolgte 30 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen (1 x TBS-TX 100 für 5 min) wurde der 1:50 in RPMI verdünnte APAAP-Antikörper zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederum wurden die Reste durch Waschen (2 x TBS-TX 100 für 5 min) entfernt, der Fast-Red Entwickler auf die Schnitte gegeben und 30 min inkubiert. Die Entwicklung wurde mit Aqua-dest gestoppt und 2 min mit Hämalaun gegengefärbt. Nach 10 min bläuen unter Leitungswasser wurden die Schnitte mit Glyceringelatine eingedeckt und ausgewertet.

2.2.1.4 Immunhistologie in der ABC-Methode

Die Avidin-Biotin-Complex-Methode nach Hsu, Raine und Fanger (1981) stellte sich bei gefrorenen Schnitten als beste Färbemethode zum Nachweis der TnC Antikörper und der Neurotensin-1-Rezeptor-Ak heraus. Avidin wird bei dieser Methode aufgrund seiner Biotinbindungsfähigkeit als molekulare Brücke zwischen Biotin-markierten Sekundär -Antikörpern und dem Peroxidase markierten Biotin verwendet, welches die Farbreaktion in Gang setzt.

Nachdem die Schnitte bei Raumtemperatur aufgetaut wurden und mit Fettstift umkreist wurden, erfolgte zunächst die Fixierung (vgl. 2.2.1.2). Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen (2 x 5 min) und mit 3% Wasserstoffperoxid in PBS für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um Fehlreaktionen zu vermeiden, erfolgte nun die Blockierung von möglichen Fehlbildungsstellen mittels Avidin-Biotin Blockierungskit (Fa. Dako X-0590 20 min Lösung 1 auf den Schnitten, dann 20 min Lösung 2 bei Raumtemperatur) Nach erneutem Waschen (2 x 5 min PBS) erfolgte die Inkubation in 2% Magermilchpulver über 30 min, nochmaliges Waschen (2 x 5 min PBS) und schließlich die Zugabe von 100 µl des Primärantikörpers in der gewählten Verdünnung in 0,1% BSA/PBS. Auf jedem Objektträger waren zwei Schnitte des gleichen Gewebes. Der zweite wurde lediglich mit 0,1% BSA/PBS ohne Antikörper inkubiert um ggf. Fehlreaktionen detektieren zu können. Es erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C. Am folgenden Morgen wurde der nicht gebundene Antikörper mittels Waschen entfernt (4 x 5 min PBS) und der entsprechende Sekundärantikörper (vgl. 2.1.4) in 1:400 Verdünnung in PBS für 30 min auf den Schnitten inkubiert. Dieser wurde danach abgewaschen (1 x 5 min PBS) und der ABC-Komplex (Vector Laboratories Inc.), dessen zwei Lösungen in 5 ml PBS gemischt und dann 30 min inkubiert wurden, für 30 min auf den Schnitten inkubiert. Die Farbreaktion wurde nach erneutem Waschen (2 x 5 min PBS und anschließend kurz Aqua-dest) mittels AEC-Substrat (frisch angesetzt mit 3,8 ml Acetatpuffer pH 5,00 + 200µl AEC + 2µl Wasserstoffperoxid, filtriert) ausgelöst. Das Unterbrechen der Farbreaktion erfolgte nach Vorversuchen nach einer definierten Zeit mittels Aqua-dest. Dann wurde 2 min mit Hämalaun gegengefärbt. Nach 10 min bläuen unter Leitungswasser wurden die Schnitte mit Glyceringelatine eingedeckt und ausgewertet.

2.2.1.5 Auswertung Immunhistochemie

Die Auswertung der gefärbten Präparate erfolgte in drei verschiedenen Schritten. Zuerst wurde die Intensität der Färbung in einer Skala von 0 bis 3 angegeben. Bei 0 war keine Färbung festzustellen, eine Färbestufe von 1 bedeutete eine erst bei einer mehr als 25 fachen Vergrößerung feststellbare Färbung. Färbestufe 2 war eine bei 25facher Vergrößerung leicht sichtbare Färbung und Stufe 3 war bei 25facher Vergrößerung stark rot gefärbt.

In einem zweiten Schritt wurde der prozentuale Anteil gefärbten Gewebes gegenüber dem Gesamtgewebe in 25facher Vergrößerung abgeschätzt.

Schließlich erfolgte die morphologische Einordnung des gefärbten Gewebes und die Abgrenzung von Artefakten.

Alle Befunde wurden in 25facher und ausschnittsweise in 200facher Vergrößerung photographisch dokumentiert.

Diese Untersuchung wurde von zwei Untersuchern unabhängig voneinander vorgenommen.

Die pathologische Diagnose, die bei allen Präparaten bekannt war, wurde mit den erhobenen Befunden verglichen. Die statistische Auswertung wird gesondert behandelt (s.u.).

2.2.2 Zellkultur

Zur Transfektion für unsere Untersuchungen wurden die Zelllinien CHO, HEK 293 und MiaPaCa-2 ausgewählt. Genauere Informationen hierzu finden sich unter 2.1.2. Die Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Luft, 5% CO₂ und H₂O-gesättigter Atmosphäre auf 100 mm Zellkulturschalen bzw. 25 cm² Zellkulturflaschen unter regelmäßiger Kontrolle bis zur Konfluenz inkubiert. Es erfolgte alle zwei Tage ein Medienwechsel. Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden unter einer Laminar flow-Sterilbank vorgenommen. Die zelllinienspezifische Medienzusammensetzung kann im Materialteil nachgesehen werden (2.1.2). Konfluente Zellen wurden im Verhältnis 1:2 subpassagiert. Dies geschah, indem das Medium entfernt wurde, und die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung 5 Min. bei 37°C inkubiert wurden. Hierdurch lösten

sie sich vom Boden des Wachstumsgefäßes. Bei 800 rpm wurden die Zellen zentrifugiert und das Sediment in steril filtriertem Kulturmedium resuspendiert und auf mehrere Kulturschalen verteilt.

Um die Immunfluoreszenz durchzuführen, wurden sterile Deckgläschen auf dem Boden einer Kulturschale verteilt. Die Versuche erfolgten, sobald die Zellen adhärent wuchsen.

2.2.3 Transfektion

Bei der Transfektion handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Fremd-DNA in Zellen einer Zellkultur eingebracht wird. In diesem Falle wurden CHO-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, auf dem der Neurotensinrezeptor 1 codiert war. Dies geschah mithilfe von Jet-Pei®. Dabei handelt es sich um ein Polymer, welches mit der DNA kompakte, positiv geladene Partikel bildet. Diese binden an Proteoglykane in der Zellmembran und werden von der Zelle per Endozytose internalisiert. In der Zelle angekommen wird die DNA freigesetzt, indem das Endosom osmotisch anschwillt und rupturiert. (Boussif et al 1995, Kichler et al. 2001).

2.2.4 Immunfluoreszenz Zellkulturen

Die Deckgläschen mit konfluent wachsenden Zellen (vgl. 2.2.2) wurden aus den Kulturschalen entnommen, kurz mit PBS gespült und für 2 min bei Raumtemperatur mit Methanol-Aceton (1:1) fixiert. Nach kurzem Trocknen an der Luft wurden sie mit PBS und 5% Ziegen Serum für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Fehlreaktion zu vermeiden. Es erfolgte das Waschen (3 x 10 min PBS). Anschließend wurden die Primärantikörper (Verdünnung und Ak s. 3.1.1) aufgegeben und für 1h in einer sogenannten feuchten Kammer inkubiert. Zur Negativkontrolle wurden einige Deckgläschen nur mit Verdünnungsmedium ohne Primärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 10 min PBS) wurde der an Texas-Red gekoppelte Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper aufgetragen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 10 min PBS) erfolgte die Fixierung mit 96% Ethanol für 2 min und nach Trocknung das Eindeckeln mit Glycerol/Gelatine. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch

mit Anregung im spezifischen Wellenlängenbereich (Absorptionsmaximum 567nm) für Texas Red.

2.2.5 Proteinlysate aus Zellkulturen

Es wurden Schalen mit konfluent wachsenden Zellen verwendet, von denen das Nährmedium abgesaugt wurde, Alle im folgenden verwendeten Lösungen waren vorgekühlt um ein Erwärmen zu vermeiden. Die Zellen wurden mit PBS gespült und die Kulturschale auf Eis gestellt. Zur Lösung der Zellen und zur Verhinderung einer Proteolyse wurden pro Schale 800 µl TNA-Puffer und 400 µl 3%-ige NP-40-Puffer mit der entsprechenden Konzentration der Proteaseinhibitoren zugegeben (2 mM PMSF, 2 mM Benzamidin, 2 µg/ml Aprotinin und 20µg/ml Leupeptin). Es erfolgte die 10 minütige Inkubation auf Eis und nach dem Abkratzen der haftenden Zellen die Überführung in ein Eppendorf-Hütchen. In diesem wurden die Zellen resuspendiert und erneut 10 min auf Eis inkubiert. In einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge der Fa. Sigma bei 20.000 g wurde anschließend für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, bei dem es sich um das *Proteinlysate* handelt, wurde abpipettiert und 1:1 mit 2x SDS-PP gemischt. Anschließend wurden die so gewonnenen Lysate bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Lagerung erfolgte, soweit nötig, bei -20°C.

2.2.6 Proteinlysate aus Geweben

Proteinlysate aus Geweben wurden für den Western Blot verwendet. Dazu wurden Stücke von auch in der Immunhistologie verwendeten Patientenmaterial zuerst mit Hilfe von Skalpellern zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebstücke nach Zugabe von TNA-Puffer und Proteaseinhibitoren (PMSF, Benzamidin, Aprotinin und Leupeptin) in einem Eppendorfhütchen mit einem Ultra Turrax Messer homogenisiert. Der 3xDetergenz-Mix wurde zugegeben und die Proben für 20 Minuten auf Eis gekühlt. Nach 10 minütigem zentrifugieren bei 20.000g in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge der Fa. Sigma wurde das Proteinlysate als Überstand abpipettiert.

2.2.7 Western Blot

In der Methode des Western-Blot werden Proteine zuerst elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen um sie dort mit Hilfe von Antikörpern sichtbar zu machen. Die beiden Schritte werden der Übersichtlichkeit halber getrennt beschrieben.

2.2.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Im Rahmen der vertikalen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine entsprechend ihrer Molekulargewichte aufgetrennt. Dies erfolgt in einem Puffersystem in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) (Laemmli 1970).

Die Proteine wandern also, bildlich gesprochen, je nach ihrer Masse in einer unterschiedlichen Geschwindigkeit durch das Trenngel, dessen Polyacrylamidkonzentration die Laufgeschwindigkeit bestimmt und je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Zielproteins unterschiedlich gewählt wird. Bevor die Proteine jedoch getrennt werden, erfolgt die Konzentration der Proteine in einem sogenannten Sammelgel.

Zur Detektion von Tenascin-C (je nach Spleißvariante 200 bis 300 kDa) wurde ein 6% Trenngel verwendet. Zur Detektion des Neurotensin-Rezeptors 1 (ca. 55 kDa) ein 10% Gel.

Das Trenngel wurde zwischen Glasplatten (11 x 16 cm) gegossen, die durch Kunststoffspacer in einen Abstand von 1 mm gebracht worden waren. Danach wurde das Sammelgel vorsichtig auf das Trenngel gegeben. In dieses wurde ein Kunststoffkamm zur Erstellung der Probenaschen eingedrückt. Dann wurde die Verfestigung durch Polymerisation abgewartet.

Anschließend wurden jeweils 40 µl der Proteinlysate, die zuvor 5 Min. bei 95°C denaturiert wurden, in die entsprechend gekennzeichnete Probenaschen aufgetragen.

Für 10 min wurde eine Spannung von 80 V angelegt, um die Proteine vom Sammel- in das Trenngel übergehen zu lassen. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei 200 V für weitere 120 Min. Als Meßleiter wurde der Molekulargewichtsmarker *rainbow marker* der Fa. Biorad eingesetzt, bei dem definierte, unterschiedlich gefärbte Banden definierte Massen haben. Nach der stattgehabten Elektrophorese wurde das Gel letztendlich in Kathodenpuffer (K-Puffer) überführt.

2.2.7.2 Western Blot

Nach Auftrennung der Proteine im Rahmen der SDS-Gel-Elektrophorese erfolgte der eigentliche *Western Blot* nach *Towbin et al. (1979)*.

Hierbei werden die aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer auf eine Hybond C Nitrocellulosemembran übertragen (sog. *blotting*). Hierzu wird das Gel auf die Membran aufgelegt und von in Puffern (K-Puffer/ A1/ A2-Puffer) getränkten Filterpapierschichten umgeben. Die Übertragung erfolgte in der Trans-Blot-Apparatur der Fa. Biometra. In dieser wurde für 95 Min eine Stromstärke von 400 mA (= 3 mA/cm²) angelegt. Hierbei wurden die Proteine auf die Nitrocellulosemembran im Sandwichverfahren elektrotransferiert.

Die Proteinbanden wurden anschließend durch einminütige Färbung mit Ponceau S Lösung sichtbar gemacht. Die Membran wurde ggf. zertrennt und beschriftet.

Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurden die Membranen in einem Puffer aus 5% Magermilchpulver in PBS mit 0,2% Tween (PBST) für 30 Min auf einem Schüttler inkubiert. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit *TnC bzw NTR-1 Antikörpern* in zuletzt genanntem Puffer bei 4°C auf einem Schüttler.

Um den nicht spezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Membranstreifen am Folgetag dreimal PBST gewaschen. Nun wurde der Sekundärantikörper (vgl. 2.14) ebenfalls in Magermilchpulverlösung gegeben und für 30 min inkubiert. Diese enzymgekoppelten Antikörper wurden durch das *ECL (TM) (enhanced chemiluminescence)* Western Blot Analysesystem sichtbar gemacht. Die am Sekundärantikörper gebundene Peroxidase katalysiert die Oxidation des Wirkstoffs Luminol unter alkalischen Bedingungen, wobei es zur Emission von Licht im Wellenlängenbereich von 428 nm kommt. Das aus zwei Komponenten bestehende ECL-Reagenz wurde für eine Minute auf die Blotmembran gegeben. Dann wurde unter Dunkelkammerbedingungen ein Autoradiographiefilm für (je nach erwarteter Signalintensität) unterschiedliche Zeit in einer Filmkassette auf die Membran aufgelegt und dieser somit belichtet. Abschließend erfolgte die Filmentwicklung in einer Dunkelkammer.

2.2.8 Autoradiographie

Bei der Autoradiographie wird ein Molekül durch Bindung eines radioaktiv markierten Stoffes sichtbar gemacht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Neurotensinrezeptoren durch ¹²⁵Jod-markiertes Neurotensin und Somatostatinrezeptoren durch ¹²⁵Jod-markiertes Somatostatin-14 markiert. Dies erfolgte gemäß der vorbeschriebenen Versuche von Reubi et al. (1998 und 1999.2). Grundsätzlich wurden die mikroskopischen Schnitte oder Deckgläser mit Zellkulturen mindestens 3 Tage zuvor im Gefrierschrank aufbewahrt. Anschließend wurden sie aufgetaut, die Schnitte markiert und 5 min. in den Präinkubationspuffer gestellt. Anschließend wurden sie eine Stunde lang bei Raumtemperatur im Inkubationspuffer gemeinsam mit dem markierten Liganden in der Verdünnung von etwa 1:100 (~100 pM), bzw. zur Kontrolle mit einem 100fachen Überschuss (~1 µM) Liganden versehen, inkubiert. Nach 4 Waschgängen im Waschpuffer wurden die Schnitte getrocknet.

Nach vollständiger Trocknung im kalten Luftstrom wurden die Präparate unter einen Film gelegt und dieser nach drei Wochen entwickelt. Da sich diese Methode als nicht ausreichend sensibel erwies, wurden weitere Präparate mit der Photoemulsion LM-1 überzogen und zwei Wochen lang dunkel gelagert. Nach zwei Wochen erfolgte die Entwicklung.

2.2.9 Statistische Tests

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 16.0 für Mac OS sowie mit SPSS 12.0 für Microsoft Windows vorgenommen. Im Einzelnen wurden folgende Verfahren verwendet:

- Der Kolmogorov-Smirnoff-Anpassungstest zur Überprüfung ob die verwendeten Daten normalverteilt waren.
- Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur Überprüfung der Signifikanz von Unterschieden zwischen zwei Stichproben, er basiert darauf dass die Differenzen zwischen zwei Stichproben mit Rangzahlen versehen werden. Der sich hierbei ergebende z-Wert ist eine Prüfgröße, die auf den negativen Rängen (d.h. der Zahl der negativen Differenzen) basiert. Zudem wird die Irrtumswahrscheinlichkeit der Hypothese wie beim folgenden Test auch mit p angegeben.

- Der Mann-Whitney-U-Test bei dem die Mediane zweier Stichproben verglichen werden, indem ihnen ebenfalls Rangzahlen zugeordnet werden.
- Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman bei dem einzelnen Werten Ränge zugeordnet werden. Ein Wert nahe 1 zeigt hierbei daß die Werte der beiden Variablen einen gleichsinnigen, ein Wert nahe -1 einen gegensinnigen Verlauf an, ein Wert = 0 zeigt an, dass kein monotoner Zusammenhang erkennbar ist.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms SPSS 16.0 für MacOS Boxplots erstellt. Hier wird mit einem fetten Strich der Median dargestellt, die obere Begrenzung des Kastens (Box) stellt das 1. Quartil dar, die untere das 3. Quartil. Die nach oben und unten ausfahrenden Striche (Whisker) entsprechen dem Maximum und Minimum, welches die Werte angenommen haben,

3. Ergebnisse

Im Ergebnisteil werden zuerst die Untersuchungsergebnisse zum Vorkommen des Neurotensin-Rezeptors-1 und anschließend das Vorkommen von Tenascin in Ösophagustumoren dargestellt. Hierbei werden jeweils zunächst immer die Evaluation der Antikörper, anschließend die Untersuchungsergebnisse mit den Antikörpern und schließlich die Untersuchungsergebnisse mit eventuell anderen Methoden angegeben

3.1 Neurotensin Rezeptor 1

3.1.1 Evaluation der Antikörper

Vor dem Einsatz an größeren Probenmengen wurden die Antikörper im Rahmen von Evaluationsversuchen überprüft.

In ersten Evaluationsversuchen mit den Antikörpern ab13201, sc25042, sowie sc7596 an Gefrierschnitten von Ileumkontrollgewebe zeigte sich eine deutliche Färbung schleimbildender Zellen in allen Konzentrationen.

In weiteren immunhistochemischen Versuchen, bei denen die o.g. Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen und mit Fixierungen in Methanol-Aceton sowie Paraformaldehyd getestet wurden, zeigte sich, dass beide Fixierungsmethoden gleichwertige Ergebnisse brachten. Als optimale Konzentration der Antikörper für die Immunhistochemie stellte sich 2 µg/ml (1/100) heraus.

Zur weiteren Evaluation der Antikörper wurden auf Deckgläschen ausgesäte CHO-, MiaPaca-2 und HEK- Zellen mit Neurotensin-Rezeptor 1- Plasmiden transfiziert. In der anschließenden Immunfluoreszenzuntersuchung zeigte sich eine deutliche Fluoreszenz bei Zellen, die mit sc25042 untersucht wurden (Abbildungen 1 bis 4). Bei den mit sc7596 und ab13201 untersuchten transfizierten Zellen, zeigte sich keine derartige Fluoreszenz. Diese Ergebnisse waren bei Kontrollversuchen reproduzierbar. Nicht transfizierte HEK-Zellen (Negativkontrolle) zeigten keine Färbung.

