

Institut für Experimentelle Tumorforschung

Sektion für Molekulare Onkologie

(Leiter Prof. Dr. rer. nat. H. Kalthoff)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**NACHWEIS VON DISSEMINIERTEN UND ZIRKULIERENDEN  
TUMORZELLEN BEIM ÖSOPHAGUSKARZINOM UND DEREN  
EINFLUSS AUF DAS ÜBERLEBEN**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**ANNETTE BARATAY**

aus Bremen

Kiel 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Kalthoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfram Klapper

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.07.2014

gez. Prof. Dr. Johann Roider

*Meinen Eltern*

## **Inhalt**

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Einführung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Das Ösophaguskarzinom.....</b>	<b>2</b>
1.2.1	Epidemiologie, Histologie und Risikofaktoren .....	2
1.2.2	Stadieneinteilung .....	3
1.2.3	Diagnostik.....	6
1.2.4	Therapie .....	6
1.2.5	Prognose und Rezidivraten .....	7
<b>1.3</b>	<b>Tumorzelldisseminierung.....</b>	<b>8</b>
1.3.1	Disseminierte und zirkulierende Tumorzellen.....	8
1.3.2	CK-20 in der Diagnostik zum Nachweis von isolierten Tumorzellen.....	10
1.3.3	Disseminierte/ Zirkulierende Tumorzellen im Blut und im Knochenmark.....	12
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung und Ziel der Arbeit.....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Das Patientenkollektiv.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Probengewinnung .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>Kryotomschnitte der Gewebeproben.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Ficoll-Dichtekissen-Zentrifugation von Blut- und Knochenmarkproben.....</b>	<b>16</b>
<b>2.5</b>	<b>RNA- Isolierung .....</b>	<b>18</b>
<b>2.6</b>	<b>Durchführung der nested CK-20 RT-PCR .....</b>	<b>18</b>
2.6.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	18
2.6.2	cDNA Synthese .....	19

2.6.3	CK-20 nested RT PCR.....	20
2.6.4	Agarosegel-Elektrophorese.....	23
<b>2.7</b>	<b>Immunhistochemischer Nachweis von CK 20 in Ösophaguskarzinom- sowie peritumoralem nicht-neoplastischem Gewebe .....</b>	<b>24</b>
<b>2.8</b>	<b>Statistische Auswertung der Daten .....</b>	<b>27</b>
2.8.1	Praktische Durchführung der Datenanalysen .....	27
2.8.2	Theoretischer Hintergrund der Datenanalysen .....	28
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Das Patientenkollektiv .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Zusammenhang zwischen Überlebenswahrscheinlichkeiten und ausgewählten klinischen Daten.....</b>	<b>32</b>
3.2.1	Für das Patientenkollektiv R0.....	32
3.2.2	Zusammenfassung: Zusammenhang zwischen Überlebenswahrscheinlichkeiten und ausgewählten klinischen Daten für das Patientenkollektiv R0.....	41
<b>3.3</b>	<b>Nachweis von CK-20.....</b>	<b>42</b>
3.3.1	Immunhistochemischer Nachweis von CK-20 in Gewebeproben von Ösophaguskarzinom- und peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe des Ösophagus.....	42
3.3.2	Ergebnisse der CK-20 RT-PCR.....	51
3.3.3	Detektionsraten von CK-20 mRNA mittels CK-20 RT-PCR beim Patientenkollektiv R0.....	52
3.3.4	Detektionsraten von CK-20 in Abhängigkeit von bestimmten klinischen Parametern .....	53
<b>3.4</b>	<b>Zusammenhang zwischen CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark und dem Überleben.....</b>	<b>59</b>
3.4.1	Zusammenhang zwischen CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark und dem Überleben für das Patientenkollektiv R0.....	61

3.4.2	Zusammenhang zwischen CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark und Überleben bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen .....	64
3.4.3	Zusammenhang zwischen CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark und Überleben bei Patienten mit UICC-Stadium I und II .....	67
3.4.4	Zusammenhang zwischen CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark und Überleben bei Patienten mit UICC-Stadium III und IV .....	70
3.4.5	Zusammenhang zwischen CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark und Überleben bei den Patienten, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben.....	73
<b>3.5</b>	<b>Ergebnisse der Multivariaten Analysen .....</b>	<b>76</b>
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>Patientenkollektive und Studie.....</b>	<b>78</b>
4.1.1	Epidemiologische Daten, Histologie und Stadienverteilung.....	78
4.1.2	Prognose .....	79
4.1.3	Zusammenhang zwischen TNM-Status und Überleben .....	80
<b>4.2</b>	<b>CK-20 als Marker der Tumorzell dissemination .....</b>	<b>81</b>
4.2.1	CK-20 zum Nachweis von isolierten Tumorzellen bei unterschiedlichen Tumorentitäten.....	81
4.2.2	Immunhistochemischer Nachweis von CK-20 bei Patienten mit Ösophaguskarzinom .....	82
4.2.3	Nachweis von CK-20 bei Patienten mit Ösophaguskarzinom mittels CK-20 RT-PCR.....	84
<b>4.3</b>	<b>Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit Ösophaguskarzinom und deren Einfluss auf das Überleben.....</b>	<b>87</b>
4.3.1	Nachweisraten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit Ösophaguskarzinom .....	87
4.3.2	Die Korrelation zwischen dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und bestimmten klinischen Parametern .....	88

4.3.3	Zusammenhang zwischen dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und dem Überleben .....	90
4.3.4	Zusammenhang zwischen dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen und Überleben in unterschiedlichen Stadien .....	91
4.3.5	Zusammenhang zwischen Tumorzelldisseminierung und einer (neo)adjuvanten Therapie .....	92
<b>4.4</b>	<b>Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Blut bei Patienten mit Ösophaguskarzinom und deren Einfluss auf das Überleben.....</b>	<b>94</b>
4.4.1	Detektionsraten von zirkulierenden Tumorzellen im Blut bei Patienten mit Ösophaguskarzinom .....	94
4.4.2	Die Korrelation zwischen dem Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen und bestimmten untersuchten klinischen Parametern.....	95
4.4.3	Zusammenhang zwischen dem Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen und dem Überleben.....	96
<b>4.5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>98</b>
5.	ZUSAMMENFASSUNG .....	102
6.	ANHANG .....	104
	LITERATURVERZEICHNIS .....	111
	DANKSAGUNG.....	122
	LEBENS LAUF .....	123

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Schematische Darstellung der Phasen und Zellaufteilung nach der Ficoll-Dichtekissen-Zentrifugation.....</i>	<i>17</i>
<i>Abb. 2: Schematische Darstellung der nested CK-20 RT-PCR.....</i>	<i>21</i>
<i>Abb. 3: Zusammenhang zwischen UICC-Stadium und Überleben für das Patientenkollektiv R0 .....</i>	<i>33</i>
<i>Abb. 4: Zusammenhang zwischen Stadiengruppe und Überleben für das Patientenkollektiv R0.....</i>	<i>34</i>
<i>Abb. 5: Zusammenhang zwischen T-Kategorie und Überleben für das Patientkollektiv R0.....</i>	<i>36</i>
<i>Abb. 6: Zusammenhang zwischen N-Kategorie und Überleben für das Patientenkollektiv R0 .....</i>	<i>38</i>
<i>Abb. 7: Zusammenhang zwischen M-Kategorie und Überleben für das Patientenkollektiv R0.....</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 8: Immunhistochemische Anfärbungen von peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe und Ösophaguskarzinomgewebe für den Patienten 1 .....</i>	<i>45</i>
<i>Abb. 9: Immunhistochemische Anfärbungen von peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe und Ösophaguskarzinomgewebe für den Patienten 2 .....</i>	<i>47</i>
<i>Abb. 10: Immunhistochemische Anfärbungen von peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe und Ösophaguskarzinomgewebe für den Patienten 6 .....</i>	<i>49</i>
<i>Abb. 11: Ergebnis der CK-20 RT-PCR und anschließender Elektrophorese repräsentativ für 10 Patienten.....</i>	<i>51</i>
<i>Abb. 12: Ergebnisse der PBGD-PCR mit anschließender Elektrophorese repräsentativ für 10 Patienten.....</i>	<i>51</i>
<i>Abb. 13: Detektionsraten von CK-20 mRNA im Knochenmark und im Blut sowie im Knochenmark und /oder im Blut für das Patientenkollektiv R0 .....</i>	<i>52</i>
<i>Abb. 14: Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Überleben für das Patientenkollektiv R0.....</i>	<i>61</i>
<i>Abb. 15: Assoziation zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Überleben für das Patientenkollektiv R0.....</i>	<i>63</i>
<i>Abb. 16: Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Überleben für die Patienten ohne Lymphknotenmetastasen.....</i>	<i>65</i>
<i>Abb. 17: Assoziation zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Überleben für die Patienten mit UICC-Stadium I und II.....</i>	<i>68</i>



<i>Abb. 18: Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Gesamtüberleben für die Patienten mit UICC-Stadium I und II.....</i>	<i>69</i>
<i>Abb. 19: Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Überleben für die Patienten mit UICC-Stadium III und IV.....</i>	<i>71</i>
<i>Abb. 20: Assoziation zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Gesamtüberleben für die Patienten der UICC-Stadien III und IV.....</i>	<i>72</i>
<i>Abb. 21: Assoziation zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Überleben für die Patienten, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben .....</i>	<i>74</i>

#### ANHANG

<i>Abb. 22: Zusammenhang zwischen UICC-Stadium und Überleben für das Gesamtkollektiv R0 bis R2.....</i>	<i>106</i>
<i>Abb. 23: Zusammenhang zwischen Stadiengruppe und Überleben für das Patientenkollektiv R0 bis R2.....</i>	<i>107</i>
<i>Abb. 24: Zusammenhang zwischen T-Kategorie und Überleben für das Gesamtkollektiv R0 bis R2.</i>	<i>108</i>
<i>Abb. 25: Zusammenhang zwischen N-Kategorie und Überleben für das Gesamtkollektiv R0 bis R2</i>	<i>109</i>
<i>Abb.26: Zusammenhang zwischen M-Kategorie und Überleben für das Gesamtkollektiv R0- R2.....</i>	<i>110</i>

## **Tabellenverzeichnis**

<i>Tabelle 1: Einteilung der AEG-Tumoren nach Siewert .....</i>	<i>3</i>
<i>Tabelle 2: TNM-Klassifikation der Ösophaguskarzinome nach AJCC 2009.....</i>	<i>4</i>
<i>Tabelle 3: Stadieneinteilung der Ösophaguskarzinome (Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome) nach AJCC .....</i>	<i>5</i>
<i>Tabelle 4: Verwendete Primer für die CK-20- und PBGD-PCR (nach Soeth, 1997) .....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 5: Protokoll der nested CK-20 PCR.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 6: Verwendete Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 7: Verteilung der histologischen Tumorart beim Patientenkollektiv R0 (n=77).....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 8: Verteilung der TNM-Klassifikation beim Patientenkollektiv R0 (n=77).....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 9: Verteilung der UICC-Stadien beim Patientenkollektiv R0 (n=77) .....</i>	<i>31</i>
<i>Tabelle 10: Verteilung des Differenzierungsgrades beim Patientenkollektiv R0 (n=77).....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 11: Assoziation zwischen Überlebenswahrscheinlichkeiten und ausgewählten klinischen Parametern.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 12: Klinische Daten von 8 exemplarischen Patienten, bei denen immunhistochemische Färbungen durchgeführt wurden .....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 13: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von Tumorgewebe und peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe von 8 exemplarischen Patienten .....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 14: Korrelation zwischen dem CK-20 Nachweis im Knochenmark und bestimmten klinischen Parametern.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 15: Korrelation zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und bestimmten klinischen Parametern.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabelle 16: Korrelation zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und/oder im Knochenmark und bestimmten klinischen Parametern .....</i>	<i>58</i>
<i>Tabelle 17: Assoziation zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Überleben für die Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0) .....</i>	<i>66</i>

<i>Tabelle 18: Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Überleben für die Patienten mit UICC-Stadium I und II.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabelle 19: Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Überleben für die Patienten mit UICC-Stadium III und IV.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabelle 20: Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Überleben für die Patienten, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben .....</i>	<i>75</i>
<i>Tabelle 21: Ergebnisse der multivariaten Analysen für ausgewählte Faktoren assoziiert mit dem Gesamtüberleben berechnet für das Patientenkollektiv R0.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabelle 22: Ergebnisse der multivariaten Analysen für ausgewählte Faktoren assoziiert mit dem rezidivfreien Überleben berechnet für das Patientenkollektiv R0.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabelle 23: Ergebnisse der multivariaten Analysen für ausgewählte Faktoren assoziiert mit dem tumorspezifischen Überleben berechnet für das Patientenkollektiv R0 .....</i>	<i>77</i>

#### ANHANG

<i>Tabelle 24: Verteilung der histologischen Tumorart beim Gesamtkollektiv R0-R2 (n=94) .....</i>	<i>104</i>
<i>Tabelle 25: Verteilung der TNM-Klassifikation beim Patientenkollektiv R0-R2 (n=94) (Prozentangaben jeweils für die Kategorie T, N und M) .....</i>	<i>104</i>
<i>Tabelle 26: Verteilung der UICC-Stadien beim Patientenkollektiv R0- R2 (n=94).....</i>	<i>105</i>
<i>Tabelle 27: Verteilung des Differenzierungsgrades beim Patientenkollektiv R0-R2 (n=94).....</i>	<i>105</i>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEG	adenocarcinoma of the esophagogastric junction
AJCC	American Joint Commission for Classification of cancer
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase
Bp	Basenpaare
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CTC	Circulating tumor cells: Zirkulierende Tumorzellen
CK	Zytokeratin
CK-20	Zytokeratin 20
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTC	Disseminated tumor cells: Disseminierte Tumorzellen
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FDA	Food and Drug Administration
HR	Hazard Ratio
JÜR	Jahresüberlebensrate
MG	Molekulargewicht
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
PAP	Peroxidase anti-Peroxidase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SCCA	Squamous Cell Carcinoma Antigen
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
UICC	Union International Contre le Cancer

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung

Das Ösophaguskarzinom ist einer der aggressivsten epithelialen Tumoren. Mit einer Häufigkeit von 1,8% aller malignen Tumoren bei Männern und 0,6% bei Frauen ist es für 3,2% bzw. 1,1% aller Todesfälle durch Neoplasien bei Männern und Frauen in Deutschland verantwortlich (Berz et al., 2010). Nach der neuesten (7. Auflage) UICC-Klassifikation (Wittekind et al., 2010) zählen jetzt alle Tumoren des gastroösophagealen Überganges (AEG-Typen I bis III) zu den Ösophaguskarzinomen. Außerdem ist es in den Industrienationen in den letzten Jahren zu einer steigenden Inzidenz von Adenokarzinomen des Ösophagus gekommen (Kong et al., 2011). Diese beiden Tatsachen haben dazu geführt, dass die Inzidenz des Ösophaguskarzinoms zunimmt (Jemal et al., 2010). Die Mortalität des Ösophaguskarzinoms ist dabei mit ca. 90% sehr hoch (Kamangar et al., 2006). Selbst wenn zum Zeitpunkt der Operation noch keine Lymphknoten- oder Fernmetastasen bestanden haben, kommt es bei ca. 50% der Patienten mit Ösophaguskarzinom im Verlauf der Krankheit zur Ausbildung von Lokal-Rezidiven oder Fernmetastasen (Marietta et al., 2003). Diese Tatsache lässt die Vermutung zu, dass sich bei diesen scheinbar kurativ operierten Patienten vielleicht schon vor dem Zeitpunkt der Operation isolierte Tumorzellen vom Primärtumor gelöst haben, die jedoch nicht mit der gängigen Diagnostik nachzuweisen waren. Die Forschung zum Nachweis von zirkulierenden (CTC) und disseminierten Tumorzellen (DTC) hat einen immer höheren Stellenwert in der Medizin erreicht. Man geht davon aus, dass CTC/ DTC, bevor es zur Entstehung von Metastasen kommt, meist lange Zeit inaktiv sind („dormancy“), und da die meisten Chemotherapeutika nur bei proliferierenden Zellen wirken, können sie in der Regel nicht durch gängige Chemotherapeutika eliminiert werden (Pantel et al., 1993). Die hier vorliegende Arbeit untersucht eine Methode zum Nachweis von CTC und DTC bei Patienten mit Ösophaguskarzinom und den Zusammenhang mit dem Überleben. Durch den Nachweis von CTC/ DTC sowie der Untersuchung von deren Eigenschaften wird es in Zukunft vielleicht möglich sein, Patienten, die von einer Chemotherapie oder zielgerichteten Krebstherapie profitieren könnten, ge-

zielt zu identifizieren und sie auf diese Art besser therapieren zu können (Van de Stolpe et al., 2011). So ließe sich also vielleicht auch die Prognose der Patienten mit Ösophaguskarzinom verbessern und die hohe Mortalitätsrate senken.

## 1.2 Das Ösophaguskarzinom

### 1.2.1 Epidemiologie, Histologie und Risikofaktoren

Die Begriffe Ösophaguskarzinom und Karzinome des ösophagogastralen Übergang (AEG-Tumoren) bezeichnen alle malignen epithelialen Neubildungen der Speiseröhre und des Magenmundes (Kardia) (Wittekind et al., 2011).

In Deutschland erkranken jährlich etwa 4100 Männer und ca. 1090 Frauen neu an einem Ösophaguskarzinom. Dies entspricht einem Anteil von 1,8% aller bösartigen Neubildungen bei Männern und 0,6 % bei den Frauen (Berz et al., 2010). Trotz dieses relativ geringen Anteils an den bösartigen Neubildungen insgesamt ist der Anteil dieser Erkrankung an den Krebstodesfällen mit 3,2% bei den Männern und 1,1% bei den Frauen deutlich höher (Berz et al., 2010). Männer erkranken dreimal häufiger an einem Ösophaguskarzinom als Frauen und mit einem mittleren Erkrankungsalter von 66 Jahren ca. 4 Jahre früher (Berz et al., 2010).

Das **Plattenepithelkarzinom** ist weltweit betrachtet die häufigste histologische Form des Ösophaguskarzinoms. Die wichtigsten Risikofaktoren für ein Plattenepithelkarzinom stellen in Mitteleuropa das Tabakrauchen und der Konsum von hochprozentigem Alkohol dar (Hashibe et al., 2007; Morita et al., 2010). Die Kombination beider Faktoren führt zu einer Verstärkung dieses Risikos (Morita et al., 2010).

**Adenokarzinome** des Ösophagus sind vorwiegend im unteren Drittel des Ösophagus lokalisiert (Lagarde et al., 2006). Während die Häufigkeit für Plattenepithelkarzinome in den letzten Jahren konstant blieb oder sogar abnahm, hat die Häufigkeit für Adenokarzinome des ösophagogastralen Übergangs (AEG-Tumoren) in der westlichen Welt in den letzten Jahren deutlich zugenommen (Kong et al., 2011; Lepage et al., 2005). Dies ist wahrschein-

lich durch die Zunahme der Adipositas-Rate in der westlichen Welt zu erklären, die einen Risikofaktor für die Entwicklung eines Adenokarzinomes darstellt (Kong et al., 2011).

Die Einteilung der AEG-Tumoren geschieht auf die folgende Art.:

*Tabelle 1: Einteilung der AEG-Tumoren nach Siewert*

AEG-Typ	Lokalisation
I	Adenokarzinom des distalen Ösophagus, 1-5 cm oral der anatomischen Kardia
II	Kardiakarzinom, 1 cm oral bis 2 cm aboral der anatomischen Kardia
III	Subkardiale Karzinome, 2 bis 5 cm aboral der anatomischen Kardia

*(nach Stein et al., 2000)*

Als Hauptrisikofaktor für das Adenokarzinom gilt der sogenannte Barrett Ösophagus (Hvid-Jensen et al., 2011). Beim Barrett Ösophagus entsteht auf dem Boden eines chronischen gastroösophagealen Refluxes eine Zylinderepithelmetaplasie im distalen Ösophagus. D. h. das mehrschichtige unverhornte Plattenepithel des Ösophagus wandelt sich durch den chronischen Entzündungsreiz in Zylinderepithel um, welches unter physiologischen Bedingungen im Magen, nicht jedoch im Ösophagus vorkommt.