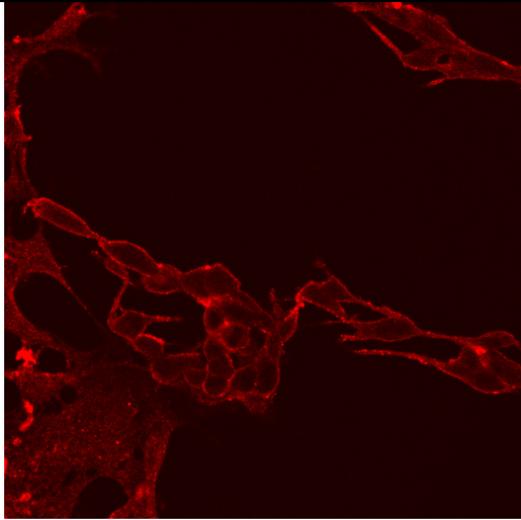


Abbildung 1: HEK Immunfluoreszenz sc25042, Die NTR-1-positiven, transfizierten Zellen zeigen eine rote Membranfluoreszenz (50x)

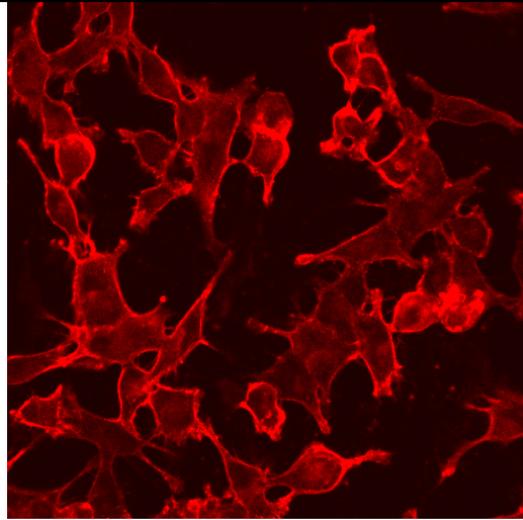


Abbildung 2: Mia PaCa-2 Immunfluoreszenz sc25042, Die NTR-1-positiven, transfizieren Zellen zeigen eine rote Membranfluoreszenz (50x)

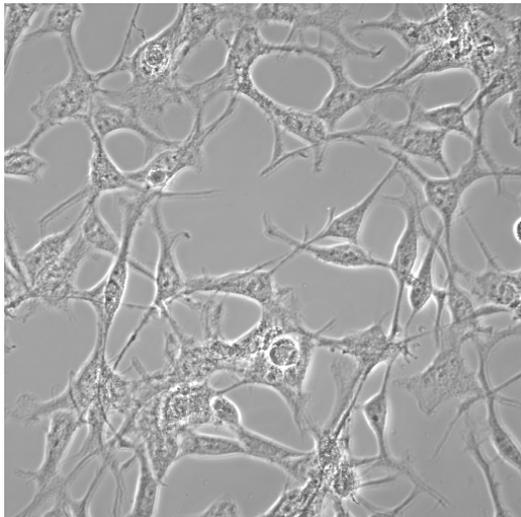


Abbildung 3: Mia PaCa-2 Durchlichtbild (50x)

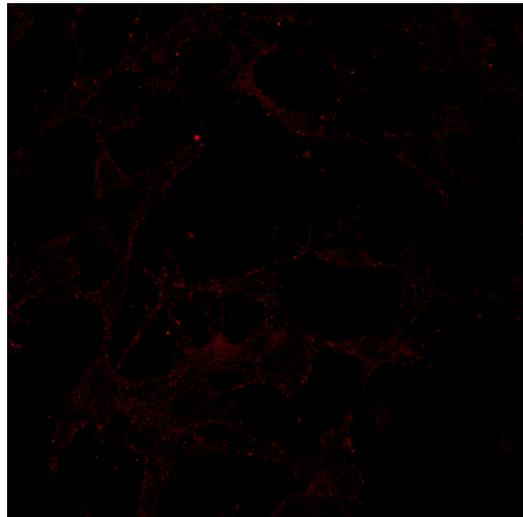


Abbildung 4: Mia PaCa-2 Immunfluoreszenz sc25042. Hier eine nicht-transfizierte Kontrolle, die Zellen sind kaum zu erahnen. (50x)

Vor allem aufgrund der positiven Ergebnisse in der Immunfluoreszenz und der Ergebnisse der Immunhistochemie wurde der Antikörper sc 25042 von Santa Cruz

zur weiteren Arbeit genutzt. Die besten Ergebnisse brachte der Antikörper in einer Konzentration von 2 µg/ml.

3.1.2 Ergebnisse der systematischen Färbungen

In den Färbungen an gefrorenen Gewebeschnitten wurden Operationspräparate von 54 Patienten, die an der Charité, Campus Virchow Klinikum, operiert worden waren, gefärbt und untersucht. Hierbei wurden sowohl Adeno- als auch Plattenepithelkarzinome untersucht. Als Kontrollgewebe fungierte mikroskopisch tumorfreies Ösophagusgewebe von 36 dieser 54 Patienten (im folgenden Kontrollgewebe). Es war nicht von allen Patienten Kontrollgewebe vorhanden.

Zu jedem Schnitt, egal ob Kontroll- oder Tumorgewebe, wurde eine Kontrolle mitgeführt, die genauso behandelt wurde, allerdings nicht mit dem Antikörper in Berührung kam, sondern lediglich mit dem Verdünnungsmedium. Färbungen bei diesen Kontrollen wurden nicht beobachtet.

Insgesamt wurden 90 Operationspräparate, sowohl Kontroll- als auch Karzinomgewebe gefärbt und ausgewertet. Sämtliche vorhandenen Gewebeschnitte waren bei -80°C gelagert worden. Sie wurden immunhistochemisch mit sc 25042 in der ABC-Methode gefärbt und mit Hämalaun gegengefärbt.

Dabei ergab sich eine Färbung der glatten Muskulatur (Abbildungen 5 und 6). Die Färbungen von Muskelgeweben ergaben sich sowohl im Karzinom- als auch im Kontrollgewebe. Dies entsprach der zu erwartenden Färbung gemäß der Literatur (vgl. Diskussion).

Bei den 54 untersuchten Karzinompräparaten wurden spezifische Färbungen um Einzelzellen oder Zellverbände von zwei unabhängigen Untersuchern in insgesamt 10 Fällen (von 54) konstatiert. Dabei war zu sehen, dass die Zellen entsprechend der Lokalisation des Neutensinrezeptors in der Zellmembran, genau im Bereich der Plasmamembran eine Färbung aufwiesen. Diese Färbung war bei Tumorzellen zu finden. Sämtliche dieser Färbungen tauchten im Tumorgewebe auf. Im Kontrollgewebe wurde keine derartige Färbung gezeigt (vgl. Abbildungen 7 und 8). Zum Alter der Patienten, zu deren Geschlecht sowie zum TNM-Stadium zeigte sich

keine Korrelation. Eine Erfassung nach dem in 2.2.1.5 vorgestellten System wurde aufgrund der geringen Fläche der Färbung nicht als sinnvoll erachtet.

	URTEILER 1	URTEILER 2
	Anteil spezifischer Färbungen der Zellmembran	Anteil spezifischer Färbungen der Zellmembran
1 Karzinomgewebe (n= 54)	10/54	10/54
2 Kontrollgewebe (n=36)	0 / 36	0 / 36

Tabelle 1: Anzahl der spezifischen Färbungen von Tumorzellmembranen in den untersuchten Präparaten, aufgeschlüsselt nach Untersuchern.

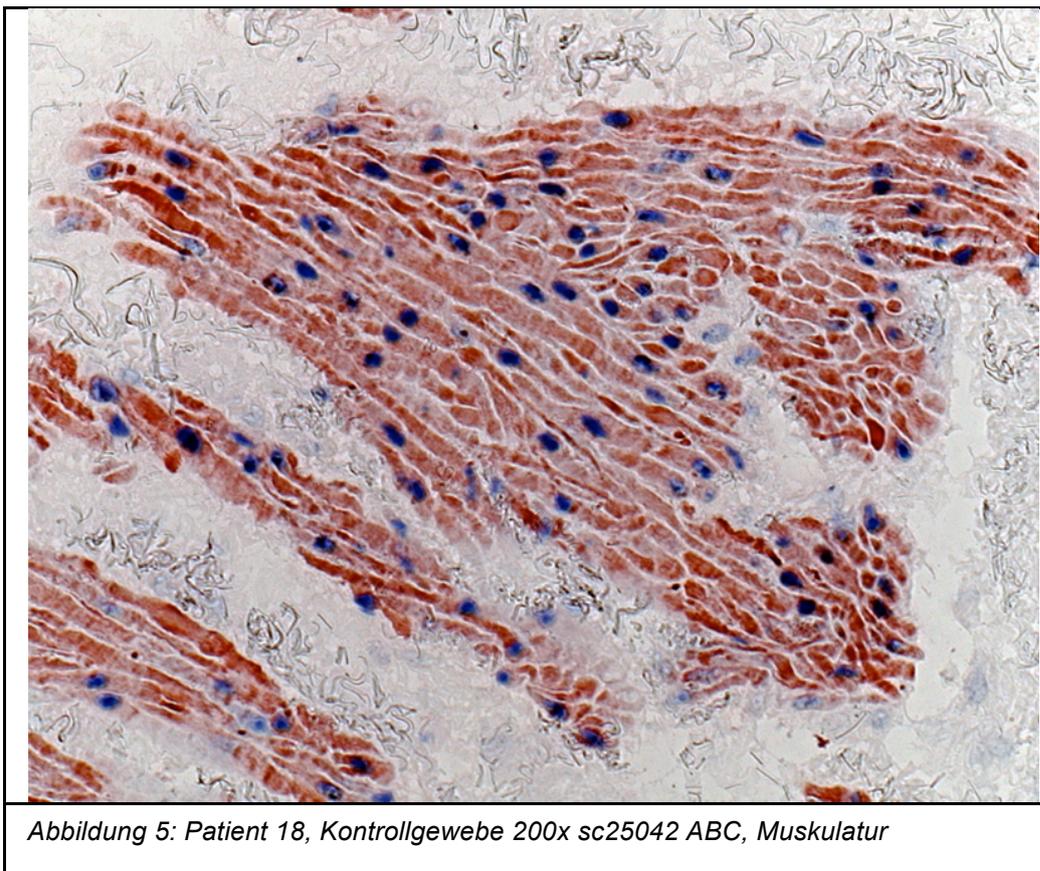


Abbildung 5: Patient 18, Kontrollgewebe 200x sc25042 ABC, Muskulatur

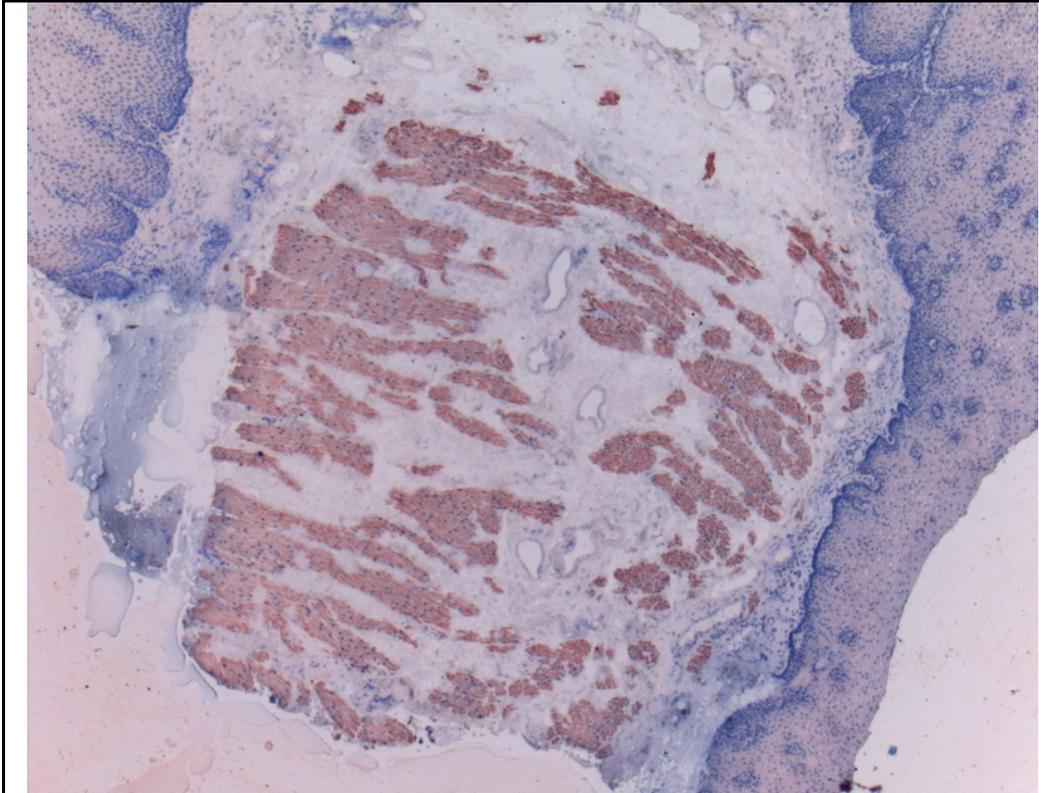


Abbildung 6: Patient 18, Kontrollgewebe 25x sc25042 ABC, Färbung der Muskulatur

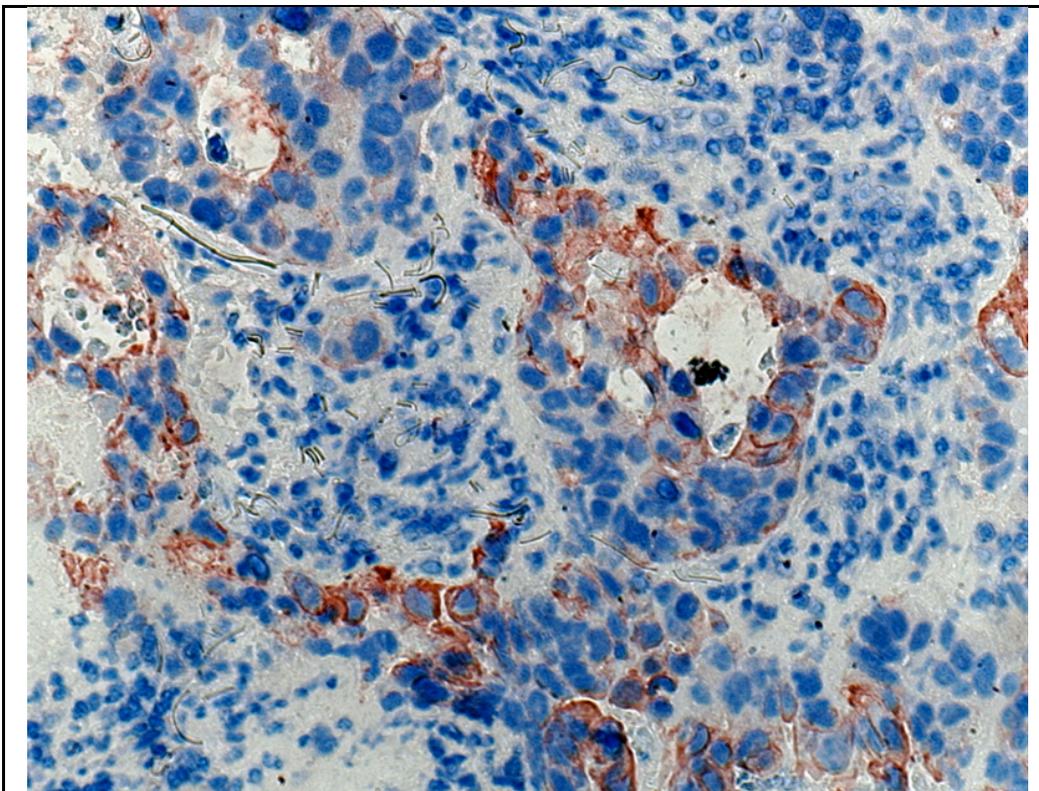


Abbildung 7: Patient 9, Adeno-Ca 200x Färbung der Tumorzellmembranen mit s25042

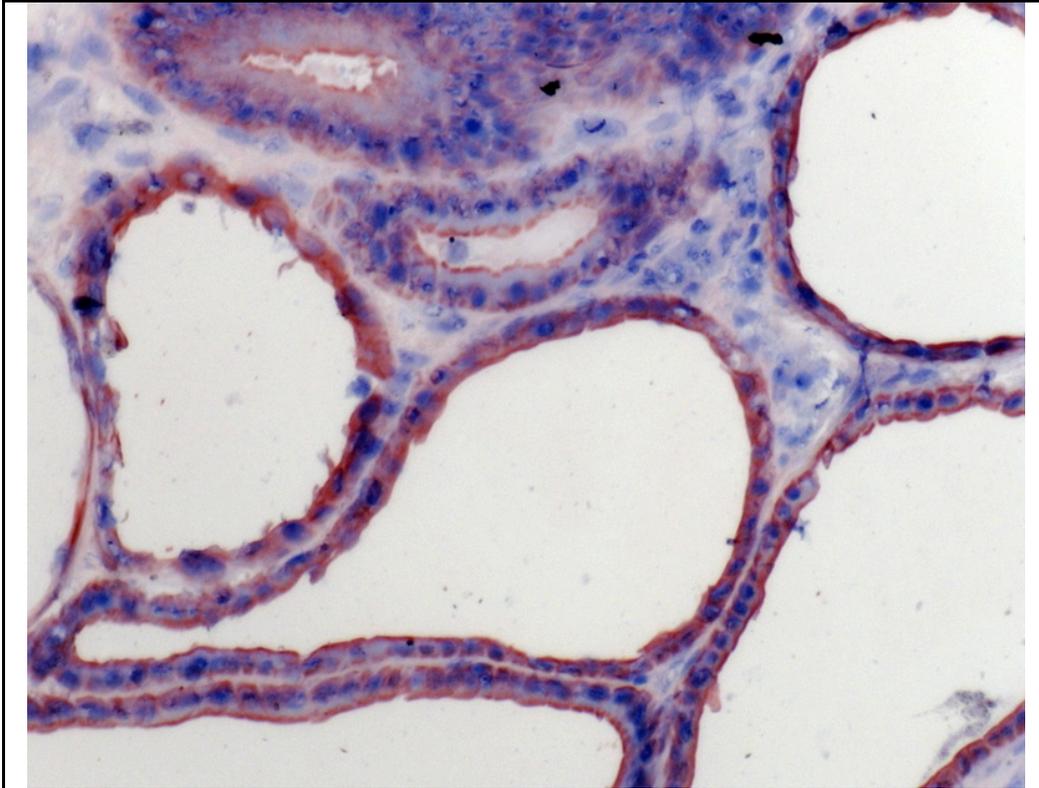


Abbildung 8: Patient 24, Adeno-Ca sc25042 ABC 200x, Färbung der Membranen drüsenartig angeordneter Tumorzellen

3.2 Tenascin C

3.2.1 Optimierung der Färbemethode

Verwendet wurde der monoklonale IgG Mausantikörper Anti-TnC 608 von Professor Faissner, Bochum. Eine spezifische Bindungsdomäne im TnC wurde für diesen Antikörper nicht bestimmt, sicher ist jedoch, dass eine verlängerte Spleißvariante detektiert wird.. Im Western-Blot zeigte dieser Antikörper Banden in der richtigen Größe, im Bereich von 250 kDa; als auch in der Immunhistochemie eine deutliche Bindung im Tumorzellen umgebenden Bindegewebe bei unterschiedlichen Tumorentitäten (Kolorektales Karzinom, Magenkarzinom). Da unterschiedlich fixierte Gewebe (paraffiniert und schockgefroren) verwendet wurden, wurde für beide Fixierungsvarianten getrennt ausgewertet. Es zeigte sich eine optimale Darstellung bei gefrorenen Geweben nach entsprechender Vorbehandlung (vgl. 2.1.1.2) bei einer Verdünnung des TnC Antikörpers 608 von 1:1000 in der Immunhistochemie.

In Paraffin fixierte Gewebe wurden nach entsprechender Vorbehandlung (vgl. 2.2.1.1) in systematischen Versuchen mit 1:100 verdünntem Antikörper inkubiert und nach der APAAP-Methode entwickelt, da diese, bei diesen Geweben, im Vergleich mit der ABC-Färbung deutlichere Ergebnisse als die ABC-Methode ergab.

3.2.2 Ergebnisse der systematischen Färbungen

3.2.2.1 Morphologie der Färbungen

In den Färbungen an gefrorenen Gewebeschnitten wurden – wie auch bei der Untersuchung des Neurotensinrezeptors 1 - Operationspräparate von 54 Patienten, die an der Charité, Campus Virchow Klinikum operiert worden waren, gefärbt und untersucht. Hierbei wurden sowohl Adeno- als auch Plattenepithelkarzinome untersucht. Als Kontrollgewebe fungierte mikroskopisch tumorfreies Ösophagusgewebe von 36 dieser 54 Patienten (im folgenden Kontrollgewebe). Es

war nicht bei allen Patienten Kontrollgewebe vorhanden. Zu jedem Schnitt, egal ob Kontroll- oder Tumorgewebe, wurde eine Kontrolle mitgeführt, die genauso behandelt wurde, allerdings nicht mit dem Antikörper in Berührung kam, sondern lediglich mit dem Verdünnungsmedium. Färbungen bei diesen Kontrollen wurden nicht beobachtet. Bei den mit Antikörper inkubierten Schnitten zeigten sich bei Kontrollgeweben nur wenige Färbungen, diese waren entweder in Gefäßwänden, der Basalmembran oder in Basalkrypten zu finden (vgl. Abbildungen 9 und 10). Bei Karzinompräparaten zeigte sich fast durchgehend eine deutliche Färbung des Stromas, nicht jedoch der Tumorzellen (vgl. Abbildungen 11 bis 14 und 26 bis 33).