### 1.2.2 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des Ösophaguskarzinoms erfolgt zurzeit nach der 7. Auflage des Cancer Staging Manuals der AJCC 2009 (Edge et al., 2009). Sie gilt für alle Tumoren des Ösophagus sowie des ösophagogastralen Übergangs. Gegenüber vorangegangener TNM-Klassifikationen haben sich folgende Aspekte geändert (Rice et al., 2010):

- Bei der **T-Kategorie** erfolgt jetzt eine Subklassifizierung zwischen T4a und T4b – Tumoren (siehe Tabelle 2).

- Die **N- Kategorie** wird jetzt je nach Anzahl der befallenen Lymphknotenmetastasen weiter subklassifiziert N0 bis N3 (siehe Tabelle 2). Für das diese Arbeit betreffende Patientenkollektiv liegt lediglich eine Differenzierung zwischen N0- und N1-Stadium vor. Als regionäre Lymphknoten werden jetzt sämtliche paraösophagealen Lymphknoten von cervical bis zoeliakal gewertet.
- Bei der **M- Kategorie** wurde der Begriff Mx eliminiert und es erfolgt jetzt lediglich eine Differenzierung zwischen M0- und M1-Stadium, dagegen wurde für das diese Arbeit betreffende Patientenkollektiv je nach Lokalisation der Fernmetastase eine weitere Differenzierung zwischen M1a und M1b vorgenommen.

*Tabelle 2: TNM-Klassifikation der Ösophaguskarzinome nach AJCC 2009*

<p><b><u>T: Primärtumor</u></b></p> <p><b>Tis</b> Carcinoma in situ/ High grade dysplasie</p> <p><b>T1</b> Tumor infiltriert Lamina propria oder Submukosa</p> <p>    <b>T1a</b> Lamina propria oder muscularis mucosae</p> <p>    <b>T1b</b> Submukosa</p> <p><b>T2</b> Tumor infiltriert Muscularis propria</p> <p><b>T3</b> Tumor infiltriert die Tunica adventitia</p> <p><b>T4</b> Tumor infiltriert Nachbarstrukturen</p> <p>    <b>T4a</b> Pleura, Perikard, Diaphragma oder benachbartes Peritoneum</p> <p>    <b>T4b</b> Andere benachbarte Strukturen wie z. B. Aorta, Trachea oder Wirbelkörper</p>	<p><b><u>M: Fernmetastasen</u></b></p> <p><b>M0</b> Keine Fernmetastasen</p> <p><b>M1</b> Fernmetastasen</p>
<p><b><u>N: Regionäre Lymphknoten</u></b></p> <p><b>N0</b> Keine regionären Lymphknotenmetastasen</p> <p><b>N1</b> 1-2 Regionäre Lymphknotenmetastasen</p> <p><b>N2</b> 3-6 Regionäre Lymphknotenmetastasen</p> <p><b>N3</b> &gt; 6 Regionäre Lymphknotenmetastasen</p>	<p><b><u>G: Differenzierungsgrad</u></b></p> <p><b>G1</b> Gut differenziert</p> <p><b>G2</b> Mäßig differenziert</p> <p><b>G3</b> Schlecht differenziert</p> <p><b>G4</b> Undifferenziert</p>

*(Edge et al., 2009)*

Hieraus ergibt sich jetzt die folgende Stadieneinteilung:



**Tabelle 3: Stadieneinteilung der Ösophaguskarzinome (Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome) nach AJCC**

<b>Stadium 0:</b>	Tis, N0, M0
<b>Stadium I a:</b>	T1, N0, M0
<b>Stadium I b:</b>	T2, N0, M0
<b>Stadium II A:</b>	T3, N0, M0
<b>Stadium II B:</b>	T1 oder T2, N1, M0
<b>Stadium III a:</b>	T4a, N0, M0
	T3, N1, M0
	T1 oder T2, N2, M0
<b>Stadium III b:</b>	T3, N2, M0
<b>Stadium III c:</b>	T4a, N1 oder N2, M0
	T4b, jedes N, M0
	Jedes T, N3, M0
<b>Stadium IV:</b>	Jedes T, jedes N, M1

*(Edge et al., 2009)*

In der aktuellen AJCC-Klassifikation wurde außerdem eine Stadieneinteilung nach prognostischen Faktoren hinzugefügt, bei der auch der histologische Typ (Plattenepithelkarzinom oder Adenokarzinom), der Differenzierungsgrad sowie die Lokalisation zum Tragen kommen, da man festgestellt hat, dass diese Faktoren einen wesentlichen Einfluss auf die Prognose haben (Rice et al., 2010). Das Vorhandensein von CTC und DTC oder der Nachweis von Mikrometastasen wurde für das Ösophaguskarzinom dagegen noch nicht mit in die Stadieneinteilung einbezogen (siehe auch Kapitel 4.5).

Die **R-Kategorie** stellt das postoperative Ergebnis der Resektion dar. Sie ist folgendermaßen eingeteilt:

**R0** kein residueller Tumor (makroskopischer und mikroskopisch tumorfrei)

**R1** mikroskopisch residueller Tumor (Schnittträger nicht tumorfrei)

**R2** makroskopisch residueller Tumor

### 1.2.3 Diagnostik

Zur Diagnostik zählen bei allen Patienten nach der exakten Anamnese, der körperlichen Untersuchung sowie der Kontrolle bestimmter Laborparameter im Blut die endoskopische Untersuchung mit gezielter Entnahme von Biopsien, eine Kontrastmittelröntgenuntersuchung von Magen und Speiseröhre sowie ein Röntgen des Thorax in zwei Ebenen (Stahl et al., 2010). Zur Bestimmung der Tumorinfiltrationstiefe kann die Endosonographie durchgeführt werden. Bei der Suche nach Fernmetastasen erfolgt neben der körperlichen Untersuchung auf tastbare Lymphknoten eine Bildgebung mittels Computertomographie (CT) des Thorax und des Abdomens (einschließlich des Halses bei suprabifurkalen und zervikalen Karzinomen). Bei Verdacht auf eine Tumorfistelung erfolgt eine Röntgenkontrastdarstellung des Trachealsystems (Zacherl et al., 2006). Die Positronenemissionstomographie-Computertomographie (PET-CT) mit 2-Fluor-2-deoxy-D-glucose scheint die Sensitivität beim Nachweis von Fernmetastasen zu erhöhen. Sie wird unter anderem zur Primärdiagnostik eingesetzt. Außerdem hilft sie bei einer Chemo- oder Radiochemotherapie den Therapieerfolg schnell zu beurteilen (Unterscheidung zwischen Respondern und Non-Respondern) (Bruzzi et al., 2007).

### 1.2.4 Therapie

Für eine **operative Therapie** kommen in der Regel fast alle Patienten ohne Fernmetastasen in Frage, sofern nicht aus Gründen des Tumorwachstums eine lokale Inoperabilität (z. B. Infiltration der Trachea) besteht. Die Operation sollte jedoch wenn möglich in Zentren mit großer Erfahrung im Bereich der Ösophaguschirurgie und großen Patientenzahlen erfolgen, da hierdurch die Mortalität gesenkt werden kann (Birkmeyer et al., 2003).

- Bei **Frühkarzinomen (Tis)** und bei den bis zu 2 cm großen Mukosakarzinomen ist eine Mukosektomie (interventionell mittels Endoskopie) die Therapie der Wahl. (Zacherl et al., 2006).

- Bei resektablen Adenokarzinomen erfolgt in der Regel eine radikale transhiatale Ösophagusresektion mit abdominaler und mediastinaler Lymphknotenresektion (Zweifeldlymphadenektomie) (Zacherl et al., 2006).
- Bei resektablem Plattenepithelkarzinom erfolgt eine transthorakale en bloc Ösophagektomie mit 2-Feld-Lymphadenektomie (Zacherl et al., 2006).
- **Fortgeschrittene Tumorstadien** (alle T3/T4, alle N größer 0) und alle primär nicht kurativ resektablen Tumoren werden in der Regel mittels multimodaler Therapiekonzepte behandelt (Burkhard et al., 2005). Dabei erfolgt zunächst eine neoadjuvante Chemotherapie bzw. Radiochemotherapie gefolgt von einer Operation. Es konnte zum jetzigen Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden, dass die neoadjuvante Chemo- oder Radiochemotherapie zu einer Prognoseverbesserung bei Patienten mit primär kurativ resektablem Ösophaguskarzinom (T2, N0, M0) führt, obwohl man davon ausgehen muss, dass ca. 50% aller Patienten bei Diagnosestellung ein zu niedriges Stadium diagnostiziert bekommen (Zhang et al., 2012).

Zur Rekonstruktion der Speisepassage wird in der Regel ein Magenhochzug durchgeführt (Hüttl et al., 2002). Liegt ein Zustand nach Magenresektion vor, wird ein Koloninterponat eingesetzt.

### 1.2.5 Prognose und Rezidivraten

Aktuell werden in der Literatur bei intentional kurativ operierten Patienten 5-Jahres-Überlebensraten (JÜR) zwischen 25 % und 52% beschrieben (Oezcelic et al., 2012; Hagen et al., 2001; Reynolds et al., 2012), wobei sich die Prognose für Patienten mit Ösophaguskarzinom in den letzten Dekaden stark verbessert hat (Reynolds et al., 2012). Es ist anzunehmen, dass die verbesserte Prognose durch eine hohe Spezialisierung bestimmter Zentren für Ösophaguskarzinome mit hohen Patientenzahlen, verbesserten Operationstechniken und einen erhöhten Einsatz von neoadjuvanten Therapiekonzepten zu begründen ist (Lagarde et al., 2006). Es muss jedoch erwähnt werden, dass trotz verbesserter Prognose nur sehr wenige der Patienten mit Ösophaguskarzinom auf Dauer geheilt werden können. Ca. 90% sterben aufgrund der Tumorerkrankung (Kamangar et al., 2006; Jemal et al.,

2010). In der Literatur werden zudem Rezidivhäufigkeiten nach kurativer Operation zwischen 42,4% und 52,4 % angegeben (Marietta et al., 2003; Chen et al., 2007; Oezcelic et al., 2012; Lee et al., 2011, Dresner et al., 2000). Die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs beträgt dabei oft nur wenige Monate, wobei nach Auftreten eines Rezidivs die meisten Patienten innerhalb weniger Monate versterben. So beträgt z. B. in der Arbeitsgruppe von Dresner (Dresner et al., 2000) die Rezidivhäufigkeit 48% mit einer medianen Zeit bis zum Auftreten des Rezidives von 11,7 Monaten. Das mediane Überleben nach Auftreten des Rezidivs beträgt dabei nur 2,7 Monate.