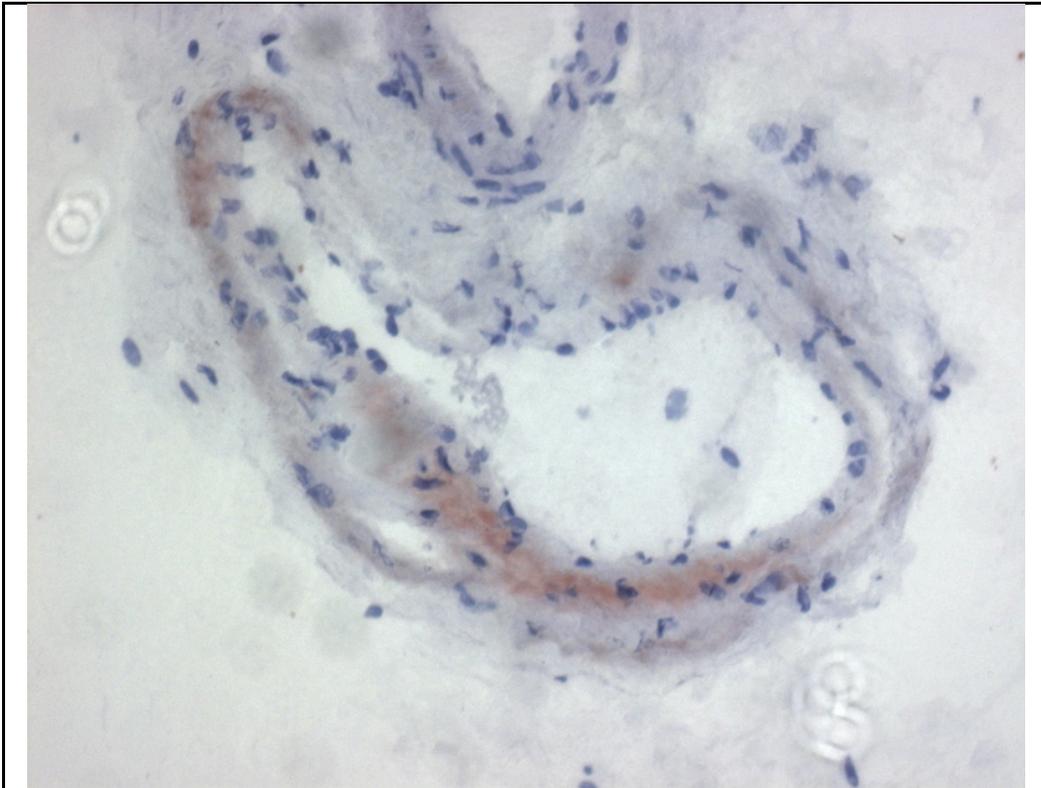


Abbildung 9: Patient 13, Kontrollgewebe, leichte Rotfärbung bei TnC-Färbung im Bereich des Gefäßendothels 200x ABC

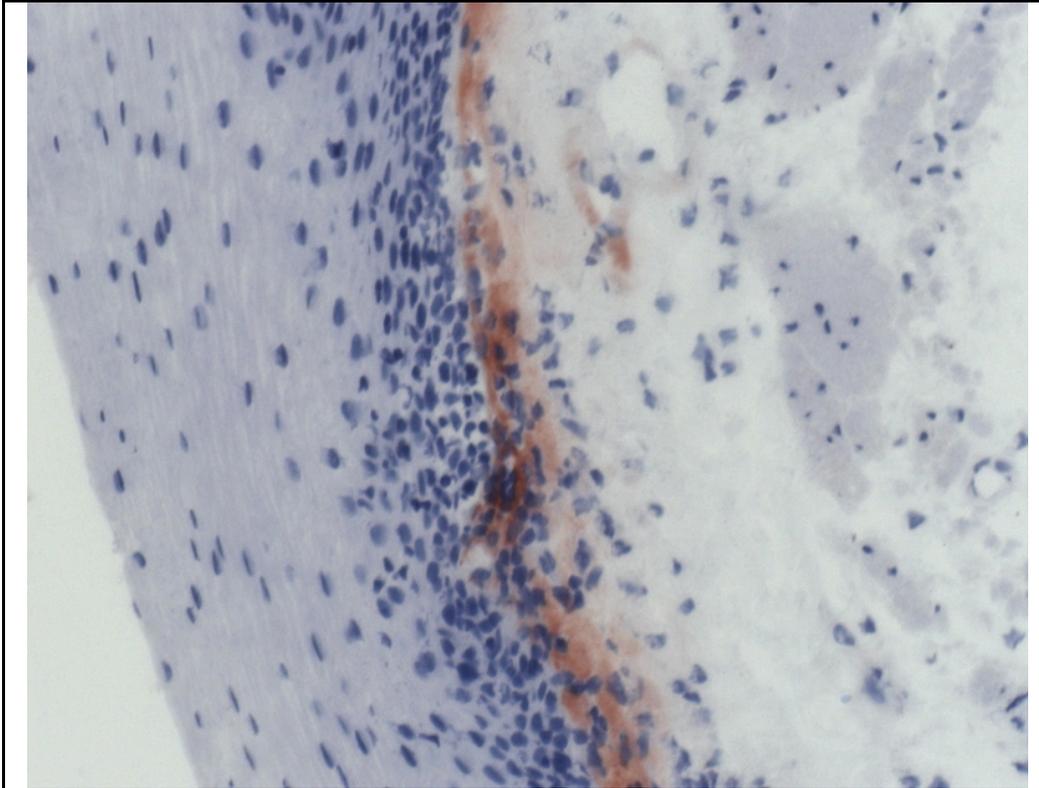


Abbildung 10: Patient 3, Kontrollgewebe 200x, Tnc608, deutliche TnC-Färbung der Basalmembran, das subepitheliale Bindegewebe ist jedoch negativ.

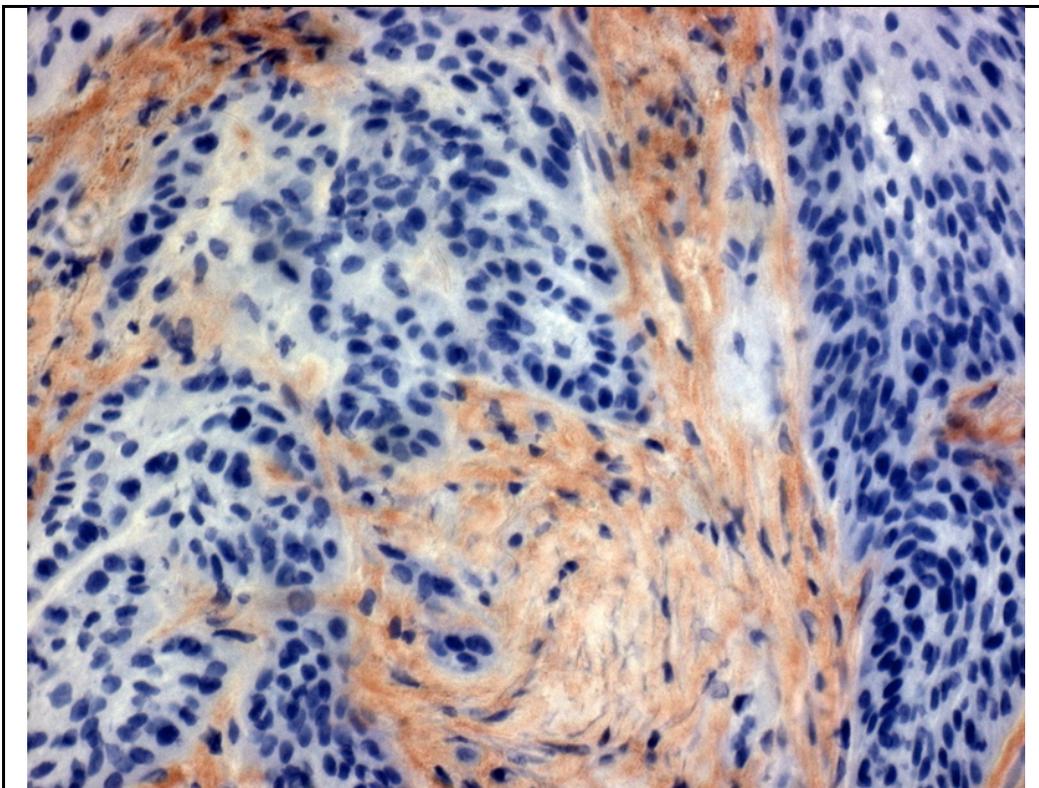


Abbildung 11: Patient 28, Adeno-Ca TnC 608, ABC hier ist die Trennung von Stroma (rot gefärbt) und Tumorzellen deutlich zu erkennen.

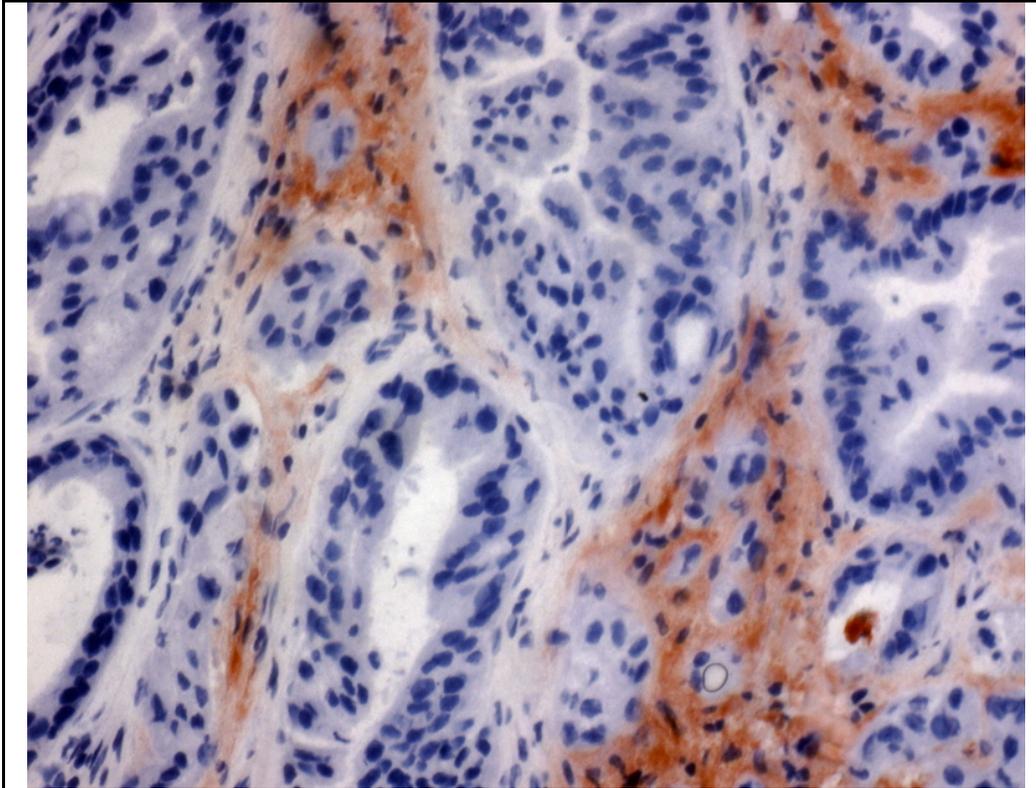


Abbildung 12: Patient 7, Adeno-Ca 200x, Tnc608, deutliche TnC-Färbung zwischen den Tumorzellnestern

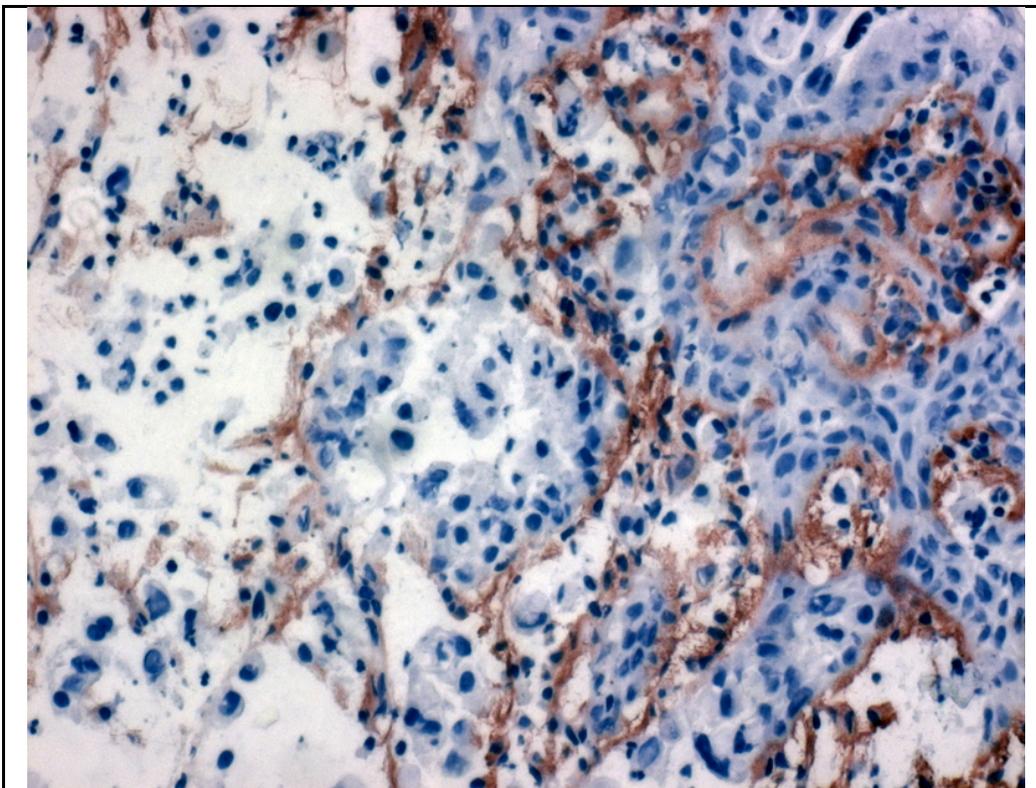


Abbildung 13: Patient 19 PE-Ca 200x ABC, auch hier um die Tumorzellen herum eine Färbung des Tumorstromas

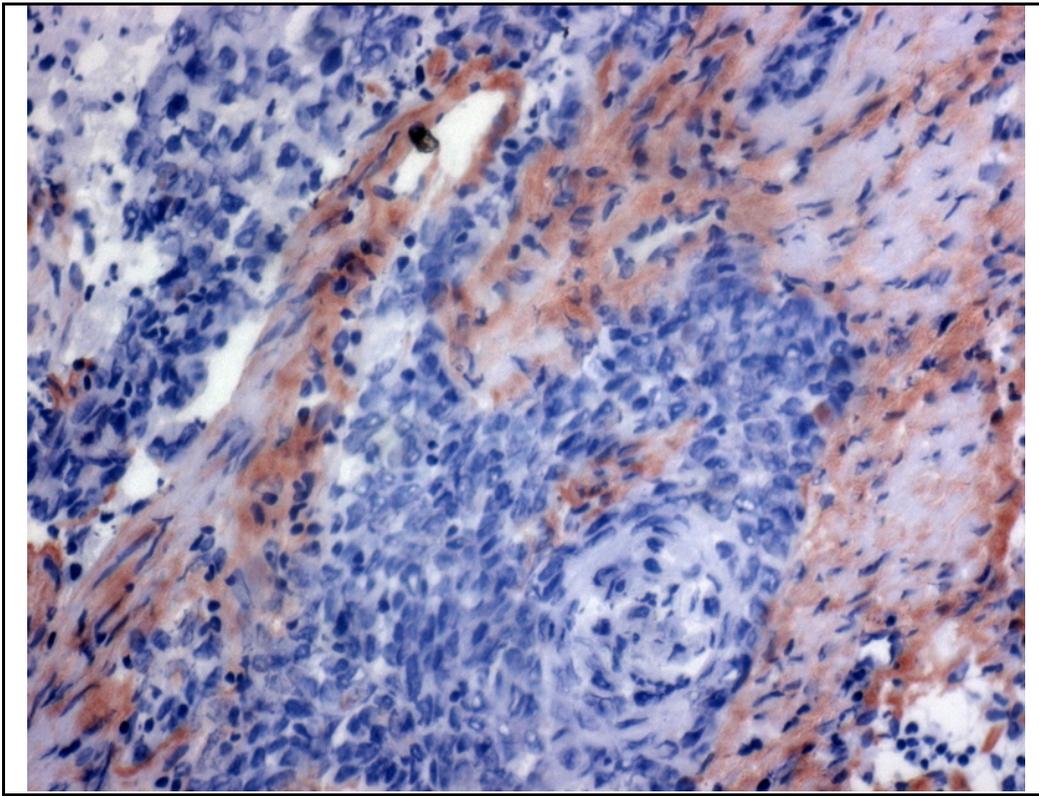


Abbildung 14: Pat. 20, PE-Ca 200x ABC: Färbung des Stromas um die Tumorzellnester

Um nachzuweisen, dass die Färbung tatsächlich im Bindegewebe stattfand, wurden ausgewählte Präparate mit TnC 608 und dem Bindegewebsmarker Vimentin gefärbt. Dabei stellte sich, wie nach Vorpublikationen zu erwarten war, heraus, dass nicht immer das gesamte Bindegewebe TnC-positiv war. Allerdings waren die Teile die TnC-positiv waren, immer auch Vimentin-positiv. Der Antikörper band also nur innerhalb des Bindegewebes. Hier war auffällig, dass lediglich das Bindegewebe um Tumorzellen herum stark positiv war (vgl Abb. 15 und 16).

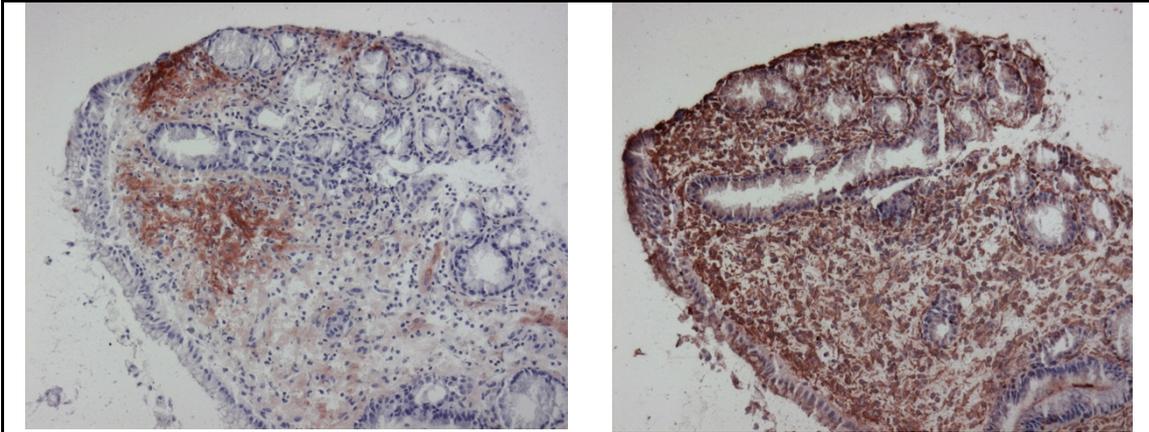


Abbildung 15 und 16: Patient 29, Adeno-Ca, links TnC, rechts Vimentinfärbung 100x, man erkennt, daß links nur ein Teil des Bindegewebes angefärbt ist, rechts jedoch das gesamte Bindegewebe mit Aussparung der Drüsenzellen

3. Ergebnisse

Patient	Gewebe	Beobachter 1				Beobachter 2					
		Flächen- verhältnis Tumor/Rest	Rest positiv in Prozent	Intensität	ar. Mittel Intensität	gew. Mittel Intensität	Flächen- verhältnis Tumor/Rest	Rest positiv in Prozent	Intensität	ar. Mittel Intensität	gew. Mittel Intensität
1	Kontrolle	0/100	3%	0,5-2,0	1,25	1,0	0/100	1%	1	1,00	1,0
1	Adeno-Ca	40/60	30%	0,5-3,0	1,75	2,0	30/70	50%	0,5-3	1,75	2,5
2	Kontrolle	0/100	1%	0,5	0,50	0,5	0/100	0%	0	0,00	0,0
2	Tumor	30/70	25%	1,0-3,0	2,00	2,5	20/80	30%	1,5-3	2,25	2,5
3	Kontrolle	0/100	15%	0,5-3,0	1,75	2,0	0/100	25%	0,5-2,5	1,50	2,0
3	PE-Ca	60/40	70%	0,5-3,0	1,75	2,5	60/40	60%	0,5-3,3	1,75	2,0
4	PE-Ca	10/90	10%	0,5	2,50	2,0	20/80	20%	1,5-3	2,25	2,5
5	Kontrolle	0/100	0%	0	0,00	0,0	0/100	0%	0	0,00	0,0
5	Adeno-Ca	85/15	90%	0,5-2,5	1,50	1,5	60/40	80%	1,5-3	2,25	2,5
6	Kontrolle	0/100	5%	0,5-1,5	1,00	1,0	30/70	10%	0,5-2	1,25	1,5
6	Adeno-Ca	10/90	5%	0,5-1,5	1,00	1,0	30/70	10%	0,5-2,5	1,50	2,0
7	Kontrolle	0/100	15%	0,5-1,5	1,00	0,5	0/100	20%	0,5-1	0,75	1,0
7	Adeno-Ca	40/60	20%	0,5-2,5	1,50	2,0	50/50	15%	0,5-2	1,50	1,5
8	Kontrolle	0/100	5%	0,5-1,0	0,75	0,5	0/100	10%	0,5-1	0,75	1,0
8	Adeno-Ca	60/40	50%	0,5-3,0	1,75	2,5	50/50	20%	0,5-2,5	1,50	2,0
9	Adeno-Ca	60/40	60%	0,5-2,5	1,50	2,0	50/50	40%	1-2,5	1,75	2,0
10	Kontrolle (Barrett)	50/50	5%	0,5-1,5	1,00	0,5	50/50	10%	0,5-1,5	1,00	1,0
10	Adeno-Ca	40/60	90%	1,0-3,0	2,00	2,5	50/50	85%	1,5-3	2,25	2,5
11	Kontrolle	0/100	30%	0,5-3,0	1,75	2,0	0/100	40%	0,5-3	1,75	2,5
11	PE-Ca	30/70	20%	0,5-3,	1,75	2,5	30/70	45%	1-3	2,00	2,5
12	Kontrolle	0/100	10%	0,5-1,0	0,75	0,5	0/100	20%	1	1,00	1,0
12	Adeno-Ca	10/90	40%	0,5-2,5	1,50	1,5	20/80	20%	0,5-2	1,25	1,5
12	Adeno-Ca	30/70	40%	0,5-2,5	1,50	1,5	30/70	30%	0,5-2	1,25	1,5
13	Kontrolle	0/100	2%	0,5	0,50	0,5	0/100	5%	0,5-1	0,75	1,0
13	Adeno-Ca	20/80	5%	0,5-1,5	1,00	1,0	30/70	15%	0,5-1,5	1,00	1,0
14	Kontrolle	0/100	20%	0,5-2,5	1,50	1,5	0/100	30%	0,5-3	1,75	2,0
14	Adeno-Ca	10/90	30%	0,5-3,0	1,75	2,0	30/70	40%	0,5-3	1,75	2,0
15	Kontrolle	0/100	60%	0,5-2,0	1,25	1,5	0/100	50%	0,5-1,5	1,00	1,0
16	Adeno-Ca	15/85	10%	0,5-3,0	1,75	2,0	20/80	15%	0,5-3	1,50	2,0
17	Adeno-Ca	20/80	20%	0,5-3,0	1,75	2,5	40/60	40%	0,5-3	1,75	2,0
18	Kontrolle	0/100	5%	0,5-1,0	0,75	0,5	0/100	5%	0,5	0,50	0,5
18	Adeno-Ca	20/80	40%	0,5-2,5	1,50	1,5	50/50	40%	0,5-2,5	1,50	2,0
19	Kontrolle	0/100	1%	0,5-1,0	0,75	0,5	55/45	5%	0,5-1	0,75	1,0
19	PE-Ca	90/10	80%	0,5-2,5	1,50	2,0	50/50	40%	1-2,5	1,75	2,0
20	Kontrolle	0/100	0%	0	0,00	0,0	0/100	0%	0	0,00	0,0
20	PE-Ca	40/60	90%	1,0-3,0	2,00	2,5	40/60	80%	0,5-3	1,75	2,5
21	Kontrolle	0/100	2%	0,5-1,0	0,75	0,5	0/100	5%	1	1,00	1,0
21	Adeno-Ca	80/20	30%	0,5-2,5	1,50	1,5	40/60	15%	0,5-3	1,25	2,0
22	Kontrolle	0/100	5%	0,5-2,5	1,50	1,0	0/100	5%	0,5-1	0,75	1,0
22	PE-Ca	50/50	70%	1,0-3,	2,00	2,5	40/60	50%	1,5-3	1,75	2,0
24	Kontrolle	0/100	0%	0	0,00	0,0	0/100	0%	0	0,00	0,0
24	Adeno-Ca	20/80	20%	0,5-3,0	1,75	2,5	45/55	30%	0,5-3	1,75	2,5
25	Kontrolle	0/100	10%	1,0-3,0	2,00	2,0	0/100	30%	1-3	2,00	2,0
25	PE-Ca	10/90	50%	1,5-3,0	2,25	2,5	20/80	60%	1,5-3	2,25	2,5
26	Kontrolle	0/100	5%	0,5	0,50	0,5	0/100	10%	0,5	0,50	0,5
26	PE-Ca	50/50	70%	1,0-3,0	2,00	2,5	50/50	70%	1-3	2,00	2,5
27	Adeno-Ca	30/70	70%	0,5-3,0	1,75	2,5	20/80	70%	0,5-3	1,75	2,0
28	Kontrolle	0/100	20%	0,5-2,0	1,25	1,5	0/100	40%	0,5-2,5	1,75	2,0
28	Adeno-Ca	50/50	90%	1,5-3,0	2,25	2,5	50/50	90%	2-3	2,50	2,5
29	Kontrolle	0/100	10%	0,5-2,5	1,50	1,5	0/100	30%	0,5-2	1,25	1,5
29	Adeno-Ca	50/50	15%	0,5-2,5	1,50	1,5	35/65	15%	0,5-2	1,25	1,5
30	PE-Ca	15/85	80%	1,0-3,0	2,00	2,5	50/50	80%	1,5-3	2,25	2,5
31	Tumor	70/30	60%	1,5-3,0	2,25	2,5	60/40	40%	1,5-3	2,25	2,5
32	Kontrolle	0/100	10%	0,5-2,5	1,50	1,0	0/100	20%	0,5-1,5	1,00	1,0
32	Adeno-Ca	70/30	95%	2,0-3,0	2,50	2,5	60/40	95%	1,5-3	2,25	3,0
33	Kontrolle	0/100	10%	0,5-2,0	1,25	1,5	0/100	20%	0,5-1	0,75	1,0
33	Adeno-Ca	90/10	50%	0,5-3,0	1,75	2,0	80/20	25%	0,5-3	1,75	2,5
34	Kontrolle	0/100	5%	0,5	0,50	0,5	0/100	0%	0	0,00	0,0
34	Adeno-Ca	40/60	60%	1,5-3,0	2,25	2,0	45/55	70%	1-3	2,00	2,0
35	Adeno-Ca	20/80	10%	0,5-3,0	1,75	1,5	50/50	25%	1-3	2,00	2,0
35	Adeno-Ca	20/80	5%	1,5-3,0	2,25	2,0	50/50	15%	0,5-3	1,75	2,0
36	Kontrolle	0/100	10%	0,5-1,0	0,75	0,5	0/100	5%	0,5-1	0,75	1,0
36	Adeno-Ca	10/90	25%	1,0-3,0	2,00	2,0	30/70	40%	1-3	2,00	2,0
37	Kontrolle	0/100	10%	0,5-2,0	1,25	1,5	0/100	30%	0,5-2,5	1,50	1,5
37	PE-Ca	20/80	50%	0,5-2,5	1,50	1,5	40/60	40%	1-3	2,00	2,0
38	Adeno-Ca	80/20	10%	0,5-3,0	1,75	1,5	70/30	15%	0,5-2	1,50	1,5
39	Kontrolle	0/100	2%	0,5-1,5	0,75	1,5	0/100	5%	1	1,00	1,0
39	Adeno-Ca	15/85	20%	0,5-2,5	1,50	2,0	25/75	50%	0,5-3	1,75	2,0
40	Kontrolle	0/100	0%	0	0,00	0,0	0/100	0%	0	0,00	0,0
40	Adeno-Ca	70/30	80%	0,5-2,0	1,25	1,5	20/80	30%	0,5-3	1,75	2,0
41	Kontrolle	0/100	2%	0,5	5,00	0,5	0/100	5%	1	1,00	1,0
41	Adeno-Ca	80/20	80%	0,5-2,5	1,50	2,0	50/50	70%	0,5-3	1,75	2,0
42	Adeno-Ca	0/100	8%	0,5-3,0	1,75	1,5	10/90	20%	0,5-2	1,25	1,5
42	Adeno-Ca	70/30	1%	0,5	0,50	0,5	60/40	4%	1	1,00	1,0
43	Adeno-Ca	70/30	1%	0,5	0,50	0,5	60/40	1%	0,5	0,50	0,5
43	Adeno-Ca	15/75	20%	0,5-3,0	1,75	1,5	10/90	25%	0,5-3	1,75	2,0
44	Kontrolle	0/100	20%	0,5-1,5	0,75	0,5	0/100	5%	0,5-1	0,75	1,0
44	Adeno-Ca	50/50	40%	0,5-2,0	1,25	1,0	40/60	40%	0,5-1,5	1,00	1,0
45	Kontrolle	0/100	0%	0	0,00	0,0	0/100	0%	0	0,00	0,0
45	Adeno-Ca	40/60	50%	0,5-2,5	1,50	1,5	40/60	40%	0,5-1,5	1,00	1,0
46	PE-Ca	85/15	40%	0,5-2,5	1,50	1,5	50/50	35%	0,5-2,5	1,50	1,5
47	Kontrolle	0/100	5%	0,5-1,5	0,75	1,0	0/100	10%	0,5-1,5	1,00	1,0
47	Kontrolle	0/100	5%	0,5-1,0	0,75	0,5	0/100	10%	0,5-1,5	1,00	1,0
47	PE-Ca	80/20	80%	1,0-3,0	2,00	2,5	50/50	60%	0,5-3	1,75	2,0
48	PE-Ca	10/90?	1%	0,5	0,50	0,5	15/85	5%	0,5	0,50	0,5
49	Kontrolle	0/100	5%	0,5-3,0	1,75	2,0	0/100	15%	0,5-2,5	1,50	1,5
49	Adeno-Ca	70/30	30%	1,0-2,5	1,75	2,0	60/40	20%	0,5-3	1,75	2,0
50	PE-Ca	10/90	50%	1,0-3,0	2,00	2,5	30/70	30%	1,5-3	2,25	2,5
51	Adeno-Ca	20/80	10%	0,5-2,5	1,50	1,5	10/90	25%	0,5-2,5	1,50	2,0
52	Kontrolle	0/100	5%	0,5-1,0	0,75	0,5	0/100	10%	0,5-1	0,75	1,0
52	Adeno-Ca	90/10	50%	0,5-2,5	1,50	1,5	80/20	15%	0,5-2,5	1,50	2,0
53	Kontrolle	0/100	10%	0,5-2,5	1,50	1,5	0/100	25%	1-3	2,00	2,0
53	Adeno-Ca	0/100	5%	0,5	0,50	0,5	0/100	4%	0,5	0,50	0,5
54	Adeno-Ca	50/50	1%	1,5-3,0	2,25	2,0	50/50	2%	1,5-2,5	2,00	2,0
55	Kontrolle	0/100	10%	0,5-2,5	1,50	1,0	0/100	20%	0,5-1,5	1,00	1,0
55	PE-Ca	50/50	70%	0,5-1	0,75	1,0	50/50	80%	1	1,00	1,0
56	PE-Ca	50/50	40%	0,5-2,5	1,50	2,0	70/30	30%	0,5-2	1,25	1,5

Tabelle 1: Einzelergebnisse der Gefriergewebsschnitte nach Patienten geordnet für beide Untersucher.

3.2.2.2 Evaluation der Untersuchungsmethode

Um die gewählte Methodik der Auswertung zu evaluieren schätzten zwei Untersucher unabhängig voneinander die Präparate (vgl. Tabelle 1 auf der vorherigen Seite) ein. Um die Untersucherübereinstimmung zu prüfen, wurden die Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die Rangkorrelationen R nach Spearman ermittelt. Die entsprechenden Werte für die einzelnen Variablen sind aus Tabelle 2 zu entnehmen. Im Falle der Rangkorrelation nach Spearman zeigt der Wert nahe 1, dass die Ränge weitgehend gleichsinnig verlaufen (bei $RHO = 1$ verliefen sie vollkommen gleich, bei $RHO = -1$ verliefen sie vollkommen entgegengesetzt). Gleiches gilt für die hier berechneten Maßkorrelationen (bezeichnet mit R). Beide Korrelationen zeigten eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $<0,001$. Die Ergebnisse beider Untersucher waren also nahezu identisch.

	UNTERSUCHTE VARIABLEN	N	R	RHO
Kontrollgewebe	Anteil Tumorzellen am Präparat	36	keine Korr.mögl	keine Korr.mögl
	Positiver Anteil Kontrollgewebsschnitt	36	0.807	0.850
	Arithmetisches Mittel Kontrollgewebe	36	0.861	0.833
	Urteilergewichtetes Mittel Kontrollgewebe	36	0.841	0.850
Tumorgewebe	Anteil Tumorzellen am Präparat	54	0.678	0.700
	Positiver Anteil Tumorschnitt	54	0.699	0.692
	Arithmetisches Mittel Tumorschnitt	54	0.794	0.751
	Urteilergewichtetes Mittel Tumorschnitt	54	0.726	0.662

Tab. 2 Untersucherübereinstimmung in Maßkorrelation (R), Rangkorrelation nach Spearman (RHO). Der Wert nahe 1 zeigt die sehr hohe Übereinstimmung der Urteile der beiden Untersucher. Beim Anteil Tumorzellen am Präparat zeigte war eine Korrelation beim Kontrollgewebe nicht berechenbar, da keine vorhanden waren. Die Irrtumswahrscheinlichkeit war jeweils $<0,001$ und wurde nicht einzeln dargestellt.

3.2.2.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der morphologischen Begutachtung wurden nach dem in 2.2.1.5 angegebenen System quantifiziert. Es wurde der Anteil des positiven Gewebes am Präparat in Prozent angegeben, sowie die Färbungsintensität auf einer Rangskala von 0 bis 3. Da es in unterschiedlichen Bereichen der Präparate unterschiedlich starke Färbungen gab, wurde sowohl das arithmetische Mittel der Intensitäten berechnet, als auch das einer eine Gewichtung des Urteilers angegeben, wie ausgeprägt die Intensität aus seiner Sicht war. In Mittelwerten dargestellt ergibt sich hieraus folgende Tabelle:

		N	MITTELWERT URTEILER 1	MITTELWERT URTEILER 2
Kontrollgewebe	Positiver Anteil	36	8.73	13.33
	Färbungsintensität, Arithmetisches Mittel	36	0.9054	0.8403
	Färbungsintensität Urteilergewichtetes Mittel	36	0.851	0.958
Tumorgewebe	Positiver Anteil	54	43.18	42.47
	Färbungsintensität, Arithmetisches Mittel	54	1.6887	1.6981
	Färbungsintensität Urteilergewichtetes Mittel	54	1.925	1.981

Tabelle 3: Mittelwerte beider Urteiler bei Gefriergeweben für den positiven Anteil am Präparat sowie die urteilergewichtete Färbungsintensität und das arithmetische Mittel der Färbungsintensität.

Der schon in den Mittelwerten deutliche Unterschied war auch sehr signifikant. In Einzelaufstellungen der folgenden Tabellen finden sich die mit dem Wilcoxon-Test berechneten z-Werte (basierend auf den negativen Rängen), sowie die p-Werte zur Angaben der Irrtumswahrscheinlichkeit. Gleiches findet sich für die arithmetischen Mittelwerte, bei denen die Ergebnisse der Urteiler gemittelt wurden.

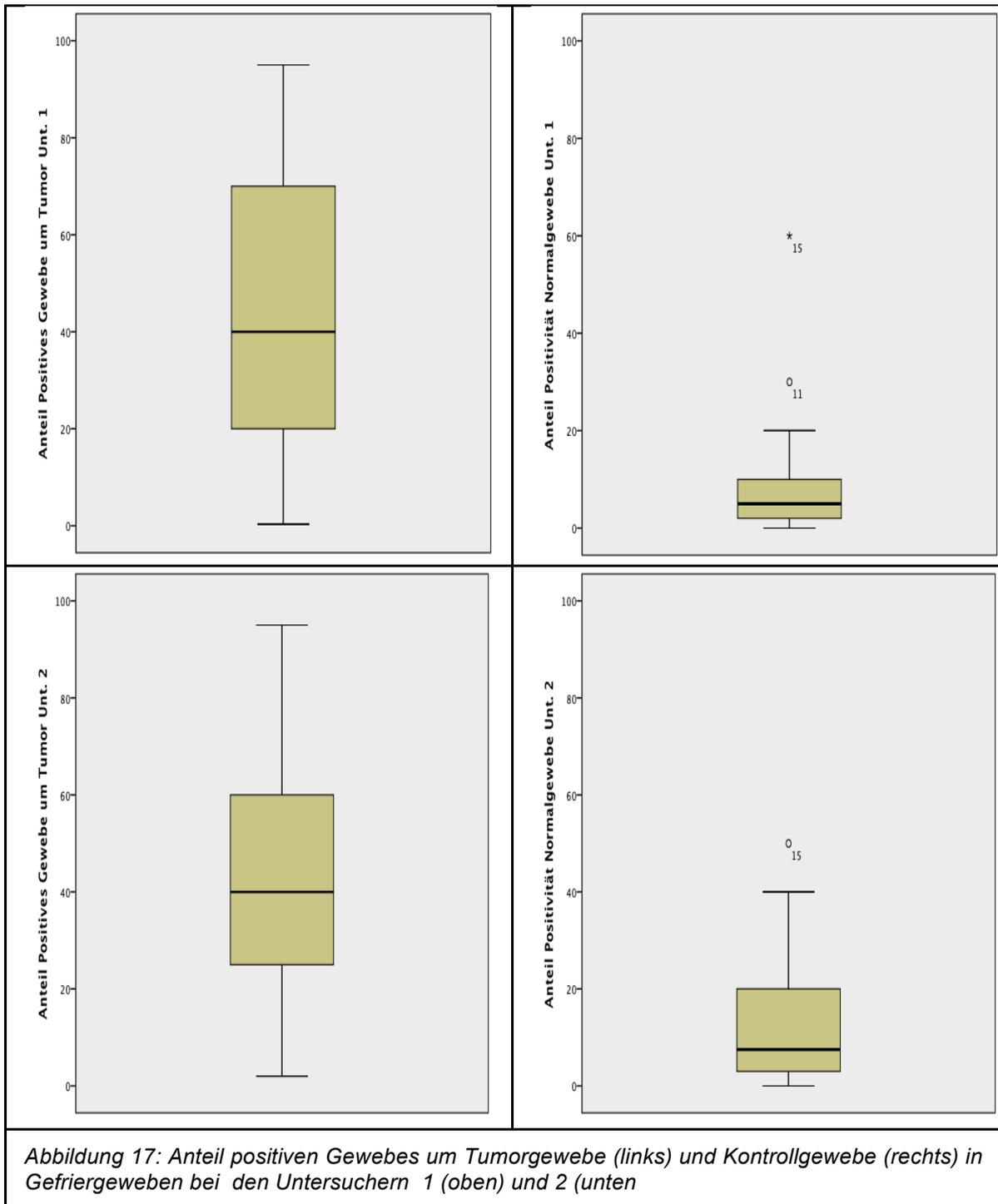
	Z-WERT 1	P 1	Z-WERT 2	P 2
Gefärbte Fläche, Ko vs. Tu	-4,995	<0,001	-4,971	<0,001
Färbungsintensität Arithm. Mittel Ko vs. Tu	-4,446	<0,001	-4,786	<0,001
Färbungsintensität Gew. Mittel Ko vs. Tu	-4,738	<0,001	-4,550	<0,001

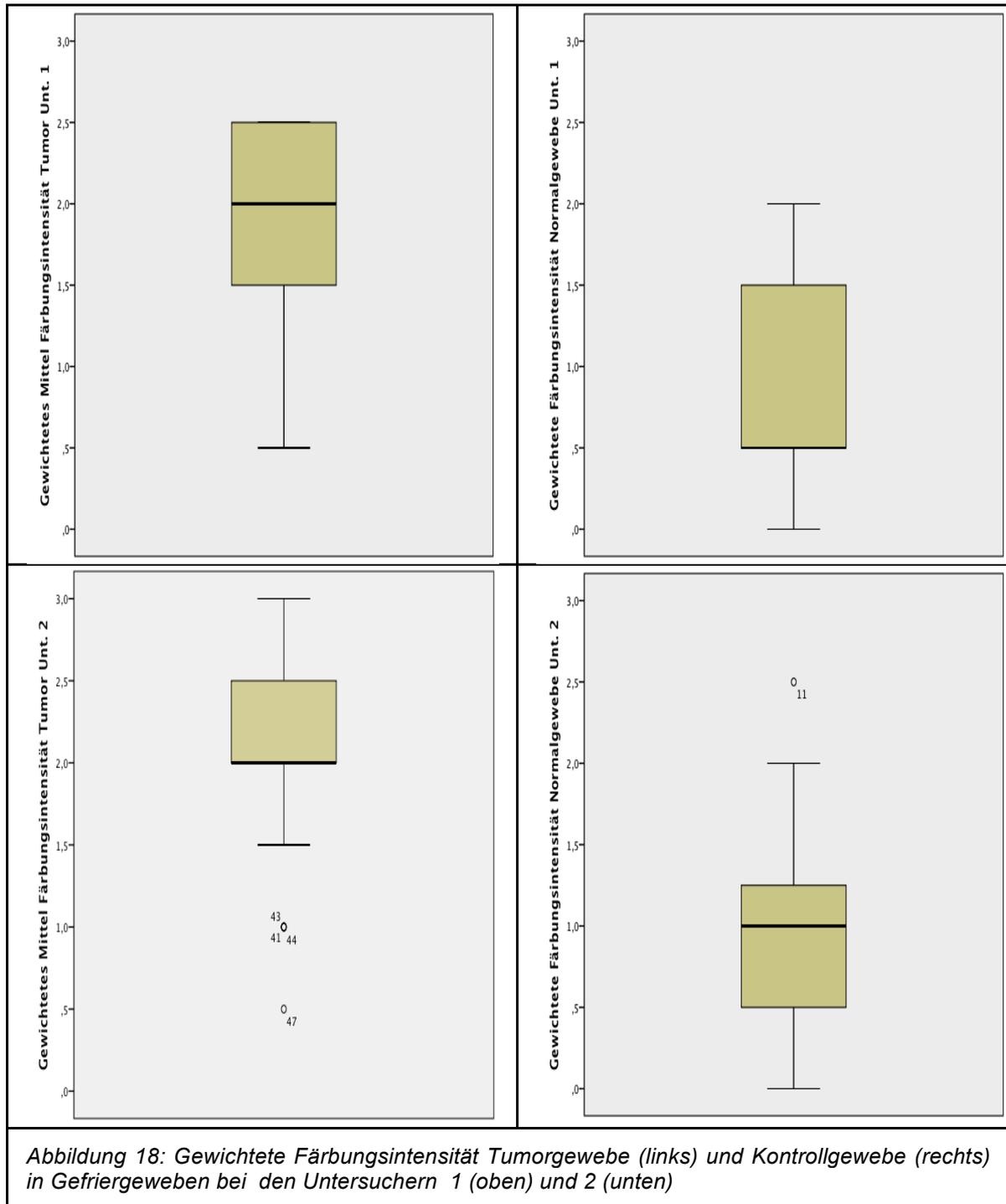
Tabelle 4 z-Werte (negative Ränge) und p mit Wilcoxon-Test für die beiden Urteiler. Die Unterschiede zwischen Kontroll- und Tumorgewebe (Ko, Tu) sind jeweils hochsignifikant für Fläche und Färbungsintensität.