## 1.3 Tumorzelldisseminierung

### 1.3.1 Disseminierte und zirkulierende Tumorzellen

Die meisten Patienten mit Karzinomen sterben aufgrund von Metastasen und deren Folgen (Pantel et al., 2008). Es ist dabei wahrscheinlich, dass die Metastasierung schon viel früher beginnt, als bisher angenommen. So kommt es immer wieder bei eigentlich kurativ operierten Patienten im späteren Verlauf zur Ausbildung von Metastasen. Die Vermutung liegt also nahe, dass sich schon vor der Operation einzelne Tumorzellen abgelöst haben, die in einem inaktiven Zustand überdauern können („dormancy“). Der derzeitige Stand der Forschung ist, dass sich die meisten DTC in einem inaktiven Zustand befinden, in welchem sie zwar nicht proliferieren (G0-Phase des Zellzyklus), sie können jedoch jederzeit das Potential dazu ausbilden (Pantel et al., 1993). Man unterscheidet heute zwischen „**Disseminierten Tumorzellen**“, (DTC), welche isolierte Tumorzellen im Gewebe (z. B. im Knochenmark oder in der Leber) darstellen, und „**Zirkulierenden Tumorzellen**“, (CTC) isolierte Tumorzellen im peripherem Blut (Pantel et al., 2008).

Die Anwesenheit von DTC im Knochenmark kann nicht nur zur Entstehung von Knochenmetastasen führen, sondern auch zur Entstehung von Fernmetastasen in allen anderen Organen; dies gilt auch für Tumoren, bei denen es normalerweise nur sehr selten zur Ausbildung von Knochenmetastasen kommt (Pantel et al., 2004). Bei Patienten mit Ösophaguskarzinom kommt es nur relativ selten zur Entstehung von Knochenmetastasen (Man-

dard et al., 1981), dennoch werden bei ihnen Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen, deshalb geht man davon aus, dass die Präsenz im Knochenmark nur als ein Zustand zu betrachten ist, in welchem die Zellen zwar sehr gut überdauern können jedoch nur sehr selten Metastasen ausbilden.

Damit es zur Entstehung von CTC kommen kann, muss der Primärtumor zunächst mit Blutgefäßen versorgt werden (Angiogenese), über welche die Tumorzellen dann in das Gefäßsystem austreten können (Intravasation) (Chambers et al., 2002). Die Überlebensdauer von CTC im peripheren Blut ist nur kurz, und zur Entstehung von Metastasen ist es notwendig, dass sie in ein für sie spezifisches Zielorgan gelangen und hier wieder aus dem Blutgefäßsystem austreten (Extravasation) (Chambers et al., 2002). Es wurde postuliert, dass dieser Vorgang nach dem sogenannten „seed and soil“ Prinzip abläuft, nach dem sich Tumorzellen von bestimmten Primärtumoren nur in für sie spezifischen Organen niederlassen können (Paget, 1989). Man geht davon aus, dass nur eine kleine Subgruppe der CTC die Fähigkeit dazu hat später Metastasen auszubilden und dass sie sich hierzu eventuell in ein für sie spezifisches Organ einnisten müssen (Van de Stolpe et al., 2011). Welche Eigenschaften für die Bildung von Metastasen relevant sind, ist derzeit noch nicht bekannt (Pantel et al., 2008). CTC im Blut haben ihren Ursprung entweder im Primärtumor, oder sie haben sich von bereits entstandenen Metastasen gelöst (Van de Stolpe et al., 2011). Weiterhin haben sich in spezifischen Analysen dieser isolierten Tumorzellen Unterschiede zwischen den Tumorzellen im Primärtumor und den CTC/ DTC gezeigt. Ein Modell zur Tumorzell dissemination besagt, dass sich die CTC in einem sehr frühen Tumorstadium vom Primärtumor lösen und sich dann unabhängig von diesem entwickeln oder sie lösen sich erst in einem späteren Stadium von einer Metastase (Pantel et al., 2004). Eine einheitliche Definition von CTC existiert zum heutigen Zeitpunkt noch nicht und es ist wichtig, dass eine solche festgelegt wird (Van de Stolpe et al., 2011). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Eigenschaften von CTC sehr heterogen sein können und zwischen verschiedenen Tumorarten aber auch innerhalb eines Patienten sehr stark variieren können (Van de Stolpe et al., 2011). CTC/ DTC sind mit den herkömmlichen Nachweismethoden nicht nachweisbar.

Auch **Mikrometastasen** sind in der Regel nicht durch die üblichen Nachweismethoden im Rahmen des Stagings detektierbar, sie stellen im Unterschied zu CTC/ DTC jedoch bereits Zellverbände aus multiplen Zellen dar und weisen evtl. eine Gefäßinvasion oder

eine Stromareaktion auf. Definitionsgemäß (nach dem Cancer Staging Manual der AJCC, 6. Auflage) sind Mikrometastasen Zellverbände mit einer Größe von über 0,2 mm aber nicht größer als 2 mm (Greene et al., 2002).

### **1.3.2 CK-20 in der Diagnostik zum Nachweis von isolierten Tumorzellen**

Erst seit der Entwicklung markerspezifischer immunhistochemischer und molekularer Methoden ist es möglich, DTC und CTC nachzuweisen. (Pantel et al., 2008). Man geht heute davon aus, dass die Fernmetastasierung in einem Einzelzellstadium beginnt. Diese einzelne Zelle kann jedoch mit konventionellen Diagnostikmethoden nicht nachgewiesen werden (Pantel et al., 2004).

In dieser Arbeit erfolgt der Nachweis von CTC über eine nested CK-20 RT-PCR. Im folgenden Kapitel wird die Bedeutung der Zytokeratine speziell des Zytokeratins 20 (CK-20) zum Nachweis disseminierter Tumorzellen näher erläutert.

Zytokeratine sind zu „den Standardmarkern“ beim Nachweis von DTC/ CTC bei epithelialen Tumoren geworden (Pantel et al., 2008). Sie werden von Epithelzellen gebildet und sind normalerweise in den mesenchymalen Kompartimenten Blut und Knochenmark nicht nachweisbar (Schlimok et al., 1987). Das Vorkommen von Zytokeratinen in mesenchymalen Kompartimenten stellt somit eine ektope Expression dar.

In dieser Arbeit wurde das CK-20 als Marker für die Tumorzell dissemination bei Patienten mit Ösophaguskarzinom verwendet. Ein Vorteil des CK-20 gegenüber anderen Zytokeratinen ist, dass für CK-20 im Gegensatz zu anderen Zytokeratinen (z. B. CK-18 und 19) keine Pseudogene nachgewiesen werden, durch die es zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann (Soeth et al., 1997a). Bereits 1992 wurde durch die Arbeitsgruppe von Moll (Moll et al., 1992) CK-20 als geeignet für den Tumorzellnachweis beschrieben. CK-20 kommt im Epithel des Gastrointestinaltraktes, im Urothel und in Merkel-Zellen vor und ist sowohl bei Adenokarzinomen als auch bei Plattenepithelkarzinomen nachweisbar (Moll et al., 1992).

Als Nachweismethoden für CTC und DTC haben sich zwei Methoden bewährt, die Immunzytochemie (Nachweis auf Proteinebene) und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Nachweis auf DNA oder RNA-Ebene). Meist wird vor dem Nachweis von DTC und CTC eine Methode zur Anreicherung der Zellen durchgeführt wie z. B. die Ficoll-Dichtekissen-zentrifugation (siehe Kapitel 2.4) (Pantel et al., 2008).

Bei der **PCR** müssen prinzipiell Methoden unterschieden werden, bei denen spezifische Mutationen auf DNA-Ebene (p53, k-ras) nachgewiesen werden, von Methoden, bei denen der Nachweis von mRNA tumorassoziierter (CEA, SCCA) bzw. gewebsspezifischer Marker (Zytokeratine: z. B. CK-20) erfolgt. Ein großer Vorteil der PCR-Methode gegenüber der Immunzytochemie stellt dabei deren hohe Sensitivität dar, die durch hohe Amplifikationsraten gewährleistet wird. Durch die PCR ist es möglich RNA in sehr kleinen Mengen nachzuweisen (Brakenhoff et al., 1999). Ein Nachteil der PCR-Methode gegenüber der Immunhistochemie ist, dass man die isolierten Tumorzellen nicht morphologisch darstellen und so keine zytopathologischen Analysen an ihnen durchführen kann (Riethdorf et al., 2008). In Kapitel 2.6 dieser Arbeit wird die Methode der **nested RT-PCR** näher erläutert. Leider hat sich bisher jedoch noch keine einheitliche PCR-Methode zum Nachweis von DTC/ CTC durchgesetzt und in den unterschiedlichen meist monozentrischen Studien werden viele verschiedene methodische Ansätze verwendet (Bidard et al., 2012).

Viele Arbeitsgruppen verwenden zur Detektion von isolierten Tumorzellen **immunzytochemische Methoden**. Dabei unterscheidet man direkte von indirekten Methoden. Bei der direkten Methode werden spezifische Gewebsantigene detektiert, indem sie mit Antikörpern markiert werden, welche mit einem Fluorochrom oder Enzym gekoppelt sind. Bei der indirekten Methode wird ein mit Fluorochrom oder Enzym markierter Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet, verwendet. Bereits Ende der achtziger Jahre wies Schlimok (Schlimok et al., 1987) mit dem monoklonalen Zytokeratin-Antikörper CK-2, der gegen CK-18 gerichtet ist, epitheliale Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit Kolorektal- und Mammakarzinom nach. Durch die Immunhistochemie ist es möglich, bestimmte Marker sichtbar in der Zelle (und damit die CTC/ DTC) darzustellen (Vorteil gegenüber der PCR). Es muss jedoch auch erwähnt werden, dass die Auswertung der Immunhistochemie sehr zeitaufwändig und schwer maschinell durchführbar ist. Für die Auswertung der Färbungen ist Expertenwissen erforderlich und sie ist nur sehr schwierig zu standardisieren (Bidard et al., 2012). Es sollte ein standardisiertes System zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen durch einen Experten-Konsensus festgelegt werden. Einen Versuch diese Probleme zu lösen stellt unter anderem das Cell-Search System dar,

ein standardisiertes halbautomatisiertes Zellanreicherungs- und Zellerkennungssystem. Es ist das einzige validierte System, welches von der FDA zur Diagnostik bei Brustkrebspatientinnen, Prostatakarzinompatienten und Patienten mit Kolorektalem Karzinom zugelassen ist (Van de Stolpe et al., 2011). Das Cell-Search-System arbeitet mit einer Erkennung und Anreicherung der CTC über EpCam, einem anschließenden Fixieren und Färben der Tumorzellen sowie einer manuellen Auszählung der Zellen (Van de Stolpe et al., 2011). Weiterhin erleichtert die Anwendung automatischer Zellerkennungssysteme, wie zum Beispiel des ACIS („automated cellular image analysis system“, ChromaVision Medical Systems/Zeiss, Oberkochen) die Auswertung der Ergebnisse der Färbungen (Borgen et al., 2001). Einen großen Nachteil dieser Systeme inklusive des Cell-Search-Systems stellen jedoch die hohen Kosten dar, die eine Anwendung in der klinischen Routinediagnostik erschweren.

Man geht davon aus, dass auch durch die Vielzahl der heute möglichen Methoden nicht alle CTC entdeckt werden, da es auch Tumorzellen gibt, die z. B. keine Zytokeratine exprimieren und/oder weil Tumorzellen bei den Analyseschritten zerstört werden oder verloren gehen (Van de Stolpe et al., 2011). Es ist also sehr wichtig zu realisieren, dass es zum heutigen Zeitpunkt noch keinen Goldstandard zur Detektion von CTC/DTC gibt und es sehr unwahrscheinlich ist, dass mit einem Verfahren sämtliche vorhandene CTC/DTC entdeckt werden (Van de Stolpe et al., 2011).

### **1.3.3 Disseminierte/ Zirkulierende Tumorzellen im Blut und im Knochenmark**

In dieser Arbeit wurden sowohl Blutproben als auch Knochenmarkproben zur Detektion von Tumorzellen untersucht. Das Blut ist ein ideales Kompartiment für den Nachweis zirkulierender Tumorzellen, da es leicht und kostengünstig zugänglich ist und die Entnahme für den Patienten nur eine geringe Belastung darstellt. Das Knochenmark ist für diagnostische Zwecke durch eine Knochenmarkpunktion am Beckenkamm einfacher zu erreichen als andere Organe wie z. B. die Leber. Eine Knochenmarkpunktion ist jedoch keine Routinemaßnahme. Das Knochenmark würde sich somit nur bedingt für Screeningmethoden nach isolierten Tumorzellen eignen, da es mit einem relativ hohen Aufwand für Arzt und Patienten verbunden wäre. Im Zusammenhang mit einer chirurgischen Tumorresektion



kann das Knochenmark jedoch in Vollnarkose entnommen werden und könnte somit auch als zusätzlicher Stagingparameter dienen.

#### **1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit war es, Blut- und Knochenmarkproben von Patienten mit Ösophaguskarzinom auf das Vorhandensein von CTC und DTC zu untersuchen und deren Zusammenhang mit dem Überleben zu bestimmen. Zum Nachweis der isolierten Tumorzellen wurde eine spezifische nested CK-20 RT-PCR eingesetzt. Anschließend wurde der Zusammenhang der CTC und DTC mit dem Überleben der Patienten bestimmt. In dieser Arbeit wurde im Einzelnen der Frage nachgegangen, ob ein Zusammenhang besteht zwischen dem Gesamtüberleben, dem rezidivfreie Überleben und dem tumorspezifischen Überleben und dem Nachweis von CK-20 im Blut bzw. im Knochenmark bei Patienten mit Ösophaguskarzinom.

Aus dieser Fragestellung ergeben sich folgende weitere Fragen, die mithilfe dieser Arbeit geklärt werden sollen:

- Ist CK-20 ein geeigneter Marker zum Nachweis von Tumorzell dissemination bei Patienten mit Ösophaguskarzinom?
- Ist der CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark mit anderen klinischen Parametern z. B. UICC-Stadium, Geschlecht, etc. assoziiert?
- Ist das Vorhandensein von DTC / CTC ein unabhängiger prognostischer Faktor bei Patienten mit Ösophaguskarzinom?
- Sollte man den Nachweis von isolierten Tumorzellen bei Patienten mit Ösophaguskarzinom mit in die Stadieneinteilung aufnehmen und die Prognosebeurteilung danach richten?
- Sollten Patienten mit Ösophaguskarzinom, bei denen isolierte Tumorzellen nachgewiesen wurden, grundsätzlich anders therapiert werden?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Das Patientenkollektiv**

Zur Rekrutierung für diese retrospektive Studie wurden Patienten erfasst, die zwischen 1996 und 2006 in der Chirurgischen Klinik der Christian Albrechts Universität zu Kiel aufgrund eines Ösophaguskarzinoms operiert worden sind. Der Rekrutierungszeitraum umfasst den Zeitraum von Mai 1996 bis Mai 2006. Der mediane Nachbeobachtungszeitraum beträgt 89 Monate (95% Konfidenzintervall: 81- 98). Insgesamt besteht das dieser Arbeit zugrundeliegende Patientenkollektiv aus 77 Patienten. Eingeschlossen wurden alle Patienten mit Ösophaguskarzinom, von denen eine ausreichende Menge RNA aus Blut- oder Knochenmarkproben isoliert wurde, um die CK-20-PCR durchführen zu können. Eine weitere Voraussetzung zum Einschluss in die Studie war, dass eine R0-Resektion erfolgt war (kein Residualtumor nach Operation). Ausgeschlossen wurden alle Patienten, bei denen es innerhalb des Studienzeitraumes zu einem „lost in follow up“ kam (1 Patient) sowie die Patienten, die perioperativ verstorben waren (3 Patienten). Als perioperativ verstorben wurden bis zu 4 Wochen post operationem gewertet. Weiterhin wurden 9 Patienten ausgeschlossen, bei denen nicht bekannt war, ob sie eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten. Von den Adenokarzinomen wurden lediglich die AEG-Typen I und II in die Studie eingeschlossen. Es ist dabei zu beachten, dass die Stadieneinteilung der Patienten des diese Arbeit betreffendem Kollektivs je nach Operationszeitpunkt noch nach früheren Einteilungen der AJCC-Stadien erfolgt ist. Patienten mit einem AEG III Tumor wurden in dieser Arbeit somit nicht betrachtet, da sie nach der damaligen Einteilung noch zu den Magenkarzinomen gerechnet wurden (siehe Kapitel 1.2.2).

Für die weitergehende Auswertung der klinischen Daten wurde außerdem ein Gesamtkollektiv (R0 bis R2) betrachtet, bei dem auch die Patienten mit Residualtumor sowie die Patienten, von denen nicht bekannt war, ob eine neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt wurden war, eingeschlossen wurden. Diese Daten sind zugunsten der Übersichtlichkeit und Fokussierung der Arbeit im Anhang aufgeführt.

## 2.2 Probengewinnung

Die Probengewinnung fand direkt vor der Operation des Primärtumors statt, als der Patient bereits narkotisiert war. Der Probenentnahme und anschließenden Studie liegt eine Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel zugrunde (Az. 110/99). Im Rahmen der Biobank-Routine in der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie am Universitätsklinikum Schleswig Holstein wurden standardmäßig Gewebe-, Blut und Knochenmarkproben von allen Patienten bei bzw. vor der Operation entnommen und asserviert.

Für die Blutprobe werden jedem Patienten 20 ml Blut aus einem zentralen Venenkatheter entnommen. Das Knochenmark wird jeweils am rechten Beckenkamm punktiert. In der Basalschicht der Epidermis befinden sich sogenannte *Merkelzellen*, dendritische Zellen mit neurosekretorischen Granula, die bekannterweise CK-20 exprimieren (Moll et al 1991). Um zu vermeiden, dass CK-20 positive Zellen aus der Epidermis der Haut in die Probe gelangen, wird daher zunächst ein kleiner Hautschnitt über der Entnahmestelle gesetzt. Im Anschluss daran wird mit einer *Jamshidi* Biopsienadel aus jeder Punktionsstelle unter streng aseptischen Bedingungen 10 ml Knochenmark entnommen. Sowohl die Blut- als auch die Knochenmarkproben werden in 5,5 ml Lithium-Heparin Monovetten von Sarstedt abgenommen. Für die Biobank wird routinemäßig im Institut für Pathologie Tumorgewebe sowie peritumorales nicht-neoplastisches Gewebe zugeschnitten und in Kryoröhrchen überführt. Diese werden dann in flüssigem Stickstoff gefroren und bei minus 80°C gelagert.

## 2.3 Kryotomschnitte der Gewebeproben

Die Gewebeproben (Tumorgewebe und peritumorales Gewebe) wurden mit einem Kryotom (Zeiss, Oberkochen) auf mikroskopische Objektträger geschnitten (Schnittstärke 5µm, 2 Schnitte pro Objektträger) und dann ohne Fixierung über Nacht luftgetrocknet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit einem Vakuumschweißgerät in Boxen eingeschweißt und bei minus 20 °C gelagert.

## 2.4 Ficoll-Dichtekissen-Zentrifugation von Blut- und Knochenmarkproben

In den folgenden Unterkapiteln werden zu Beginn jedes Kapitels jeweils die verwendeten Reagenzien gelistet.

### Ficoll Dichtekissen Zentrifugation

RPMI-1640 Medium

Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare)

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

### Zellzählung

Trypanblau Lösung 0,4%

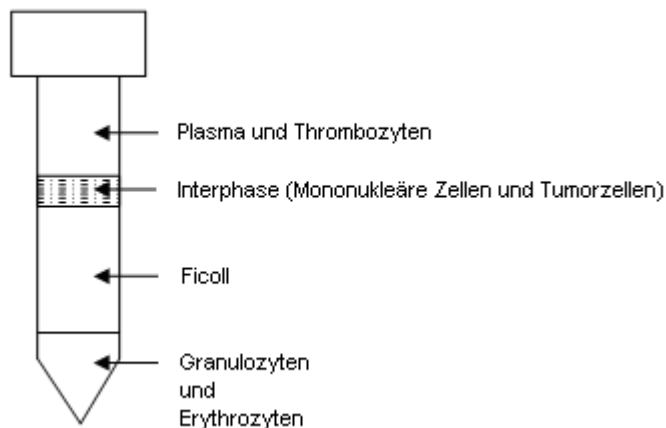
Alle Reagenzien, soweit nicht anders angegeben, stammen von Life Technologies, Darmstadt.