	Z-WERT	P
Gefärbte Fläche, Ko vs. Tu	-5,013	<0,001
Färbungsintensität Arithm. Mittel Ko vs. Tu	-4,812	<0,001
Färbungsintensität Gew. Mittel Ko vs. Tu	-4,878	<0,001

Tabelle 5: Signifikanz der Unterschiede Ko vs. Tu für die von beiden Urteilern gemittelten Unterschiede.. Da die Urteilerübereinstimmung hoch war (vgl. 3.2.3.1) war es möglich die Ergebnisse beider Untersucher zu Mitteln, die hier gezeigten Ergebnisse wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet.

Verdeutlicht werden sollen diese Ergebnisse anhand der folgenden Boxplots, die Ergebnisse für die gefärbten Gefriergewebe noch einmal anschaulich darstellen. Hier wird mit einem fetten Strich der Median dargestellt, die obere Begrenzung des Kastens (Box) stellt das 1. Quartil dar, die untere das 3. Quartil. Die nach oben und unten ausfahrenden Striche (Whisker) entsprechen dem Maximum und Minimum, welches die Werte angenommen haben.





Zusammenfassend läßt sich also festhalten, dass bei den untersuchten Gefriergewebsschnitten die Schnitte von Tumoren auf einer signifikant größeren Fläche signifikant stärker gefärbt waren, als die Kontrollgewebsschnitte. Dieser Unterschied fand sich bei beiden Untersuchern in gleicher Weise.

3.2.2.4 Ergebnisse der systematischen Färbungen an paraffinierten Tissue-Arrays

Zusätzlich wurde ein paraffinierter Tissue-Microarray gefärbt. Dieser wurde von der Firma Superbiochips Laboratories, Korea (CR1-B02) bezogen. Als Färbetechnik zeigte sich die APAAP-Technik deutlich überlegen gegenüber der bei Gefrierschnitten verwendeten ABC-Technik. Hier war, wie unten gezeigt, die Intensität der Färbung geringer, jedoch zeigten sich morphologisch die gleichen Ergebnisse.

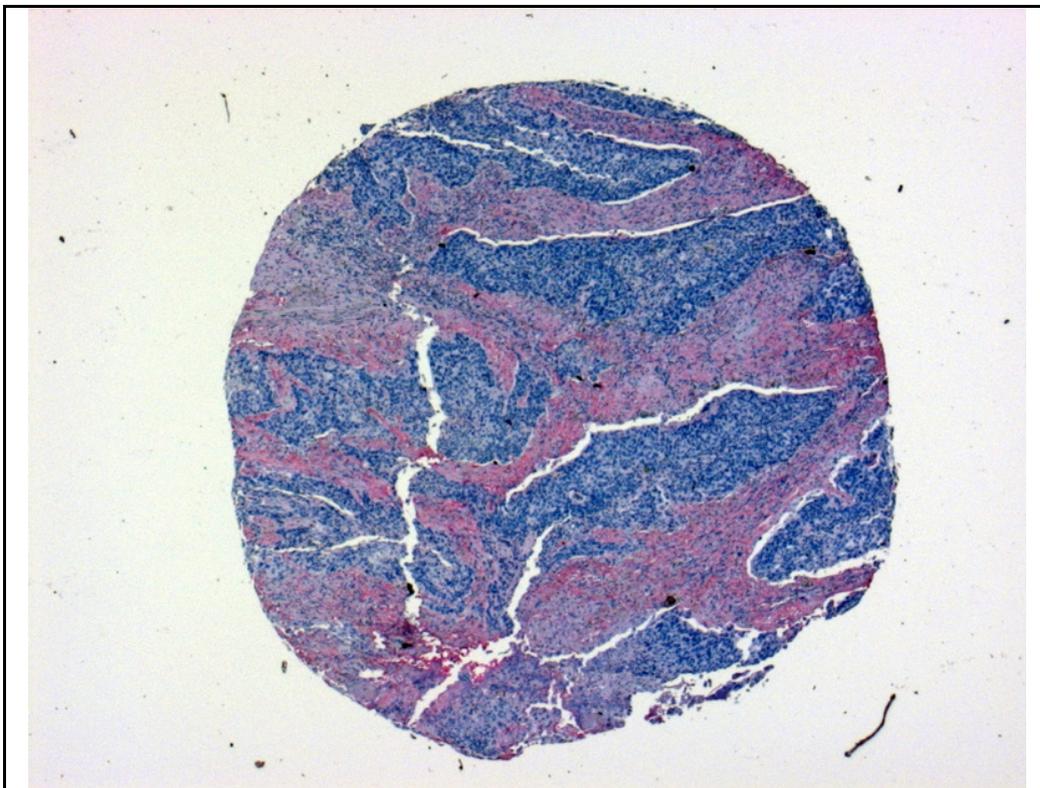


Abbildung 19: Tissue Array CR1-B02, Patient 44, PE-Ca, 25fache Vergrößerung; es zeigt sich eine Rotfärbung des Stromas um die Tumorzellnester, die aufgrund der Kernfärbung blau hervortreten.

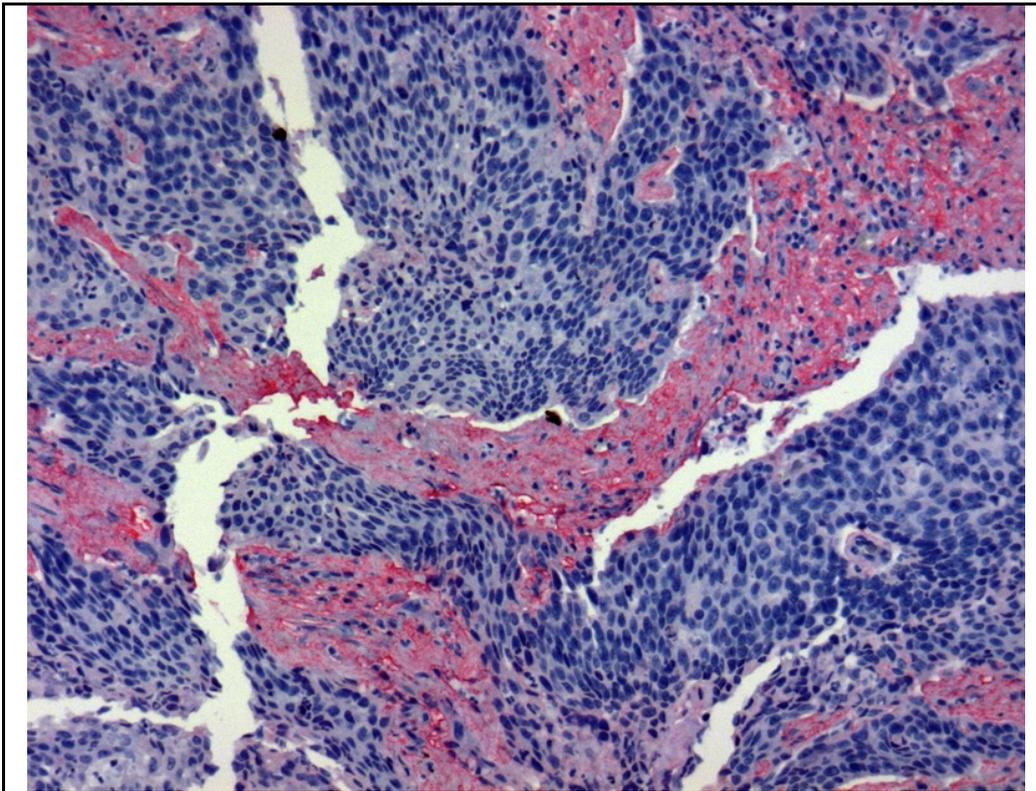


Abbildung 20: Patient 44, CR1B02, Vergrößerung aus dem vorher gezeigten Präparat 100x APAAP

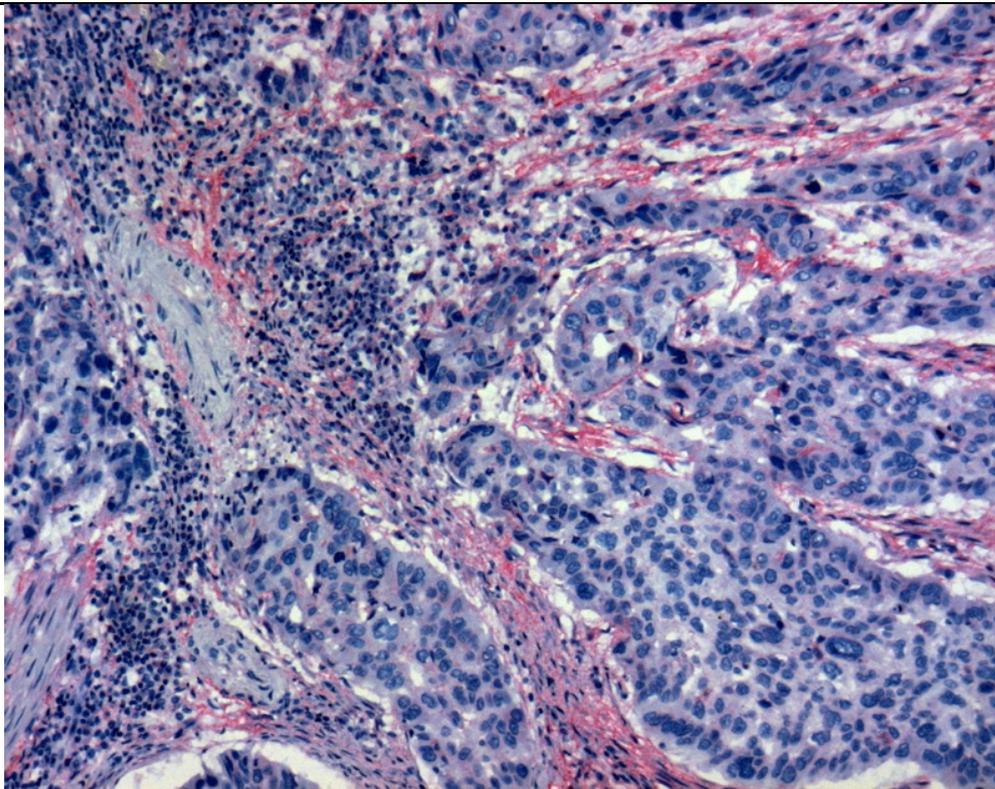


Abbildung 21: Patient 7, PE-Ca 100x, Tnc608, geringere TnC-Färbung, jedoch auch hier deutliche Färbung der Bindegewebsstränge um Tumorzellen

Insgesamt wurden 60 auf dem Array vorliegende Präparate von ebensovielen Patienten gefärbt. Alle Färbungen wurden nach dem oben beschriebenen System (vgl. 2.2.1.5) ausgewertet und die Ergebnisse statistisch umfassend untersucht. Hierbei ergaben sich folgende Mittelwerte für die beiden Untersucher:

	URTEILER 1		URTEILER 2	
	Positive Fläche	Gewichtetes Mittel Intensität	Positive Fläche	Gewichtetes Mittel Intensität
1 Gefriergewebe (n= 54)	43.18	1.925	42.47	1.981
2 Array (n=60)	42.07	1.362	41.05	1.069

Tabelle 6: Gemittelte Ergebnisse der Urteiler 1 und 2 für positive Fläche und das gewichtete Mittel der Intensität bei zuvor gefrorenen und paraffinierten Tumorgeweben. Es fällt ein Unterschied bezüglich der Intensität auf.

Exemplarisch für Untersucher 1 seien hier die Signifikanzen für die Unterschiede zwischen Gefriergewebe und dem zuvor paraffinierten Arraygewebe bei positiver Fläche und gewichtetem Mittel angegeben, berechnet mit dem Mann-Whitney-U-Test:

	POSITIVE FLÄCHE		GEW.MITTEL FÄRBUNGSINTENSITÄT	
	z	p	z	p
Gefriergewebe vs. Array	-0.335	0.738	-3.491	<0.001

Tabelle 7: Signifikanz der Unterschiede zwischen Gefrier- und paraffiniertem Arraygewebe mit Mann-Whitney-U Test. Die Unterschiede bei der Färbungsintensität sind signifikant.

Es zeigt sich also eine signifikant geringere Färbungsintensität in der APAAP-Technik bei den paraffinierten Tissue-Arrays. Dies wird im Rahmen der Diskussion weiter behandelt werden. Die Unterschiede im gefärbten Flächenanteil waren nicht signifikant. Die folgenden Boxplots sollen dies veranschaulichen:

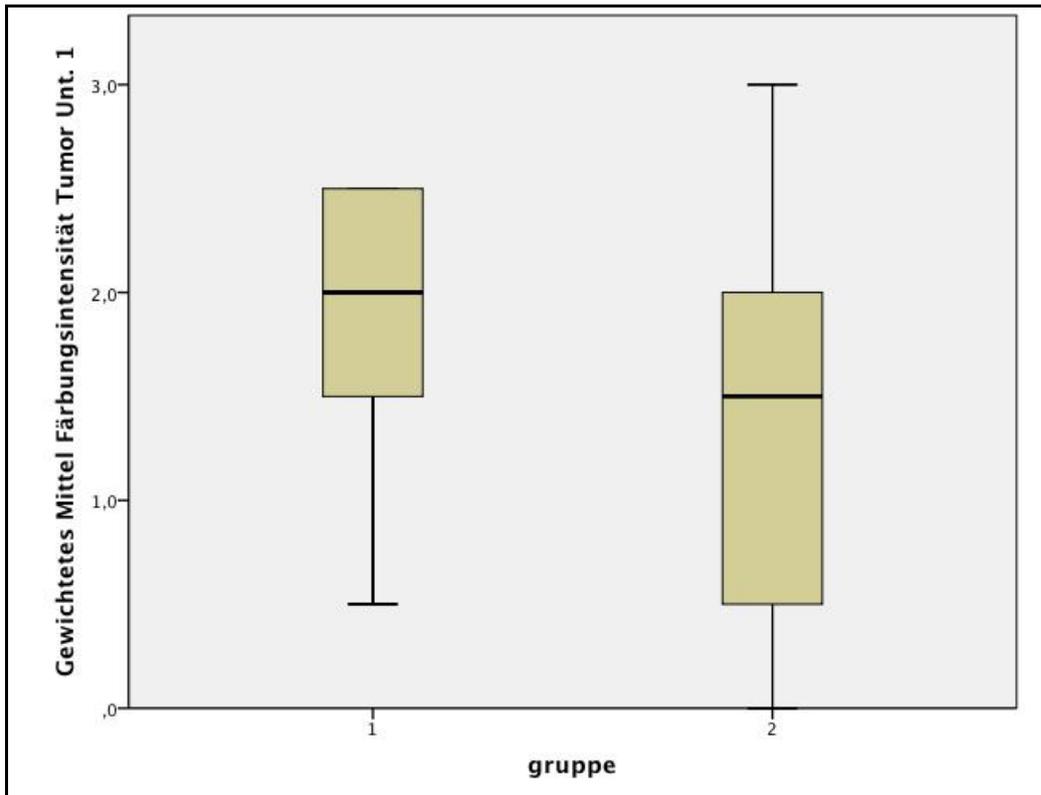


Abbildung 22: Färbungsintensität bei Untersucher 1 in den einzelnen Gruppen. Gruppe 1: Gefriergewebe, Gruppe 2: kommerzieller Tissue-Array; Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind signifikant ($p < 0,001$ vgl. Tbl. 7)

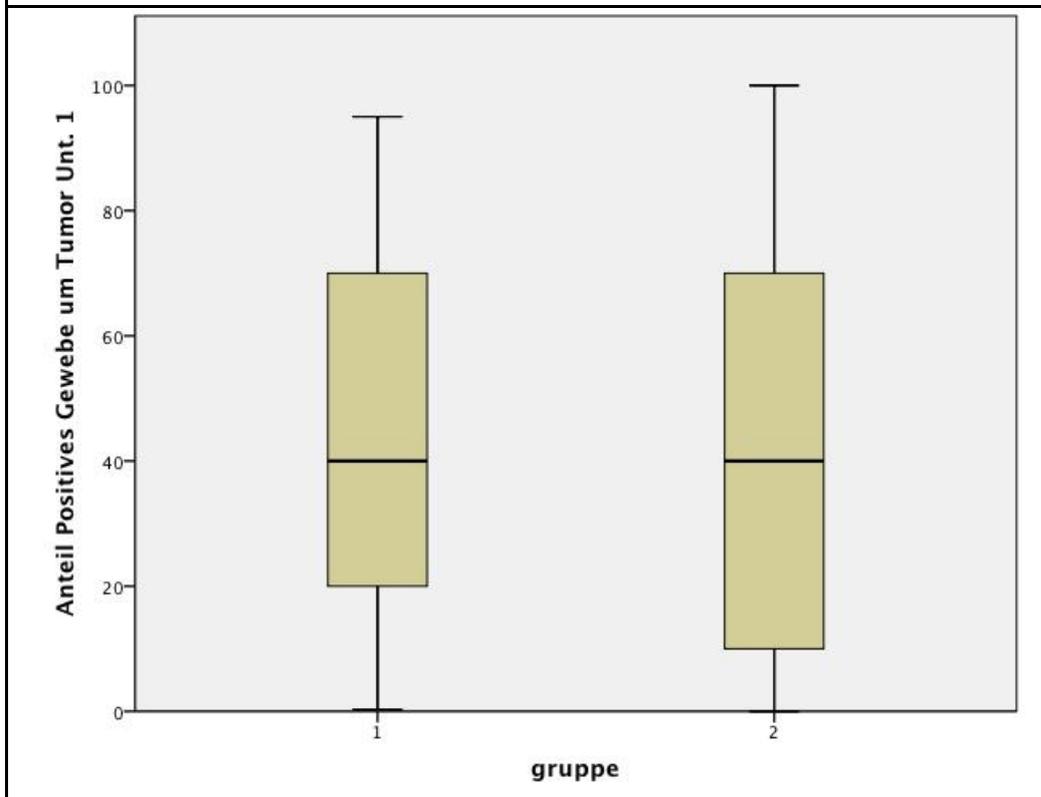
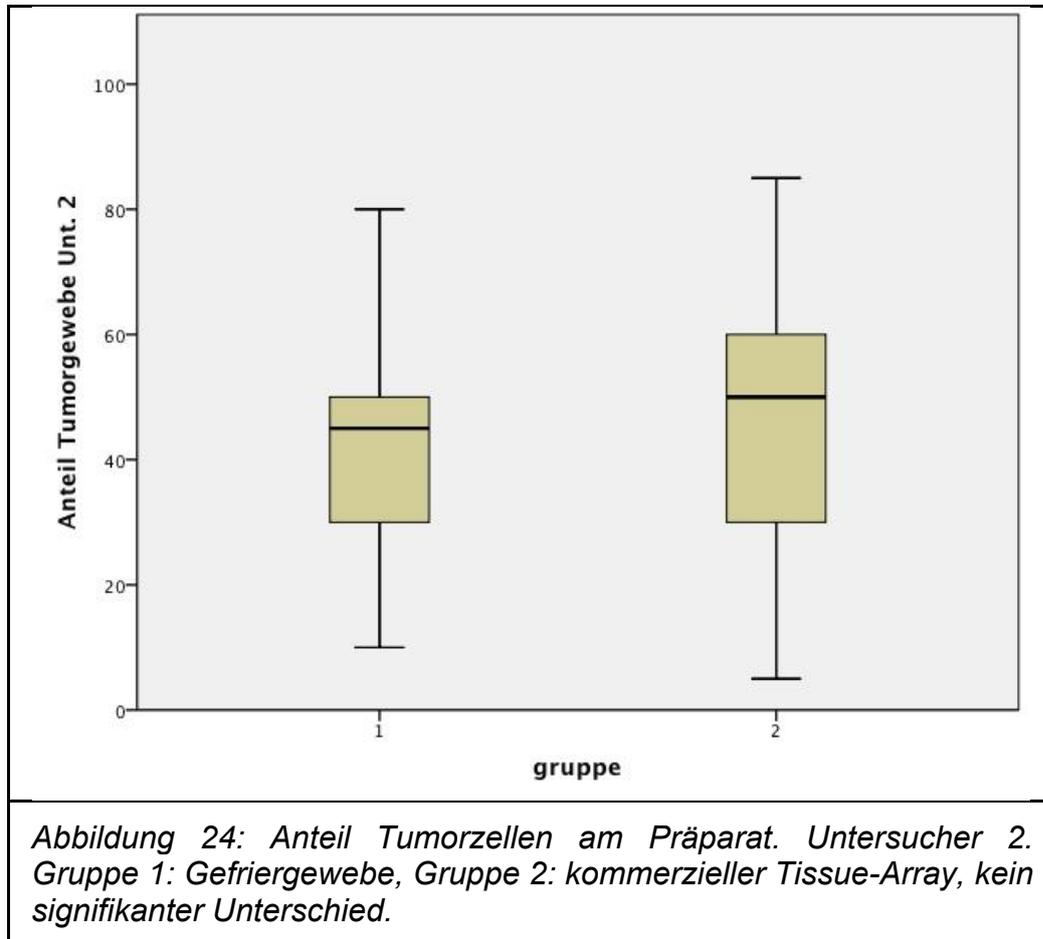