Als Zellanreicherungsmethode wurde vor der RNA-Isolierung die Ficoll-Dichtekissen Zentrifugation durchgeführt. Hierbei wird das Blut bzw. das Knochenmark durch die relative Dichte des Trennmediums Ficoll ( $\rho = 1,077 \text{ g/ml}$ ) durch Zentrifugieren entsprechend der Dichten der Blutbestandteile aufgetrennt.

Zunächst wurde dabei das mit Lithium-Heparin versetzte Blut bzw. Knochenmark mit RPMI-Medium (Zellkultur-Medium) in einem Verhältnis von 1:3 verdünnt. Dann wurde 15 ml Ficoll-Paque Plus in ein neues 50 ml Röhrchen gegeben und mit dem mit RPMI 1640 verdünnten Blut bzw. Knochenmark überschichtet. Als nächstes wurde das 50ml-Röhrchen bei 18 – 20 °C zentrifugiert ( $t = 40 \text{ min}$ ,  $400 \times g$ , 1530 Umdrehungen/Minute). Die Erythrozyten und Granulozyten werden dabei pelletiert, und das Plasma mit den Thrombozyten bildet den Überstand. Zwischen Trennmedium (Ficoll) und Plasma entsteht dabei eine Interphase, in der sich sowohl die mononukleären Zellen (Lymphozyten) des Blutes als auch eventuell vorhandene CTC befinden. Da mononukleäre Zellen mesenchymalen Ursprungs sind, exprimieren sie in der Regel kein CK-20. Von denen in der Interphase befindlichen Zellen exprimieren somit im Idealfall nur die Tumorzellen CK-20. Weiterhin ist bekannt, dass Granulozyten als Zellen mesenchymalen Ursprungs CK-20

exprimieren können (Jung et al., 1999). Da Granulozyten beim hier angewandten Trennverfahren pelletiert werden, ist die Ficoll-Dichtekissen Zentrifugation essentiell, um falsch positive Ergebnisse bei der PCR zu vermeiden.

Die dann folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, um eine Degradation der RNA zu vermeiden. Die Interphase kann man mit bloßem Auge erkennen und abpipettieren. Sie wurde dann in ein steriles 50 ml Röhrchen gegeben und mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) in einem Verhältnis von 1:2 verdünnt. Anschließend wurde die Suspension erneut zentrifugiert ( $t = 30\text{min}$ ,  $400g$ ,  $1410$  Umdrehungen/ Minute) und der Überstand wurde verworfen.



***Abb. 1: Schematische Darstellung der Phasen und Zellaufteilung nach der Ficoll-Dichtekissen-Zentrifugation***

Das Zellpellet wurde dann in 1-2 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl wurde bestimmt. Hierzu wurden  $10\ \mu\text{l}$  Zellsuspension mit  $90\ \mu\text{l}$  Trypanblau-Lösung (zum Ausschluss der toten Zellen) gut gevortext in ein  $1,5\ \text{ml}$  Röhrchen gegeben und anschließend auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Gezählt wurden die vier großen Eckquadrate und dann wurde anhand folgender Formel die Zellzahl ermittelt:

$$\frac{\text{Summe der 4 Eckquadrate} \times \text{Verdünnung} (10) \times 10^4}{4} = \text{Zellzahl / ml Zellsuspension.}$$

4

## 2.5 RNA- Isolierung

1 ml peqGOLDRNAPure™ (peqlab GmbH, Erlangen)	Isopropanol
0,2 ml Chloroform	Ethanol 70% (w/v)

Soweit nicht anders angegeben stammen die Reagenzien von Merck, Darmstadt.

Um die CK-20 RT-PCR durchführen zu können, muss zunächst aus den gewonnenen Interphasezellen RNA isoliert werden. Dazu wurden die erhaltenen zentrifugierten Interphasezellen mit 1ml peqGOLDRNAPure™ (1ml peqGOLDRNAPure™ je max  $10^7$  Zellen) resuspendiert und lysiert. Die Proben wurden dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und es wurde pro Probe 0,2 ml Chloroform hinzugegeben. Chloroform dient sowohl dazu, die organische (phenolhaltige) und wässrige (RNA-haltige) Phase zu trennen als auch dazu, die in der Probe enthaltenen Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert, wobei die RNA-haltige wässrige Phase sich nach oben und die organische Phase sich unten absetzt, weil sie schwerer als Wasser ist. Zwischen den beiden Phasen findet sich eine Interphase, bestehend aus denaturierten Proteinen. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und mit Isopropanol in einem Verhältnis von 1:2 versetzt. Dabei kommt es zur Ausfällung der RNA, die durch erneutes Zentrifugieren ( $t = 10 \text{ min}$ ,  $12000 \times g$ ) bei  $4^\circ\text{C}$  pelletiert wurde. Das Pellet wurde mit 70% igem Ethanol gewaschen und anschließend in RNase freiem Wasser gelöst. Die Proben werden bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Zur Überprüfung der RNA Qualität sowie Quantität wurde die RNA-Lösung anschließend im Bioanalyser 2100 (Agilent, Waldbronn) auf einem RNA nano Chip analysiert.

## 2.6 Durchführung der nested CK-20 RT-PCR

### 2.6.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode um bestimmte DNA-Abschnitte in vitro zu amplifizieren. Die Amplifizierung der DNA gelingt bei der PCR mithilfe einer DNA-Polymerase. Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten:

- 1) **Denaturierung:** Hierbei wird die zu amplifizierende doppelsträngige DNA durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen, die die DNA-Stränge verbinden, in Einzelstränge getrennt. Dies ist durch Erhitzen auf 94°C bis 96°C möglich.
- 2) **Primerhybridisierung:** Die Primer lagern sich an die ihnen komplementären DNA-Abschnitte an. Dies ist bei Einhalten einer Temperatur von ca. 55°C bis 65°C (abhängig vom Primer) möglich.
- 3) **Elongation:** Durch die DNA-Polymerase werden Nukleotide hinter den Primern aufgefüllt. Der Prozess beginnt an den 3'-Enden der angelagerten Primer und folgt dann dem DNA-Einzelstrang entsprechend der Basenpaarungsregeln.

Für die Durchführung der PCR benötigt man eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt als Matrize, zwei Primer (jeweils komplementär zu einem der beiden Doppelstränge), die die jeweiligen Startpunkte der Amplifikation festlegen, Deoxynukleosidtriphosphate als Bausteine der Amplifikationsprodukte,  $Mg^{2+}$ -Ionen für die Funktion der DNA-Polymerase und eine für die Taq-Polymerase geeignete Pufferlösung. Der PCR-Prozess besteht aus ca. 20–40 Zyklen. Dabei werden in jedem Zyklus auch die Produkte vorheriger Zyklen amplifiziert, so dass es im Idealfall zu einer Verdopplung der Amplifikationsprodukte je Zyklus und damit zu einer exponentiell ansteigenden Anzahl von Amplifikationsprodukten kommt.

## 2.6.2 cDNA Synthese

### cDNA Reaktionsansatz

2 µg denaturierte RNA (je nach Ansatz gelöst in ca.10 µl H<sub>2</sub>O)  
 4,0 µl Erst Strang Puffer  
 0,4 µl Dithiothreitol 0,1 M (DTT)  
 1,0 µl Super Script II (Reverse Transkriptase)  
 1,0 µl RNase Inhibitor  
 1,0 µl 50 µM Random Hexamer  
 1,0 µl 10 µM Desoxynukleotid Triphosphat (dNTP) Mix  
 ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Alle Reagenzien stammen von Life Technologies, Darmstadt.

Um die PCR durchführen zu können, muss zunächst aus der zuvor isolierten mRNA cDNA synthetisiert werden. Hierzu wurde die zuvor isolierte RNA für 10 Minuten bei 70°C dena-

turiert und dann sofort auf Eis gekühlt. Dann wurde der oben genannte Reaktionsansatz pipettiert. Für einen Kontrollansatz ohne RT wurde statt Super Script II zum selben Ansatz 1 µl Wasser hinzugegeben. Anschließend erfolgte im Thermocycler (Biometra, Göttingen) erst die Hybridisierung der Random Hexanukleotide (10 min bei 24°) und dann die Synthese der komplementären DNA (cDNA) (60 min bei 42°). Nach abgeschlossener cDNA-Synthese wurde die RT durch eine fünf minütige Inkubation bei 95° C inaktiviert.

### 2.6.3 CK-20 nested RT PCR

#### Tricine Puffer (Ponce und Micol, 1992)

300 mM Tricine pH 8,4  
20mM MgCl<sub>2</sub>  
50mM β-Mercaptoethanol  
0,1% Gelatine  
1% Thesit

Alle Reagenzien für den Tricine Puffer stammen von Sigma, Taufenkirchen.

#### Externer PCR Reaktionsansatz

2 µg cDNA (in ca. 20 µl Lösung)  
3,0 µl 10X Tricine Puffer  
1,0 µl 10 µM Deoxynukleotid Triphosphat Mix  
1,0 µl 20 µM CK-20-A sense Primer und CK-20-B antisense Primer (MWG-Biotech, Ebersberg)  
0,2 µl Taq-DNA-Polymerase  
ad 50 µl H<sub>2</sub>O

#### Interner PCR Reaktionsansatz

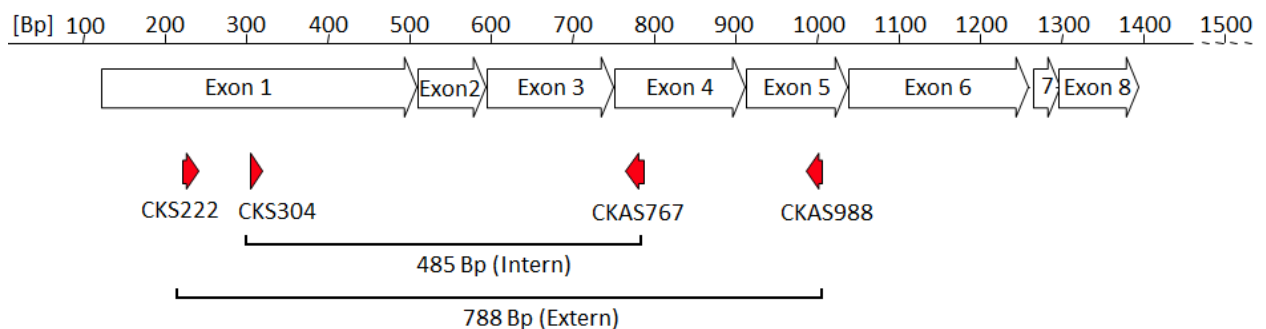
1,0 µl des Reaktionsproduktes der externen PCR  
4,9 µl 10x Tricine Puffer  
1,0 µl 10 µM Deoxynukleotid Triphosphat Mix  
1,0 µl 20 µM CK-20-C sense Primer und CK-20-D antisense Primer (MWG-Biotech)  
0,2 µl Taq-DNA-Polymerase  
ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Soweit nicht anders angegeben stammen alle Reagenzien für die PCR-Reaktionsansätze von Life Technologies.



Zum Nachweis der CK-20 mRNA wurde in der Arbeitsgruppe schon früher ein nested RT-PCR Ansatz entwickelt (Soeth et al 1996 und 1997). Diese Methode wurde auch in dieser Arbeit verwendet und wird im Folgenden genauer erläutert. Der Vorteil der nested-PCR gegenüber der Standard-PCR ist eine höhere Sensitivität und eine gesteigerte Spezifität, da weniger Nebenprodukte entstehen können. Dies konnte für die hier durchgeführte CK-20 PCR schon früher experimentell gezeigt werden (Soeth et al., 1996).

Als Referenz und methodische Kontrolle wurde eine PCR für Porphobilinogen Deaminase (**PBGD**) durchgeführt. PBGD kann als ein sogenanntes „housekeeping-Gen“ angesehen werden, d. h. es wird normalerweise in jeder Zelle konstant exprimiert. Das Protokoll für die PBGD-PCR wurde analog zur CK-20 PCR durchgeführt, wobei jedoch die Temperaturen für die Primerhybridisierung niedriger sind.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der nested CK-20 RT-PCR

**Rote Pfeile:** Position der Primer in der CK-20 mRNA für die interne und externe CK-20 PCR. **Bp:** Basenpaare.

Für die Durchführung der nested CK-20 RT-PCR und der PBGD PCR wurden folgende Primer verwendet:

**Tabelle 4:** Verwendete Primer für die CK-20- und PBGD-PCR (nach Soeth, 1997)

Name der Primer	PCR-Ansatz	Sequenzen der Sense und antisense Primer	Länge Amplikon (Bp)
<b>CKS222</b>	Extern	5'-GCGTTTATGGGGGTGCTGGAG-3'	788
<b>CKAS988</b>		5'- AAGGCTCTGGGAGGTGCGTCTC-3'	

<b>CKS304</b>	Intern	5'-CGGCGGGGACCTGTTTGT-3'	485
<b>CKAS767</b>		5'-CAGTGTTGCCAGATGCTTGTG-3'	
<b>PBGD sense</b>	Kontrolle	5'-CTTCACCATCGGAGCCATCTGC-3'	204
<b>PBGD antisense</b>		5'-CGAAGCCGGGTGTTGAGGTTT-3'	

Für die externe PCR wurde der oben genannte Ansatz (50 µl Ansatz) pipettiert. Dann wurde folgendes Protokoll durchgeführt: Zuerst wurde das aus 9 Zyklen bestehende Touch-down-Protokoll durchgeführt (Tabelle 5: Touch-down) gefolgt von 22 PCR Zyklen (Tabelle 5: Externe PCR). Touch-down beschreibt ein PCR-Verfahren, bei dem in den ersten 9 Zyklen in jedem Zyklus die Annealing Temperatur sukzessive um jeweils 1°C gesenkt wird und dann ab dem 10. Zyklus bei einer konstanten Temperatur von 61°C bestehen bleibt. Da bei einer hohen Annealing Temperatur weniger Nebenprodukte entstehen können, wird die PCR auf diese Art spezifischer. Für die interne PCR wurde der oben beschriebene Ansatz (50 µl Ansatz) pipettiert. Dann wurde erneut das in Tabelle 5 beschriebene Protokoll durchgeführt.

*Tabelle 5: Protokoll der nested CK-20 PCR*

Zyklus	Denaturierung	Primerhybridisierung	Elongation	nZyklen
<b>Touch-down-Zyklen</b>				
1	40 s/ 94°C	2 min/ 70°C		1
2	40 s/ 94°C	1 min 55 s/ 69°C		1
3	40 s/ 94°C	1 min 50 s/ 68°C (66°C)		1
4	40 s/ 94°C	1 min 45 s/ 67°C (65°C)		1
5	40 s/ 94°C	1 min 40 s/ 66°C (64°C)		1
6	40 s/ 94°C	1 min 35 s/ 65°C (63°C)		1
7	40 s/ 94°C	1 min 30 s/ 64°C (62°C)		1
8	40 s/ 94°C	1 min 25 s/ 63°C (61°C)		1
9	40 s/ 94°C	1 min 20 s/ 62°C (60°C)		1
<b>Externe und interne PCR</b>				
10 - 30	40 s/ 94°C	1 min/ 61°C (59°C)	1 min 30 s/ 72°C	21
31			15 min/ 72°C	1

*(Soeth et al 1996,1997.) Die Temperaturen in Klammern entsprechen den Temperaturen bei der PBGD-PCR*

Die PCR wurde im Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Von jeder Probe wurden mindestens zwei PCR-Durchläufe durchgeführt. Bei widersprüchlichen Ergebnissen wurden eine weitere PCR durchgeführt, nach der das Ergebnis festgelegt wurde.

#### 2.6.4 Agarosegel-Elektrophorese

Um die Amplifikate darzustellen zu können, wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Mit Hilfe dieser Technik werden DNA-Fragmente nach der Größe ihres Molekulargewichtes (MG) aufgetrennt. In wässrigen Puffern gelöste DNA ist aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen und wandert in einem elektrischen Feld zum Pluspol. Agarose bildet in Lösung und unter Erhitzen doppelhelikale Abschnitte aus. Nach Abkühlen der Lösung entsteht dann ein festes Gel. Die DNA-Fragmente trennen sich abhängig von der Porengröße des Agarosegels aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts. Die Agarosekonzentration muss dabei so gewählt werden, dass die DNA-Moleküle optimal aufgetrennt werden können. Kleine DNA-Bestandteile wandern bei der Agarose-Gelelektrophorese schneller im Gel als große. Die Laufstrecke ist dabei linear zum Logarithmus der Molekularmasse. Die Ergebnisse können anschließend mit DNA-Bestandteilen bekannter Fragmentgröße verglichen werden.

<u>Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)</u>	<u>Beladungs-Mix</u>
---	----------------------

40mM Tris-Acetat pH 8,0 1mM EDTA-Na2	10 x blue juice gel loading buffer (Life Technologies)
---	--

0,5 µg/ ml Ethidiumbromid (Endkonzentration)
--

2 g Agarose (Life Technologies)
---------------------------------

Alle Reagenzien soweit nicht anders angegeben stammen von von Merck, Darmstadt.

Für die Herstellung des 2% Agarosegels wurden 2 g Agarose in 100 ml TAE- Puffer bei 100 °C gelöst. Das Gel wurde im Folgenden auf 55 °C abgekühlt und dann wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben, welches als Farbstoff dient. Anschließend wurde das Gel in eine Laufkammer gegeben. Als nächstes wurde ein Plexiglasprobenkamm in einem

Ende des Gels positioniert bis das Gel abgekühlt und fest war. Bei Entfernung des Kammes entstanden auf diese Weise Taschen im Gel, in welche die einzelnen Proben aufgetragen werden konnten.

Es wurden jeweils 10 µl des PCR Reaktionsproduktes mit 2 µl Beladungsmix vermischt und in die Geltaschen einpipettiert. Die Elektrophorese wurde dann in einer Elektrophoresekammer (Biorad) für 40 min mit 90 V konstanter Spannung durchgeführt. Anschließend wurde das Ergebnis unter UV-Licht visualisiert und fotodokumentiert. Zur Kontrolle der Größe der einzelnen cDNA-Fragmente wurde der Molekulargewichtsmarker Nr. VIII (Roche, Mannheim) verwendet.

Das CK-20-PCR Produkt wandert als 485 Basenpaar (bp) Fragment (Interne PCR) in der Elektrophorese. Das PBGD-PCR Produkt wandert als 204 bp Fragment in der Elektrophorese.

## **2.7 Immunhistochemischer Nachweis von CK 20 in Ösophaguskarzinom- sowie peritumoralem nicht-neoplastischem Gewebe**

Zur Bestätigung, dass CK-20 ein geeigneter Marker zum Nachweis von Ösophaguskarzinomzellen ist, wurden zunächst immunhistochemische Färbungen von Ösophaguskarzinom- sowie peritumoralen Ösophagusgewebeschnitten angefertigt.

Für diese Arbeit wurde die **APAAP-Methode** zum Nachweis von CK-20 auf Proteinebene bei Schnitten von Ösophaguskarzinom- und peritumoralem nicht-neoplastischem Gewebe verwendet. Bei dieser indirekten Nachweismethode wird ein Brückenantikörper verwendet, der den Primärantikörper mit einem Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase-Komplex verbindet. Dieser aus Antikörper und Enzym (Alkalische Phosphatase) bestehende Komplex ist gegen den Primärantikörper gerichtet. Die Intensität der Färbung und die Sensitivität bei der APAAP-Methode sind denen bei der einfachen direkten und der indirekten Nachweismethode deutlich überlegen, weil durch die Sandwich-Färbetechnik mehrere Enzymkomplexe an ein Antigenmolekül gebunden werden können und so die Signalstärke deutlich erhöht wird.