Abbildung 23: Anteil positiven Gewebes um die Tumorzellen. Untersucher 2. Gruppe 1: Gefriergewebe, Gruppe 2 kommerzieller Tissue-Array. Die Unterschiede sind nicht signifikant (vgl. Tbl. 7)

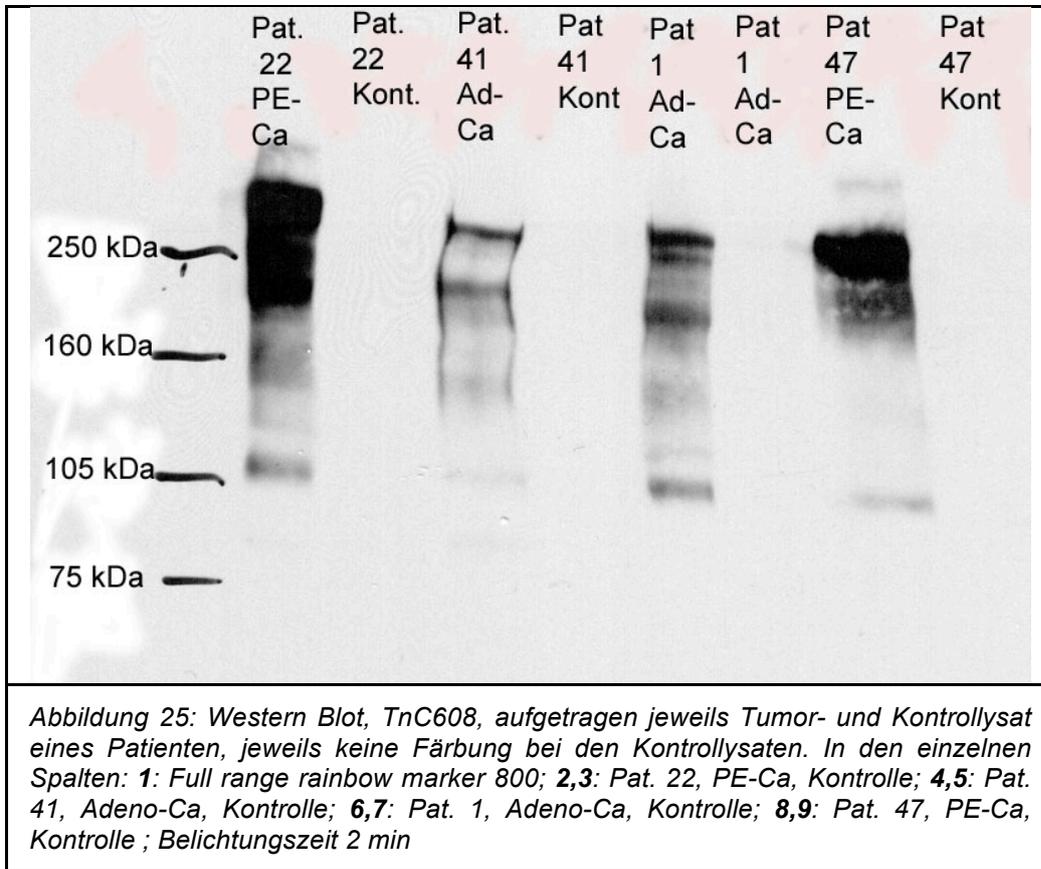
Der Anteil an Tumorzellen an den Präparaten unterschied sich in den einzelnen Gruppen nicht signifikant, wie die folgenden Boxplots veranschaulichen.



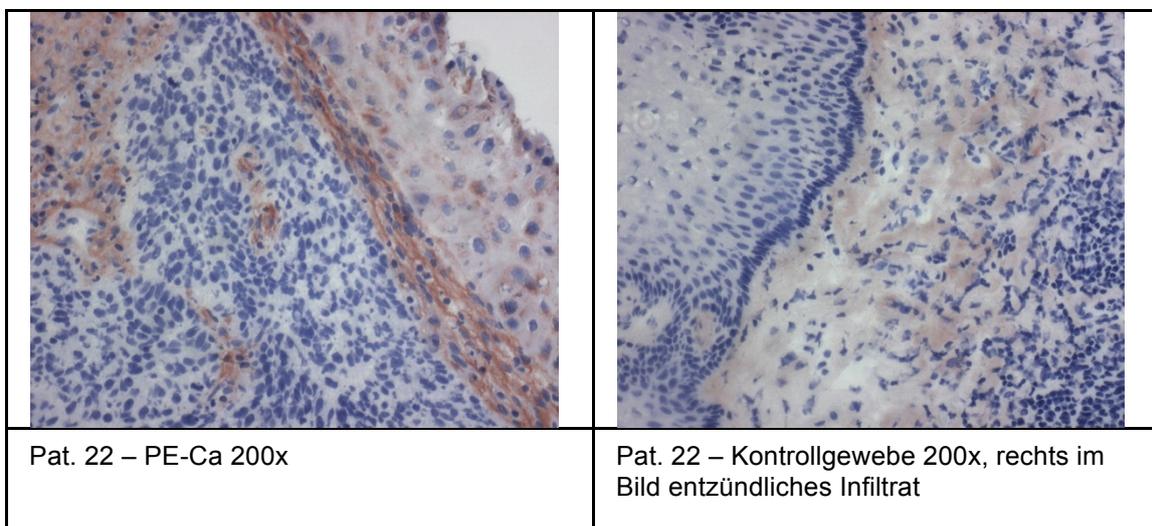
3.2.4 Ergebnisse Western Blot

Ergänzend wurden Gewebslysate von Kontroll- und Tumorgeweben von Gefriergeweben von insgesamt 13 Patienten erstellt. Im Western Blot zeigten sich deutliche Banden bei Tumorslysaten, nicht jedoch bei den Lysaten von Kontrollgeweben der gleichen Patienten. Auffällig war eine breite Streuung der Banden im Bereich von 300 bis 105 kDa, was auf die vorhandene Autolyse hindeuten könnte, wobei die Hauptbande im Bereich der langen Spleißvariante bei 200 kDa nachzuweisen ist. Verwendet wurde ein sechsprozentiges SDS-

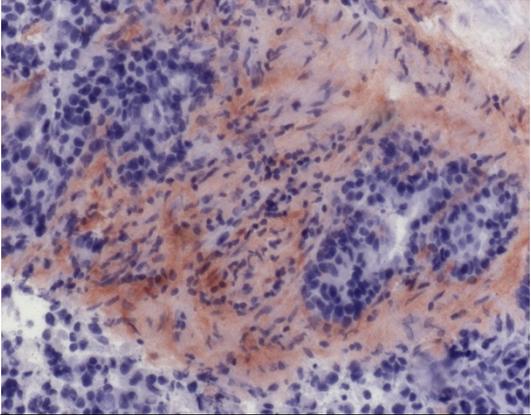
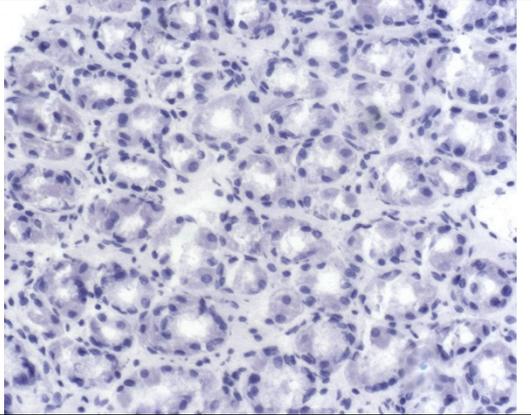
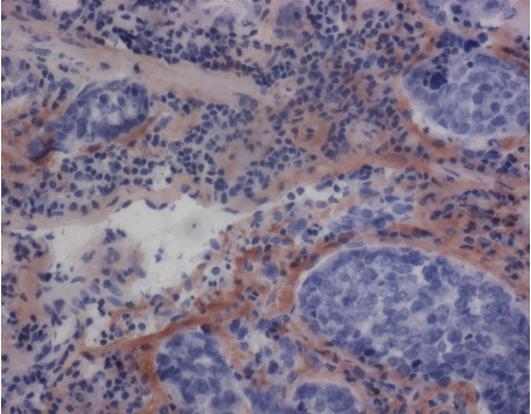
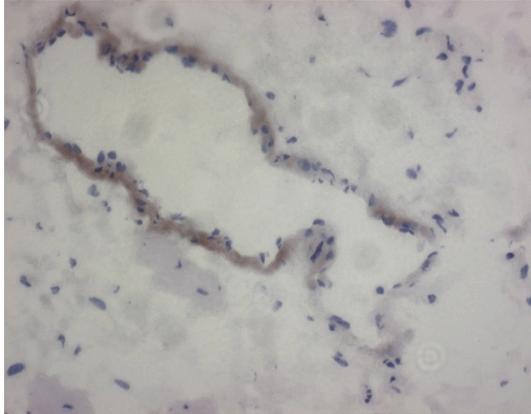
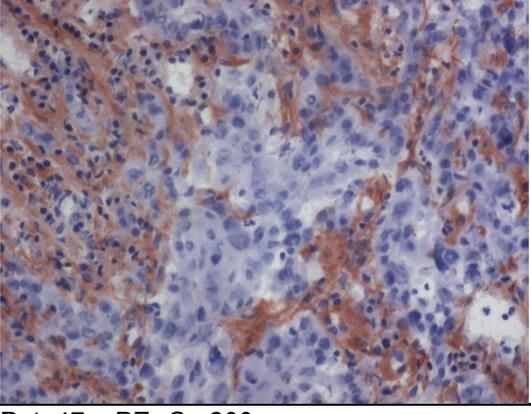
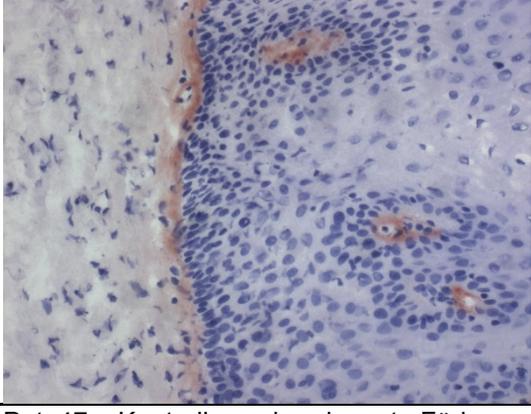
Polyacrylamidtrenngel gemäß o.g. Protokoll (vgl. 2.2.7.1), für das Sammelgel wurde eine Konzentration von 5% gewählt.



Die im Westernblot verwendeten Gewebe sind anschließend im Vergleich als immunhistologisch gefärbte Präparate abgebildet (Abbildungen 26 bis 33).



3. Ergebnisse

	
Pat. 41 Adeno-Ca 200x	Pat. 41 – Kontrollgewebe 200x
	
Pat. 1 – Adeno-Ca 200x	Pat.1 – Kontrollgewebe mit dezenter Färbung perivaskulär
	
Pat. 47 – PE- Ca 200x	Pat. 47 – Kontrollgewebe: dezente Färbung von Krypten und Basalmembran
Abbildungen 26 bis 33: Gegenüberstellung der Immunhistologie der Karzinom- und Kontrollgewebe deren Lysate im Western-Blot verwendet wurden.	

3.2.5 Einflüsse auf die Färbungsfläche und Intensität

Geprüft wurde, ob eine Beziehung zwischen Alter oder Geschlecht der Patienten und der gefärbten Fläche oder der Färbungsintensität bestand. Hier fand sich kein signifikanter Zusammenhang.

Das TNM-Stadium zum Zeitpunkt der Resektion und die Differenzierung des Tumors (G) wurde untersucht. Hier bestand kein signifikanter Zusammenhang zu gefärbter Fläche oder Intensität (Kruskal Wallis Test, Signifikanzniveau sämtlich $> 0,2$). Informationen zu Gefäßinvasion (V) und Lymphgefäßinvasion (L) standen nur bei wenigen Präparaten zur Verfügung, so dass eine Berechnung von Zusammenhängen nicht sinnvoll war.

KLASSIFIKATION		PE-CA	ADENO-CA	ANDERE	GESAMT
T	1	2	5	0	7
	2	6	13	2	21
	3	58	21	3	82
	4	2	1	1	4
	X	0	1	0	1
N	0	21	10	5	36
	1	47	25	1	73
	2	0	1	0	1
	3	0	4	0	4
	X	0	1	0	1
M	X	19	37	0	56
	0	47	0	6	55
	1	2	1	0	4
G	1	0	3	0	3
	2	9	9	0	20
	3	8	23	0	31
	?	51	3	6	54
	Gesamt	n	68	40	6
	Gefroren	17	37	0	54
	Paraffin	51	3	6	60

Tabelle 8: Tumorcharakteristika, angegeben ist die Patientenzahl²

² Die TNM-Klassifikation entspricht der zum Erhebungszeitpunkt der Daten gültigen TNM-Klassifikation von 2003 (UICC 2003). Dies entspricht im wesentlichen, jedoch nicht in allen Punkten der TNM-Klassifikation von 2010 (UICC 2010); so ist z.B. die Kategorie MX in der neuen Klassifikation nicht mehr vorhanden.

Ebenso wurden die vorhandenen Angaben zu Karzinomentität (Plattenepithel- oder Adenokarzinom) auf signifikante Unterschiede untersucht. Bei den Gefriergeweben zeigten sich tendenzielle Unterschiede in Bezug auf Gefärbte Fläche und Intensität zugunsten der Plattenepithelkarzinome. Signifikant größer ($p < 0,05$) waren bei Untersucher 1 und 2 das arithmetische Mittel der Färbungsintensität der PE-Ca-Präparate, bei Untersucher 1 zudem noch die gefärbte Fläche.

	VARIABLEN	PE-CA	ADENO-CA	Z-WERT	P
Urteiler 1	Anteil Tumorgewebe / Präparat	40.00	43.75	-0.666	0.506
	Gefärbte Fläche	58.40	38.01	-2.176	0.030
	Färbungsintensität Arithmetisches Mittel	1.85	1.6328	-2.047	0.041
	Färbungsintensität Gewichtetes Mittel	2.167	1.844	-2.261	0.024
Urteiler 2	Anteil Tumorgewebe / Präparat	40.33	42.19	-0.418	0.676
	Gefärbte Fläche	50.67	40.91	-1.445	0.149
	Färbungsintensität Arithmetisches Mittel	1.85	1.6484	-2.035	0.042
	Färbungsintensität Gewichtetes Mittel	2.133	1.937	-1.671	0.095

Tabelle 9 : Unterschiede zwischen den Tumorentitäten bei Gefriergeweben, nach Untersuchern aufgeschlüsselt. Angegeben sind die Mittelwerte. z-Wert und p wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt

Bei den paraffinierten Geweben auf den Tissue-Arrays bestand das o.g. Problem der deutlichen Färbungsunterschiede zwischen den Arrays, dieses wird in der Diskussion wieder aufgegriffen werden. Im Bezug auf die Tumorentitäten bestand hier beim CR1-B02-Array eine deutlich stärkere Expression von positivem Gewebe bei Plattenepithelkarzinomen. Allerdings waren nur drei Adenokarzinomproben auf dem Array, weshalb keine Signifikanzen geprüft wurden.

Die kleine Gruppe der sechs Tumoren anderer Entität, die auf dem Array CR1-B02 zu finden waren (1x Basaloides Ca, 1x Kleinzelliges Ca, 3x Adenosquamöses Ca), war eher mit den Plattenepithelkarzinomen vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Die kleine Gruppe der Barrettmukosa-Proben (fünf Patienten) hob sich nicht von der Gruppe der Kontrollgewebe ab, wurde jedoch nicht gemeinsam mit dieser bearbeitet. Hier wären größere Stichproben nötig, um gegebenenfalls Unterschiede statistisch

zu sichern. Nach den bisherigen Daten, unterscheidet sich der TnC-Gehalt von Barrett-Mukosa nicht von dem mikroskopisch gesunden Ösophagusgewebes. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine deutliche Tendenz zu stärkerer TnC-Expression bei Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu Adenokarzinomen bestand. Das TNM-Stadium hatte keinen Einfluß auf die Expression, ebensowenig wie Alter und Geschlecht der Patienten.

4. Diskussion

4.1 Neurotensin-Rezeptor 1

4.1.1 Evaluation

Die Evaluation der verwendeten Antikörper erwies sich als schwierig. Weder zeigte sich immunhistochemisch die vorbeschriebene Positivität der Zelllinien Colo205, HT29, CaCo2T und SW 480, wie bei Maoret et al. (1994), allerdings mit Hilfe von RT-PCR und Sequenzanalysen vorbeschrieben wurde, noch zeigte sich bei den Antikörpern eine spezifische Bande im Westernblot, bei dem die Lysate der o.g. Zelllinien aufgetragen wurde. Insgesamt sind die verwendeten Antikörper als untauglich für die Detektion im Western-Blot einzustufen. Dies ist nicht ungewöhnlich bei Antikörpern gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (vgl. Michel et al. 2009, s.u.)

Nachdem CHO, HEK und MiaPaCa-Zelllinien mit NTR-1-Plasmiden transfiziert wurden, zeigte sich, in mehreren Versuchen reproduzierbar, eine Immunfluoreszenz einzelner Zellen.

Bei immunhistologischen Versuchen wurden zunächst Darmpräparate verwendet, die jedoch lediglich eine Färbung im Bereich der schleimbildenden Zellen aufwiesen. Eine wie bei Reubi et al. (1999.1 und 1999.2) vorbeschriebene Färbung im Bereich von Nervenzellen ließ sich nicht nachweisen. In weiteren Versuchen an Schnitten humanen und murinen Cerebellums sowie an Pancreas-Karzinom-Präparaten ließen sich - allerdings nur mit dem polyklonalen Ziegenantikörper sc25042 – deutlich Einzelzellen anfärben.

Es muß festgestellt werden, dass sich G-Protein gekoppelte Rezeptoren häufig mit Hilfe von Antikörpern nur ungenügend sicher anfärben lassen. In Naunyn-Schmiederbergs Archives of Pharmacology wurden in Band 379 (Michel et al. 2009) mehrere Arbeiten veröffentlicht, die dies nochmals hinreichend belegen. Beispielhaft sei hier der Artikel von Hamdani und van der Velden (2009) im gleichen Band genannt, die zeigten, dass ein kommerziell erworbener Antikörper, der eigentlich spezifisch humane Beta-adrenerge Rezeptoren anfärben sollte, multiple Banden bei diversen Spezies im Western-Blot zeigte, jedoch keine im erwarteten Bereich.

Diskutiert wird, ob dies aufgrund der Ähnlichkeit der Rezeptoren einer Familie oder gar aller G-Protein-gekoppelter Rezeptoren der Fall sei (Michel et al. 2009). Letztlich finden die Autoren jedoch keine sichere Erklärung.

Michel et al. (2009) halten jedoch die reproduzierbare Anfärbung von transfizierten Zellen, wie mit sc25042 gelungen, für ein ausreichendes Argument für die Spezifität des Antikörpers.

Aufgrund dieser Datenlage ist davon auszugehen, dass der verwendete Antikörper ausreichend spezifisch an NTR-1 bindet. Daher erfolgte die weitere Auswertung der Versuche.

4.1.2 Ergebnisse

Da aufgrund der Positivität von transfizierten Zellen ein Hinweis auf die Reliabilität des Antikörpers bestand (Michel et al. 2009), wurde versuchsweise mit der Färbung von Ösophaguskarzinom und Ösophagusnormalgewebepräparaten begonnen. In Normalgeweben zeigte sich, wie vorbeschrieben (Reubi 1998 und 1999.2) eine Färbung der Muskulatur (vgl. Abb. 5 u. 6). Insgesamt 10 der Ösophaguskarzinompräparate zeigten ebenfalls eine sicher spezifische Färbung der Membran von großkernigen Tumorzellen (vgl. Abb. 7). Eine solche Färbung von Ösophaguskarzinomzellen war bisher nicht vorbeschrieben, deutet aber auf die Expression des membranständigen Neurotensinrezeptors 1 hin.

Auf eine statistische Auswertung bezüglich Färbungsanteil und -intensität wurde verzichtet, da die angefärbte glatte Muskulatur die Präparate deutlich dominierte. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass eine spezifische Expression des Neurotensinrezeptors 1 bei Ösophaguskarzinomen, und zwar sowohl bei Adeno- als auch bei Plattenepithelkarzinomen möglicherweise gegeben ist. Hier ist jedoch aufgrund der schwierigen Evaluationsergebnisse der Antikörper Zurückhaltung angebracht.

Eine Validierung der Ergebnisse mit autoradiographischen Methoden nach dem Protokoll von Reubi (Reubi et al. 1998 und 1999.2) wurde mehrfach versucht, schlug jedoch fehl. Das Vorgehen ist unter 2.2.8 beschrieben. Selbst Positivkontrollen konnten nicht angefärbt werden, auf eine Präsentation im Ergebnisteil wurde daher verzichtet. Bisher ist das Labor von Reubi weltweit das einzige, das Versuche dieser Art erfolgreich durchgeführt hat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die spezifisch wirkenden Färbungen der Tumorzellmembranen in Anbetracht der schwierigen Evaluation und der gescheiterten autoradiographischen Kontrollversuche nicht mehr als ein Hinweis darauf sein können, dass der Neurotensin-Rezeptor-1 vermehrt von Ösophaguskarzinomzellen exprimiert wird. Weitere molekularbiologische Untersuchungen und ggf. weitere Versuche mit weiteren Antikörpern, nicht zuletzt weitere autoradiographische Versuche müssten folgen, ließen sich jedoch innerhalb dieser Arbeit nicht mehr realisieren.

4.2 Tenascin C

4.2.1 Evaluation

Der von Professor Faissner (Bochum) freundlicherweise überlassene Antikörper 608 gegen Tenascin zeigte in der Evaluation eine deutliche Färbung des extrazellulären Stromas von Tumoren, wie dies in Vorpublikationen mehrfach vorbeschrieben war (vgl Chiquet-Ehrismann et al. 2003).

Bei der Evaluation war auffällig, dass bei Gefriergeweben eine wesentlich geringere Antikörperkonzentration (1:1000) notwendig war, als bei paraffinierten Geweben (1:100) um eine ausreichende Färbung zu erreichen. Mögliche Ursache für diesen Umstand ist die Verdeckung des Antigens durch die Paraffinierung oder eine durch die Paraffinierung verzögerte Reaktion.

Um die Bindegewebspezifität des Antikörpers zu überprüfen, wurde zusätzlich noch eine Parallelfärbung von TnC und dem bekannten Bindegewebsmarker Vimentin vorgenommen. (Osborn et al. 1984) Wie erwartet zeigte sich, dass der Antikörper TnC 608 nie außerhalb des Bindegewebes reagierte.

Die Ergebnisse im Western-Blot zeigten ausgeprägte Banden beim Tumorgewebe mit punctum maximum im Bereich von 250 kDa, wie bei der langen TnC-Isoform zu erwarten und keine Banden bei Normalgeweben. Der weite Bereich lässt sich erklären durch mögliche Proteolyse oder durch die unterschiedliche Größe der einzelnen Spleißvarianten des Tenascin-C (Chiquet-Ehrismann 2004),.

4.2.2 Systematische Färbungen

In der systematischen Färbung zeigte sich bei den gefrorenen Tumorgeweben eine signifikant höhere Intensität ($p < 0,001$) und ein höherer Anteil an gefärbtem Gewebe ($p < 0,001$) als in den parallel gefärbten Kontrollgeweben. Zwischen den beiden Untersuchern bestand hier Einigkeit. Überraschend kommen diese Erkenntnisse nicht. Im Bereich des Ösophagus fanden bereits Broll et al. (1995) bei Plattenepithelkarzinomen und Salmela et al. (2001) bei Adenokarzinomen eine vermehrte Anreicherung von TnC. Jedoch wurden diese Untersuchungen jeweils nur an sehr kleinen Stichproben durchgeführt. Salmela et al. untersuchten 15 Karzinomproben, Broll et al. 25.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Stichprobe umfasste Untersuchungsmaterial von 134 Patienten sowohl bei Adeno- als auch bei Plattenepithelkarzinomen.

Die Ergebnisse des kommerziell erworbenen Arrays korrelierten gut mit den Ergebnissen der Gefriergewebe. Zwar war die Färbungsintensität im Rahmen der APAAP-Färbung signifikant geringer ($p < 0,001$), sie unterschied sich aber dennoch weiterhin signifikant von den untersuchten gefrorenen Kontrollgeweben. Im Bezug auf den Anteil an gefärbter Fläche gab es keinen signifikanten Unterschied.

Somit zeigte sich eine deutliche Mehrexpression von TnC in Tumorgeweben des Ösophagus.

Es gibt verschiedene mögliche Gründe für diese signifikante Abweichung zwischen bei -80°C konservierten Präparaten und den in Paraffin eingebetteten Arrays. Wahrscheinlich kommt es zu einer geringeren Zugänglichkeit des Antigens durch die Paraffinierung. Auch erscheint eine Denaturierung des Antigens durch das erwärmte Paraffin bei der Einbettung und die Erhitzung bei der Entparaffinierung möglich. Im Rahmen der Gefriergewebe kann eine solche Denaturierung wahrscheinlich eher vermieden werden. Im Bereich der DNA-Extraktion führten Talaulikar et al (2008) eine Untersuchung durch, die auch eine deutlich bessere Qualität des Untersuchungsmaterials bei gefrorenen Geweben zeigte.

Für Matrixproteine wurden Untersuchungen z.B. von Folkvord et al. 1989 und Pelstring et al. 1991 durchgeführt. Hier zeigte sich die bessere Zugänglichkeit der Epitope bei Gefriergeweben, jedoch ein besserer Erhalt der Gewebearchitektur bei paraffinierten Geweben.

Möglicherweise ließe sich, wie in der jüngeren Zeit mehrfach an anderen Tumorgruppen versucht (Mighell 1997 bei Mundkarzinomen, Berndt et al. 2006 bei Urothelkarzinomen, Takeda et al. 2007 bei kolorektalen Karzinomen) die Spezifität weiter steigern, wenn man einzelne Spleißvarianten des TnC untersuchte und hierbei spezifische Spleißvarianten für maligne entartetes Ösophagusgewebe identifizierte. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die lange Isoform des TnC, die als weitgehend spezifisch für pathologische Prozesse beim adulten Menschen gilt, vermehrt vorkommt (vgl. z.B. Katenkamp et al. 2004; Brack et al. 2006, Carnemolla et al. 1999). Eine Epitopkartierung könnte möglicherweise noch bessere Auskunft geben, um welche Domäne es sich hierbei handelt.

4.2.3 Ist Tenascin-C ein gutes Markermolekül für Ösophaguskarzinome?

Die Frage ist, soweit diese Arbeit sie beantworten kann, zu bejahen. Jedoch gibt es einige Einschränkungen.

So werden Markermoleküle häufig mit Serummarkern gleichgesetzt. Hierzu kann diese Arbeit keine Auskunft geben. Jedoch wurde gleiches für TnC als Serummarker beim Kolonkarzinom 1995 von Riedl et al. und 2007 von Takeda et al. untersucht. In beiden Arbeiten zeigte sich eine hohe Spezifität bei jedoch nur geringer Sensitivität - ein allgemeines Problem bei Serummarkern von malignen Tumoren (Thomas L und Stieber P 1998). Ob auch beim Ösophaguskarzinom eine vermehrte Konzentration von TnC im Blut zu finden ist, bliebe zu untersuchen.

Histologisch ist jedoch die Expression von Tenascin-C in Karzinomen des Ösophagus ausgeprägt hoch. Während sich in den mikroskopisch tumorfreien histologischen Kontrollen lediglich im perivaskulären Bereich und in der Basalmembran schwache Anfärbungen zeigten, war die Anfärbung im Interstitium nur bei Karzinomen und hier auch nur um die Tumorzellen herum zu finden. Die Spezifität scheint hier also gegeben. Was die Sensitivität angeht so kann auch diese als hoch angesehen werden. In eine Vierfeldertafel gebracht ergeben sich für die gefrorenen Gewebe quantitativ folgende Werte, nach Untersuchern getrennt dargestellt (Untersucher 1 / Untersucher 2):

	Ösophaguskarzinom Unt. 1 / Unt. 2	Kontrollgewebe Unt. 1 / Unt. 2
TnC – positiv gew. Intensität > 1	47 / 47	11 / 9
TnC – negativ gew. Intensität =< 1	7 / 7	29 / 31
TnC – positiv Fläche > 5%	47 / 46	16 / 18
TnC – negativ Fläche =< 5%	7 / 8	24 / 22

Rechnerisch ergeben sich demnach eine Sensitivität von 87% für beide Untersucher und eine Spezifität von 72,5% für Untersucher 1 bzw 77,5% für Untersucher 2 im Bereich der gewichteten Färbungsintensität, wenn man als Entscheidungsgrenze eine Färbungsintensität von > 1 (vgl. 2.2.1.5) wählt.

Für den gefärbten Flächenanteil ergeben sich eine Sensitivität von 87% (Untersucher 1) bzw. 85,2 % (Untersucher 2) und eine Spezifität von 60% (Untersucher 1) bzw. 55% (Untersucher 2), wenn als Grenze eine positive Fläche von > 5% des Schnittes gewählt wurde.

Da im Rahmen der paraffineingebetteten Gewebe die Kontrollgewebe fehlten, lässt sich hier nur eine halbe Vierfeldertafel darstellen und somit nur eine Sensitivität errechnen:

	Ösophaguskarzinom Unt. 1 / Unt. 2
TnC – positiv gew. Intensität > 1	32 / 25
TnC – negativ gew. Intensität =< 1	28 / 35
TnC – positiv Fläche > 5%	49 / 49
TnC – negativ Fläche =< 5%	11 / 11

Hieraus errechnet sich eine Sensitivität von 53,3% bei Untersucher 1 bzw. 41,7 % bei Untersucher 2 für die untersuchergewichtete Färbungsintensität und eine Sensitivität von 81,7% für die gefärbte Fläche für beide Untersucher.

Hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich die morphologische Beurteilung nicht mit der quantitativen Beurteilung deckt. Außerhalb von perivaskulärem Gewebe und der Basalmembran zeigte sich zu keinem Zeitpunkt eine Färbung im Kontrollgewebe. Morphologisch wäre also, wenn man nur Tumoren und Kontrollgewebe betrachtete, die Sensitivität und Spezifität deutlich höher.

Dies ist nun mit den gängigen immunhistochemischen Markern für Karzinome zu vergleichen. Bei Adenokarzinomen beträgt die Sensitivität des Antikörpers gegen das Glykoprotein BerEp4 83% und die Spezifität 91% (Chu und Weiss 2009, S. 124). CEA dagegen verfügt über eine Sensitivität von 85% und eine Spezifität von 95% (ebd.). CK5/6 ist ein Marker, der in Plattenepithelkarzinomen positiv ist, dieser verfügt über eine Sensitivität von etwa 77% und eine Spezifität von 96% (Kaufmann et al 2001). Als histologischer Marker für die Malignität von Ösophagusveränderungen wird der Proliferationsmarker Ki67 diskutiert. (Sikkema et al 2009). Zum Ösophaguskarzinom liessen sich keine Angaben zu Sensitivität und Spezifität finden. Im Rahmen des weit verbreiteten Screenings beim Cervixkarzinom wird eine Sensitivität von 89% und eine Spezifität von 67% angenommen (International Agency for Research on Cancer 2005). Hier wäre Tenascin-C am Ösophagus ein möglicherweise ebenso guter Marker.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Tenascin-C für die mikroskopische Untersuchung von Ösophaguskarzinomen ein hinreichend gutes Markermolekül zu sein scheint.

4.2.4 Hat die Tenascin-C-Expression prognostische Bedeutung?

Bei anderen Tumorentitäten wie z.B. dem Osteosarkom (Xiong et al. 2009) zeigte sich eine prognostische Relevanz der TnC-Ausprägung.

Die Frage ob die Expression von TnC bei Ösophaguskarzinomen von prognostischer Bedeutung ist, kann in dieser Arbeit jedoch - da keine Daten zur Überlebenszeit vorliegen - nicht beantwortet werden. Hier müssen weitere Untersuchungen erfolgen.

Jedoch wurden das TNM-Stadium zum Zeitpunkt der Resektion und die Differenzierung des Tumors (G) untersucht. Hier bestand kein signifikanter Zusammenhang zu gefärbter Fläche oder Intensität (Kruskal Wallis Test, Signifikanzniveau sämtlich $> 0,2$). Bekannt ist, dass das TNM-Stadium und die Differenzierung des Tumors prognostisch bedeutsam sind (UICC 2003 und 2010),

4.2.5 Ist Tenascin-C ein potentielles Zielmolekül für bildgebende Verfahren?

Weiter stellt sich die Frage nach der Möglichkeit, Tenascin-C als Zielmolekül für diagnostische Bildgebung zu nutzen. Hinweise hierauf gibt es z.B. im SPECT (Dijkgraaf und Boerman 2010).

Studien, die eine antikörperbasierte Diagnostik in vivo mit Tenascin-C als Zielmolekül in vivo durchgeführt haben, legten z.B. Silacci et al (2006) vor. Die Autoren zeigten, dass ein radiojodmarkierter TnC-Antikörper selektiv in subkutan implantierten Gliomen bei Mäusen zu finden war, ebenso in einem orthotopen Rattenmodell. Brack et al (2006) unternahmen gleiches, jedoch mit zwei neuen Antikörpern, die selektiv gegen die alternativ gespleißten Domänen A1 und D gerichtet waren. Auch hier zeigte sich, wieder im Mausmodell, eine gezielte Anreicherung.

4.2.6 Lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse therapeutisch verwerten?

Es gibt zahlreiche Studien, die eine antikörperbasierte Therapie in vivo mit Tenascin-C als Zielmolekül in vivo durchgeführt haben.

Bereits 1992 veröffentlichten Riva et al. eine Therapieversuchsreihe, bei denen 10 Patienten mit Glioblastomen ein TnC-Antikörper gekoppelt an Jod-131 direkt in den Tumor appliziert wurde. Immerhin wurde bei 3 Patienten ein stable disease und bei

drei Patienten gar eine partielle Remission erreicht. Auch intrathekal wurden bereits ¹³¹I gekoppelte Anti-TnC Antikörper beim Menschen gegeben (Brown et al. 1996), ebenfalls bei cerebralen Neoplasien. Hier ist die Therapie zwar noch nicht als Standard etabliert, war jedoch bereits Objekt einer Phase-II Studie (Riva et al. 1999). Im Bereich der gastroenterologischen Tumoren und der systemischen Gabe von Anti-TnC-Antikörpern zu therapeutischen Zwecken sind die Studien noch lange nicht so weit fortgeschritten. De Santis et al. untersuchten 2003 und 2006 Kolon-Karzinom-Xenograft bei Mäusen mit unterschiedlichen Anti-TnC-Antikörpern und fanden dort ebenfalls eine spezifische Anreicherung. Eine Therapiestudie am Tier legten Marlind et al. (2008) vor. Sie verwendeten Mäuse mit Mammakarzinomxenografts und verwendeten einen Anti-TnC-Antikörper spezifisch gegen die alternativ gespleißte Domäne A1, dieser war gekoppelt an Interleukin 2. Zudem bekam ein Teil der Mäuse Doxorubicin. Es zeigte sich eine deutliche Lebensverlängerung durch die Antikörpertherapie. In der gleichen Arbeit wurden auch toxikologische Versuche an Javaneraffen demonstriert, die eine gute Toleranz zeigten.

Insgesamt gibt es gute Hinweise darauf, dass vor allem die großen Isoformen von Tenascin C auch ein Ziel systemischer Antikörpergabe sein könnten (Schliemann und Neri 2007; Rybak et al. 2007).

Hier lässt sich also zusammenfassen, dass es gute Hinweise darauf gibt, dass eine Therapie mit Biologica mit dem Zielmolekül Tenascin-C sich etablieren könnte.

Naturgemäß erlaubt eine rein immunhistologische Arbeit keine ausreichende Beurteilung darüber, inwiefern eine gewonnene Erkenntnis klinisch sinnvoll einzusetzen ist. Allerdings gibt es in der Literatur, wie oben gezeigt, deutliche Hinweise darauf, dass Tenascin-C ein interessantes Zielmolekül für die Diagnostik und Therapie von Malignomen ist. Ob dies letztlich auch für Karzinome des Ösophagus gilt müssen weitere Untersuchungen zeigen. Basierend auf den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit wurden weitere Versuche mit Ösophagus-Ca-Xenograftmäusen unternommen. Hier stehen die Ergebnisse jedoch noch aus.

4.2.7 Ausblick

Die Therapie von malignen Erkrankungen wird zunehmend durch gezielte Therapie mit monoklonalen Antikörpern geprägt. Im Bereich des Gastrointestinaltrakts, vor allem des Kolon-Karzinoms (Schmiegel et al. 2008), aber auch des Magen-Karzinoms (Moehler et al. 2011) werden systemische Gaben monoklonaler Antikörper zu therapeutischen Zwecken verwendet. Für das Ösophagus-Karzinom ist eine solche Therapie bisher nicht etabliert. Jedoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass weitere Forschung hier lohnend sein kann. Die Publikation der Ergebnisse dieser Arbeit ist in Vorbereitung und wird in Kürze angestrebt. Basierend auf dieser Arbeit werden Untersuchungen am Xenograft-Mausmodell durchgeführt.

5. Literaturverzeichnis

Alifano M, Souazé F et al (2009): "Neurotensin Receptor 1 Determines the Outcome of Non-Small Cell Lung Cancer." Clin Cancer Res 16 (17) 4401- 10

Allen M und JL Jones (2011): "Jekyll and Hyde: the role of microenvironment on the progression of Cancer" J Pathol Jan;223(2):162-76

Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A et al. (2010): „Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial“ Lancet 376, 687-97

Barber DL., AM. Cacace et al. (1991) "Fatty acids stereospecifically stimulate neurotensin release and increase in enteric endocrine cells." Am J Physiol 1991; 261: G497-503

Barei D., R. Stabenow et al. (2002) „Aktuelle Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms in Deutschland“ Dtsch Med Wochenschr 127:1367–1374

Baumhoer D. und G. Ramadori (2005): „Ösophaguskarzinome –aktueller Stand der Diagnostik und Therapie“ Z Gastroenterol 43: 399-409

Berndt, A., K. Anger, et al. (2006). "Differential expression of tenascin-C splicing domains in urothelial karzinomas of the urinary bladder." J Cancer Res Clin Oncol 132(8): 537-46.

Berndt A, Köllner R, Richter P et al. (2010):“ A comparative analysis of oncofetal fibronectin and tenascin-C incorporation in tumour vessels using human recombinant SIP format antibodies.“ Histochem Cell Biol 133: 467-75

Borsi L, Carnemolla B, Nicolò G, Spina B, Tanara G, Zardi L.: Expression of different

- tenascin isoforms in normal hyperplastic and neoplastic human breast tissue. *Int J Cancer*. Nov 11;52(5):688-92.
- Bourdon, MA., CJ. Wikstrand et al. (1983) „ Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody.“ *Cancer Res*. 43(6):2796-805.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA et al. (1995): A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1;92(16):7297-301.
- Brack SS, Silacci M, Birchler M, Neri D (2006): „Tumor targeting properties of novel Antibodies specific to the large isoform of Tenascin-C.“ *Clin Cancer Res* 12(10): 3200-8
- Brellier F, Tucker RP und Chiquet-Ehrismann R (2009): Tenascins and their implications in diseases and tissue-mechanics. *Scand J Med Sci Sports* 19; 511-519
- Brellier F., Tucker RP. Chiquet-Ehrismann R. (2009): Tenascins and their implications in diseases and tissue mechanics. *Scand J Med Sci Sports* 19: 511-519
- Broll, R., K. Kayser, et al. (1994). "Detection of tenascin in stomach cancer. An immunohistochemical study." *Zentralbl Pathol* 140(2): 123-8.
- Broll, R., S. Meyer, et al. (1995). "Expression of tenascin in tumors of the esophagus, small intestine and colorectum. An immunohistochemical study." *Gen Diagn Pathol* 141(2): 111-9.
- Brown MT, Coleman RE, Friedman AH et al (1996): Intrathecal 131I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81c6 treatment of patients with leptomeningeal neoplasms or primary brain tumor resection cavities with subarachnoid communication: phase I trial results. *Clin Cancer Res* Jun;

2(6);963-72

Buchegger, F., F. Bonvin, et al. (2003). "Radiolabeled neurotensin analog, ^{99m}Tc-NT-XI, evaluated in ductal pancreatic adenokarzinoma patients." *J Nucl Med* 44(10): 1649-54.

Buttar NS, KK Wang et al. (2001): „Extent of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus correlates with risk of adenokarzinoma.“ *Gastroenterology* 120(7):1630-9.

Carnemolla B, Castellani P, Ponassi M et al. (1999):“ Identification of a glioblastoma-Associated tenascin-C isoform by a high affinity recombinant antibody.“ *Am J Pathol* 154: 1345-52

Carraway, R. E. and A. M. Plona (2006). "Involvement of neurotensin in cancer growth: Evidence, mechanisms and development of diagnostic tools." *Peptides*. 27(10):2445-60

Carraway R and S.E. Leeman (1976). "Characterization of radioimmunoassayable neurotensin in the rat. Its differential distribution in the central nervous system, small intestine and stomach." *J Biol Chem*; 251: 7045-52

Carraway R and S.E. Leeman (1973). "The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami." *J Biol Chem*; 248: 6854-61

Chiquet-Ehrismann, R. (2004). "Tenascins." *Int J Biochem Cell Biol* 36(6): 986-90.

Chiquet-Ehrismann, R. and M. Chiquet (2003). "Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress." *J Pathol* 200(4): 488-99.

Chiquet-Ehrismann, R., E. J. Mackie, et al. (1986). "Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis." *Cell* 47(1): 131-9.

- Chu P. und Weiss L. (2009): Modern Immunohistochemistry . Cambridge University Press, NY
- Cooper JS, MD Guo .(1999). „Chemoradiotherapy of locally advanced esophageal cancer: long-term follow-up of a prospective randomized trial (RTOG : Z85-01). Radiation Therapy Oncology Group.“ JAMA. May 5;281(17):1623-7.
- Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK et al. (1984): Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). J Histochem Cytochem. 1984 Feb;32(2):219-29.
- Dal Farra, C., P. Sarret, et al. (2001). "Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines." Int J Cancer 92(4): 503-9.
- Daly JM, WA Fry et al. (2000). „ Esophageal cancer: results of an American College of Surgeons Patient Care Evaluation Study.“ J Am Coll Surg. ;190(5):562-72
- De Santis, R., A. M. Anastasi, et al. (2003). "Novel antitenascin antibody with increased tumour localisation for Pretargeted Antibody-Guided RadioImmunoTherapy (PAGRIT)." Br J Cancer 88(7): 996-1003.
- De Santis R, Albertoni C, Petroncelli F et al. (2006). „Low and high tenascin-expressing tumors are efficiently targeted by ST2146 monoclonal antibody.“ Clin Cancer Res Apr1; 12 (7Pt1): 2191-6
- Diamandis EP (2002). „Tumor Markers – Past Present and Future“ in Diamandis et al (2002) S. 3-9

- Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H (ed.) et al. (2002). „Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications“ AACC Press, Washington DC
- Dijkgraaf I und Boermann OC (2010) Molecular imaging of angiogenesis with SPECT
Eur J Nucl Med Mol Imaging 37 (Suppl 1=: S104-113
- Dueck, M., S. Riedl, et al. (1999). "Detection of tenascin-C isoforms in colorectal mucosa, ulcerative colitis, karzinomas and liver metastases." Int J Cancer 82(4): 477-83.
- Dugu L, Hayashida S et al. (2010): Aberrant expression of tenascin-c and neuronatin in malignant peripheral nerve sheath tumors.; Eur J Derm atol 20(5):580-4.
- Ehlers, R. A., S. Kim, et al. (2000). "Gut peptide receptor expression in human pancreatic cancers." Ann Surg 231(6): 838-48.
- Emoto, K., Y. Yamada, et al. (2001). "Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal karzinoma." Cancer 92(6): 1419-26.
- Enzinger PC and RJ Mayer (2003). „Esophageal Cancer“ N Engl J Med;349: 2241-52
- Esposito, I., R. Penzel, et al. (2006). "Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis." J Pathol 208(5): 673-85.
- Evers BM (2006): Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues; Peptides 207, 2424-2433
- Folkvord JM, Vidars D, Coleman-Smith, Clark RA (1989): „Optimization of immunohistochemical techniques to detect extracellular matrix proteins in fixed skin specimens.“ J Histochem Cytochem 37: 105-113
- Galler K, Junker K, Franz M et al.(2012):“ Differential vascular expression and

regulation of oncofetal tenascin-C and fibronectin variants in renal cell carcinoma (RCC): implications for an individualized angiogenesis-related targeted drug delivery." *Histochem Cell Biol* 137:195-204

Gong XG, Lv YF (2010) Gemcitabine Resistance Induced by Interaction between Alternatively Spliced Segment of Tenascin-C and Annexin A2 in Pancreatic Cancer Cells. *Biol Pharm Bull* 33(8):1261-7.

Gui X, G. Guzmán (2008): "Increased neurotensin receptor-1 expression during progression of colonic adenokarzinoma." *Peptides* 29 :1609 – 1615

Gulubova, M. and T. Vlaykova (2006). "Immunohistochemical assessment of fibronectin and tenascin and their integrin receptors alpha5beta1 and alpha9beta1 in gastric and colorectal cancers with lymph node and liver metastases." *Acta Histochem* 108(1): 25-35.

Hamdani N and J van der Velden: „Lack of specificity of antibodies directed against human beta-adrenergic receptors“ *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 379:403–407

Hanamura, N., T. Yoshida, et al. (1997). "Expression of fibronectin and tenascin-C mRNA by myofibroblasts, vascular cells and epithelial cells in human colon adenomas and karzinomas." *Int J Cancer* 73(1): 10-5.

Hanahan D, Weinberg RA (2000): „The Hallmarks of Cancer“ *Cell* 100: 57-70

Hanahan D, Weinberg RA (2011): „The Hallmarks of Cancer – The next generation“ *Cell* 144(5): 646-74

Heasley, L. E. (2001). "Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer." *Oncogene* 20(13): 1563-9.

Hirata E, Arakawa Y (2009): Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer Sci*

100(8):1451-9

Hsia, H. C. and J. E. Schwarzbauer (2005). "Meet the tenascins: multifunctional and mysterious." *J Biol Chem* 280(29): 26641-4.

Hsu SM, Raine L und Fanger H (1981): „The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics“ *Am J Clin Pathol.* Jun;75(6):816-21

Hsu, SM., Raine, L. and Fanger, H. (1981). „Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques“ *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29,4 577-580

Huang JY, Cheng YJ et al (2010): 1. Extracellular Matrix of Glioblastoma Inhibits Polarization and Transmigration of T Cells: The Role of Tenascin-C in Immune Suppression.; *J Immunol* 185(3):1450-9.

Ilmonen S, Jahkola T, Turunen JP, Muhonen T, Asko-Seljavaara S. (2004): Tenascin-C in primary malignant melanoma of the skin. *Histopathology* Oct; 45 (4): 405-11

International Agency for Research on Cancer – WHO (2005): *Cervix Cancer Screening*
Lyon, Frankreich

Jones, FS and PL Jones (2000)“The Tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function and regulation during embryonic development and tissue remodelling” *Dev Dyn*; 218: 235-259

Katenkamp K, Berndt A, Hindermann W et al. (2004): mRNA expression and protein distribution of the unspliced tenascin-C isoform in prostatic adenokarzinoma. *J Pathol* Jul; 203(3); 771-9

Kaufmann O, Fietze E, Mengs J, Dietel M. (2001): Value of p63 and cytokeratin 5/6

as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated karzinomas. Am J Clin Pathol 116(6): 823-30

Kichler A, Leborgne C, Coeytaux, Danos O. (2001): „Polyethlenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study.“ J Gene Med 3; 135-44

Laemmli UK (1970): „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ Nature 227, 680-685

Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF (2012): „Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.“ Online <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/032-045OL.html>

Linder, S., E. Castanos-Velez, et al. (2001). "Immunohistochemical expression of extracellular matrix proteins and adhesion molecules in pancreatic karzinoma." Hepatogastroenterology 48(41): 1321-7.

Lohi J, Tani T, Laitinen L et al. (1995): „Tenascin and fibronectin isoforms in human Renal cell carcinoma, renal cell carcinoma cell lines and xenografts in nude mice.“ Int J Cancer Nov 3;63(3):442-9

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): „Protein measurement with the Folin Phenol Reagent.“ J Biol Chem, 193, 265- 275

Maoret, J. J., Y. Anini, et al. (1999). "Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice." Int J Cancer 80(3): 448-54.

Maoret, J. J., D. Pospai, et al. (1994). "Neurotensin receptor and its mRNA are expressed in many human colon cancer cell lines but not in normal colonic epithelium: binding studies and RT-PCR experiments." Biochem Biophys Res Commun 203(1): 465-71.

- Marlind J., Kaspar, M. Trachsel E et al. (2008): „Antibody mediated Delivery of Interleukin-2 to the Stroma of Breast Cancer strongly enhances the potency of chemotherapy“ Clin Cancer Res 14 (20): 6515-24
- Michel MC, Wieland T and Tsujimoto G (2009): „How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies?“ Naunyn-Schmied Arch Pharmacol 379:385–388
- Mighell, A. J., J. Thompson, et al. (1997). "Human tenascin-C: identification of a novel type III repeat in oral cancer and of novel splice variants in normal, malignant and reactive oral mucosae." Int J Cancer 72(2): 236-40.
- Minsky BD, Pajak TF et al (2002). „INT 0123 (Radiation Therapy Oncology Group 94- 05) phase III trial of combined-modality therapy for esophageal cancer: high-dose versus standard-dose radiation therapy“. J Clin Oncol Mar 1;20(5):1167-74.
- Moehler M., Al-Batran S., Andus T., Anthuber M. et al. (2011): S3-Leitlinie Magenkarzinom – Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs. Z. Gastroenterol 49: 461-53
- Mustain WC, Rychahou PG und Evers BM (2011): The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 18; 75 - 82
- Orend, G. (2005). "Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis." Int J Biochem Cell Biol 37(5): 1066-83.
- Orend, G. and R. Chiquet-Ehrismann (2006). "Tenascin-C induced signaling in cancer." Cancer Lett. 244(2):143-63
- Osborn M, Debus E, Weber K. (1984). "Monoclonal antibodies specific for vimentin“ Eur J Cell Biol. 34 (1):137-43.
- Pas J. Wyszko E, Rolle K Rychlewski L et al. (2006): Analysis of structure and

function of tenascin-C. *J Biochem Cell Biol* 38(9):1594-602

Pazzaglia L, Conti A et al. (2010): Differential gene expression in classic giant cell tumours of bone: Tenascin C as biological risk factor for local relapses and metastases. *Histopathology* 57(1):59-72.

Pelstring RJ, Allred DC, Esther RJ, Shellye R et al. (1991): „Differential tissue preservation during tissue autolysis.“ *Human Pathology* 22(3): 237-41

Preiß J, Dornoff W, Hagmann FG, Schmieder A (2012): Taschenbuch Onkologie – Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2012/13; Zuckschwerdt Verlag, Germering

Reid BJ, DS Levine et al. (2000) „ Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: baseline histology and flow cytometry identify low- and high-risk patient subsets.“ *Am J Gastroenterol* 95(7):1669-76.

Reubi, J. C. (2003). "Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy." *Endocr Rev* 24(4): 389-427.

Reubi, J. C., H. R. Macke, et al. (2005). "Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future." *J Nucl Med* 46 Suppl 1: 67S-75S.

Reubi, J. C., B. Waser, et al. (1998). "Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenokarzinoma." *Gut* 42(4): 546-50.

Reubi, J. C., B. Waser, et al. (1999.1). "Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas." *Int J Cancer* 82(2): 213-8.

Reubi, J. C., B. Waser, et al. (1999.2). "Receptor autoradiographic evaluation of cholecystikinin, neurotensin, somatostatin and vasoactive intestinal peptide receptors in gastro-intestinal adenokarzinoma samples: where are they really

located?" Int J Cancer 81(3): 376-86.

Richter P, Tost M. et al. (2009): "B and C domain containing tenascin-C: urinary markers for invasiveness of urothelial carcinoma of the urinary bladder?" J Cancer Res Clin Oncol 135(10):1351-8.

Riede UN, Schäfer HE, Werner M (2004): „Allgemeine und spezielle Pathologie“ Thieme Verlag, Stuttgart

Rigato F, Garwood J et al. (2002): "Tenascin-C Promotes Neurite Outgrowth of Embryonic Hippocampal Neurons through the Alternatively Spliced Fibronectin Type III BD Domains via Activation of the Cell Adhesion Molecule F3/Contactin" The Journal of Neuroscience, , 22(15): 6596-6609;

Riedl, S., H. Bodenmuller, et al. (1995). "Significance of tenascin serum level as tumor marker in primary colorectal carcinoma." Int J Cancer 64(1): 65-9.

Riedl, S., M. Kadmon, et al. (1998). "Mucosal tenascin C content in inflammatory and neoplastic diseases of the large bowel." Dis Colon Rectum 41(1): 86-92.

Riedl, S., P. Moller, et al. (1992). "Induction and altered distribution of tenascin in the basal lamina of colorectal adenomas and carcinomas." Exs 61: 277-81.

Riedl, S., A. Tandara, et al. (2001). "Serum tenascin-C is an indicator of inflammatory bowel disease activity." Int J Colorectal Dis 16(5): 285-91.

Riedl, S. E., A. Faissner, et al. (1992). "Altered content and distribution of tenascin in colitis, colon adenoma, and colorectal carcinoma." Gastroenterology 103(2): 400-6.

Riva P, Arista A, Sturiale C et al (1992): Treatment of intracranial human glioblastoma by direct intratumoral administration of ¹³¹I-labelled anti-tenascin

monoclonal antibody BC-2; Int. J Cancer 51; 7-13

Riva P, Franceschi G, Frattarelli M (1999): 131I radioconjugated antibodies for the locoregional radioimmunotherapy of high-grade malignant glioma – phase and II study. Acta Oncol. 38(3):351-9.

Rovere, C., P. Barbero, et al. (1998). "Pro-neurotensin/neuromedin N expression and processing in human colon cancer cell lines." Biochem Biophys Res Commun 246(1): 155-9.

Rybak JN., Trachsel E., Scheuermann J., Neri D. (2007): „Ligand based vascular targeting of disease“ ChemMedChem 2: 22-40

Salmela, M. T., M. L. Karjalainen-Lindsberg, et al. (2001). "Upregulation and differential expression of matrilysin (MMP-7) and metalloelastase (MMP-12) and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-3 in Barrett's oesophageal adenokarzinoma." Br J Cancer 85(3): 383-92.

Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y et al. (2000) The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. Gut 47:251–255

Schliemann C und Neri D. (2007) „Antibody based targeting of the tumor vasculature“ Biochimica et Biophysica acta 1776: 175-192

Schmiegel W., Pox C., Reinacher-Schick A., Adler G. et al. (2008) S3-Leitlinie "Kolorektales Karzinom" Z Gastroenterol 46: 1 – 73

Schnell TG, Sontag SJ et al. (2001) „ Long-term nonsurgical management of Barrett's esophagus with high-grade dysplasia.“ Gastroenterology 120(7):1607-19

Schröder FH (2009) „ Review of diagnostic markers for prostate cancer.“ Recent Results Cancer Res. 181:173-82.

- Sedele M, Karaveli S, Peştereli HE (2002): Tenascin expression in normal hyperplastic and neoplastic endometrium. *Int J Gynecol Pathol.* Apr;21(2):161-6.
- Seeber S. und Schütte J. (2007). „Therapiekonzepte Onkologie“ Heidelberg 5. Auflage
- Shaheen NJ and JE Richter (2009). „Barrett’s oesophagus“ *Lancet* 373:850–61
- Sikkema M, Kerkhof M, Steyerberg EW, Kusters JG et al. (2009): Aneuploidy and Overexpression of Ki67 and p53 as Markers for Neoplastic Progression in Barrett’s Esophagus: A Case-Control Study. *Am J Gastroenterol* 104: 2673-2680
- Silacci, M., S. S. Brack, N Späth et al. (2006). "Human monoclonal antibodies to domain C of tenascin-C selectively target solid tumors in vivo." *Protein Eng Des Sel.* 19(10): 471-8
- Souaze, F., V. Viardot-Foucault, et al. (2006). "Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/beta-catenin pathway is an early event in human colonic adenomas." *Carcinogenesis* 27(4): 708-16.
- Stahl M., H Wilke und C Pöttgen (2007). „Ösophaguskarzinom“ in Seeber / Schütte 2007
- Statistisches Bundesamt (2010). „Gesundheit – Todesursachen in Deutschland“ Fachserie 12 Reihe 4
- Sugawara, I., J. Hirakoshi, et al. (1991). "Reduced tenascin expression in colonic karzinoma with lymphogenous metastasis." *Invasion Metastasis* 11(6): 325-31.
- Takeda A, Y Otani, H Iseki et al. (2007) „Clinical Significance of Large Tenascin-C Spliced Variant as a Potential Biomarker for Colorectal Cancer“ *World J Surg* 31, 388-94

- Talaulikar D, Gray JX et al. (2008) „A comparative study of the quality of DNA obtained from fresh frozen and formalin-fixed decalcified paraffin-embedded bone marrow trephine biopsy specimens using two different methods“ J Clin Pathol. Jan;61(1):119-23
- Tanaka K., N. Hiraiwa et al. (2004) “Tenascin-C regulates angiogenesis in tumor through the regulation of vascular endothelial growth factor expression.” Int J Cancer, 108, 31-40
- Thomas L. und Stieber P. (1998) „34.1 Maligne Erkrankungen“ in Thomas L. (Hg): Labor und Diagnose – Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 5. Auflage 1998 Frankfurt a. M. S. 956- 961
- Thomas RP, Slogoff M, Smith FW, Evers BM (2003): „Effect of aging on the proliferative capacity of the small bowel.“ J Gastrointest Surg Jan;7(1):88-95
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications.“ Proc Natl Acad Sci 76, 4350- 4354
- UICC, Sobin L-H et al. (2003) „TNM Classification des tumeurs malignes“ 6. Auflage, Paris 2003
- UICC, Sobin L-H et al. (2010) „ TNM Classification of malignant tumours“ 7. Auflage, Hoboken und New Jersey 2010
- Vallböhmer D, W. Schröder J. Brabender, A. H. Hölscher (2011): „Ösophaguskarzinom, aktueller Stand der multimodalen Therapie“ Zentralbl Chir; 136(4): 312-316
- Van Obberghen-Schilling E, Tucker RP, Saupe F et al. (2011): „Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth.“ Int J Dev Biol 55:511-25

Vincent, J. P., J. Mazella, et al. (1999). "Neurotensin and neurotensin receptors." Trends Pharmacol Sci 20(7): 302-9.

Wang, L., H. Friess, et al. (2000). "Neurotensin receptor-1 mRNA analysis in normal pancreas and pancreatic disease." Clin Cancer Res 6(2): 566-71.

Xiong W, Niu P Zhu W und Chen J (2009): Tenascin-C as a prognostic marker in Osteosarcoma? Chin Med J 122(22): 2737-2743

Zhao, D. and C. Pothoulakis (2006). "Effects of NT on gastrointestinal motility and secretion, and role in intestinal inflammation." Peptides. 27(10):2434-446.

6. Danksagung

Herr Univ.-Prof. Dr. Bertram Wiedenmann danke ich für die Überlassung des Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die stetige Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich Dr. Carsten Grötzinger danken, der die Arbeit betreute. Trotz seiner vielen Aufgaben war er stets für alle Fragen ansprechbar und wußte sie kompetent zu beantworten.

Ines Eichhorn und Yvonne Giesecke führten mich in die experimentellen Techniken ein und halfen stets wenn es nötig wurde. Dafür herzlichen Dank.

Allen namentlich nicht genannten Helfern und Mitgliedern der AG Wiedenmann, des Instituts für Pathologie und der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, die mir im Labor, bei der Gewinnung von Proben und bei der Datensammlung zur Seite standen danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Zuletzt möchte ich vor allem meiner Familie danken:

Meine Frau Marianne hielt mir in der Zeit des Schreibens stets den Rücken frei.

Ohne die Unterstützung meiner Eltern hätte ich die schöne und anregende Zeit im Labor nicht verbringen können.

Mein Schwiegervater Univ.-Prof. em. Dr. Hubert Sydow stand wenn ich Fragen zur Statistik hatte stets zur Verfügung und hat die Arbeit noch einmal kritisch Korrektur gelesen. Meine Schwiegermutter Dr. Ursula Sydow nahm sich viel Zeit um Rechtschreibung und Zeichensetzung akribisch zu überprüfe

7. Lebenslauf

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

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Markus Helmut Friedrich Peuckert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Tenascin-C und Neurotensinrezeptor-1 als Markermoleküle des Ösophaguskarzinoms“ 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.

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

Datum

Unterschrift