<u>Dako Kit 5000</u>
Dako REAL™ Link, Secondary antibody
Dako REAL™ APAAP Immunocomplex
Dako REAL™ Chromogen Red 1
Dako REAL™ Chromogen Red 2
Dako REAL™ Chromogen Red 3
Dako REAL™ Levamisole
Dako REAL™ AP Substrate Buffer

<u>Zusätzlich benötigte Reagenzien</u>
Dako REAL™ Waschpuffer S3006
Dako REAL™ Haemotoxylin

***Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen.***

<b>Spezifität / Klon</b>	<b>verwendete Verdünnung</b>	<b>Lieferfirma</b>
Maus-Anti-human CK-20 / Ks 20.10	1:10	Progen, Heidelberg
Anti-human pan-Zytokeratin K11	1:10	BioLogo, Kronshagen

Alle verwendeten Reagenzien (außer Primärantikörper) stammen von Dako, Hamburg. Bevor die Gewebeschnitte angefärbt wurden, wurde die Spezifität und Qualität der Färbungen mit Zelllinien, die auf Objektträgern gewachsen waren, ausgetestet durch Verdünnungsreihen mit Antikörpern; die verwendete Zelllinien waren: WiDr (Kolonkarzinom Zelllinie), A818-4 (Pankreaskarzinom) und Colo357 (Pankreaskarzinom). Diese Objektträger wurden freundlicherweise von Frau Bianca Zinke, Sektion für Molekulare Onkologie, UKSH Campus Kiel, zur Verfügung gestellt.

Vor der Immundetektion wurden die Kryotomschnitte zunächst 10 min bei Raumtemperatur Aceton fixiert. Für die immunhistochemischen Färbungen wurde der Dako Cytomation Autostainer (Dako, Hamburg) eingesetzt. Die zuvor angefertigten Kryotomschnitte (Kapitel 2.3) wurden mit dem APAAP-Kit Order-Nr. K5000 (Dako) nach dem unten beschriebenen Protokoll angefärbt. Auf dem Computer wurden die Position der zu färbenden Ge-

webe, die Anordnung der Objektträger und das Volumen der eingesetzten Reagenzien geprüft und ggf. neu angepasst. Die Reagenzien wurden im dafür vorgesehenen Gestell nach Protokoll angeordnet.

Der Autostainer wurde nach folgendem Protokoll programmiert: Zuerst wurde der Primärantikörper (siehe Tabelle 6) bzw. Negativ- oder Positivkontrolle aufgetragen und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurde der Sekundäre Antikörper (Dako Real™ Link secondary antibody) aufgetragen und 30 min inkubiert. Dann folgte das Auftragen des Tertiären Antikörpers (Dako REAL™ APAAP Immunocomplex) mit einer Inkubationszeit von 30 min.. Als folgender Schritt wurde die APAAP-Reaktion mit Neufuchsin angefärbt. Dazu wurden Chromogen 1 bis 3 sowie der Substrate Buffer zunächst nach dem im Kit beschriebenen Protokoll vermischt und dann 10 min. inkubiert. Die endogene Alkalische Phosphatase wurde dabei durch die zusätzliche Zugabe von Levamisol geblockt. Dann erfolgte die sogenannte Gegenfärbung, um die Zellkerne blau zu färben. Hierzu wurde Dako REAL™ Haemotoxylin aufgetragen und 3 min. inkubiert. Zwischen jedem Schritt erfolgte jeweils das Auftragen de Dako Waschpuffers. Dieser Schritt dient dazu überschüssige ungebundene Antikörper zu entfernen.

Die verwendeten primären Antikörper für die Immunhistochemischen Färbungen der Gewebeproben waren die in Tabelle 6 genannten gegen CK-20 bzw. multiple Keratine (KL1) gerichteten monoklonalen Maus-anti-Human Antikörper.

Als Positivkontrolle diente der Pan-Zytokeratin-Antikörper KL1, als Negativkontrolle wurden die Schnitte mit 1% Rinderserumalbumin in PBS inkubiert. (PBS am Anfang des Kapitels in die Liste der Lösungen, wie bei 2.4). Zum Fotografieren der Präparate wurde ein Zeiss-Mikroskop (Axioskop 40) mit aufschraubbarer Digitalkamera (AxioCamMRc, Zeiss) verwendet.

## 2.8 Statistische Auswertung der Daten

### 2.8.1 Praktische Durchführung der Datenanalysen

Die klinischen Daten der in der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie am UKSH operierten Ösophaguskarzinom-Patienten wurden fortlaufend durch Mitarbeiter der Klinik erhoben und in eine klinische Datenbank eingepflegt. Die letzte für diese Arbeit relevante Patientennachsorge fand im November 2010 statt. Folgende Parameter wurden für die Studie eruiert:

- Geschlecht, Alter,
- TNM-Kategorie und Grading sowie UICC-Stadium
- Operations-Datum, Todesdatum sowie letztes Nachsorge-Datum und Rezidivdaten (für Lokalrezidive und Fernmetastasen getrennt)
- neoadjuvante Therapie
- Histologie des Tumors
- Operations-Radikalität
- Todesursache (für die Berechnung des tumorspezifischen Überlebens)
- Daten zu den PCR-Analysen aus Blut und Knochenmark aus den Ergebnissen der CK-20 PCR Analysen zum Nachweis von disseminierten und zirkulierenden Tumorzellen

Die Überlebenszeiten in Monaten wurden beginnend ab dem Zeitpunkt der Operation berechnet. Für die Berechnung des Gesamtüberlebens ging die Nachbeobachtungszeit aller Patienten, die zum Zeitpunkt der letzten Nachsorge noch lebten oder zwischenzeitlich für die Nachsorge verloren gegangen waren, als zensierte Beobachtung in die Berechnung ein. Für die Berechnung des tumorspezifischen Überlebens wurde die Beobachtungszeit aller Patienten ohne Todesdatum und aller Patienten, die nicht am Tumor verstorben waren, als zensierte Beobachtung gewertet. Für die Berechnung des rezidivfreien Überlebens wurde nur die Nachbeobachtungszeit der Patienten als zensierte Beobachtung gewertet, von denen weder ein Rezidiv-Datum noch ein Todesdatum bekannt war.

Zum Vergleich der Überlebenskurven wurde der Log-rank Test (Mantel 1966, Peto 1972) angewandt. Als Signifikanzniveau gilt in dieser Arbeit ein p-Wert von  $\alpha = 0,05$ . Multivari-

ate Analysen wurden anhand des Proportionalen Hazardmodells von Cox (Cox Regressionsmodell) (Cox 1972) berechnet. Es wurden nur Variablen für die multivariate Analyse herangezogen, die bei der univariaten Analyse (log-rank-test) eine signifikante Wirkung auf das Überleben hatten. Sämtliche statistische Tests wurden mit dem Programm SPSS ® 11.5 für Windows durchgeführt.

## 2.8.2 Theoretischer Hintergrund der Datenanalysen

Die *Kaplan-Meier-Überlebensanalyse* (Kaplan und Meier 1958) zielt auf eine Berechnung der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeiten des Gesamtkollektivs zu jedem Zeitpunkt der Studie. Zensierte Patienten werden bei der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse nur bis zum letzten Nachsorgedatum als überlebend gerechnet und dann nicht mehr in den folgenden Rechnungen berücksichtigt.

Der *Log-Rank-Test* vergleicht die beobachteten Sterbehäufigkeiten ( $X$ ) mit den erwarteten Sterbehäufigkeiten ( $\mu$ ) zu jedem Zeitpunkt. Wäre die Nullhypothese richtig (bei Annahme der Nullhypothese geht man davon aus, dass in den beiden Gruppen die Überlebenswahrscheinlichkeiten etwa gleich hoch sind und evtl. Unterschiede im Überleben auf zufälligen Schwankungen beruhen), würden die Todesfälle in zufälliger Reihenfolge unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit auftreten (dies entspräche dann den erwarteten Sterbehäufigkeiten). Wenn jedoch z. B. die CK-20 positive Gruppe in ihrer Überlebenszeit der CK-20 negativen unterlegen wäre, so würden die Todesfälle bei den Patienten dieser Gruppe früher auftreten. Es ergäbe sich dabei eine Abweichung zwischen den Todesfällen, die tatsächlich beobachtet werden, und denen, die bei zufälliger Reihenfolge der Todesfälle erwartet würden. Die Differenzen zwischen den beobachtet ( $X$ ) und erwarteten ( $\mu$ ) Todesfällen werden zu jedem Zeitpunkt aufsummiert und in Relation zum Erwartungswert ( $\mu$ ) gesetzt. Die resultierende Teststatistik ist unter der Nullhypothese annähernd **Chi-Quadrat** ( $\chi^2$ ) verteilt mit dem Freiheitsgrad 1.

$$\chi^2 = \frac{(X_1 - \mu_1)^2}{\mu_1} + \frac{(X_2 - \mu_2)^2}{\mu_2}$$

Da die  $\chi^2$ -Verteilung eine theoretische Verteilung ist, deren Eigenschaften bekannt sind, geben Statistikprogramme automatisch entsprechende p-Werte aus (wie das hier verwendete).



te SPSS 11.5). Dabei ist der  $p$ -Wert die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich die Daten wie beobachtet realisieren, falls in Wirklichkeit die Nullhypothese zutrifft. Ist er kleiner als das Signifikanzniveau wird die Nullhypothese verworfen und das Ergebnis (der Unterschied im Verlauf zweier Überlebenskurven) wird als statistisch signifikant bezeichnet.

Mit Hilfe des *Cox-Modells* lässt sich der Einfluss von verschiedenen Variablen auf eine Überlebenszeit untersuchen. Sinn von multiplen Modellen ist es, den Einfluss von verschiedenen Kovariablen auf andere Variablen zu korrigieren. Wie ist der Einfluss von einer Kovariablen auf das Überleben, wenn alle anderen Kovariablen konstant sind? Das hieße beispielsweise: Wie wirkt sich das Vorhandensein von CTC/ DTC auf das Überleben aus, wenn alle Patienten die gleiche T-Kategorie, N-Kategorie und M-Kategorie haben. Aus den Regressionskoeffizienten lassen sich adjustierte Hazard Ratios (HR) als Maß für die Stärke des Zusammenhangs berechnen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Das Patientenkollektiv

Wie in der Fragestellung formuliert, wird in dieser Arbeit der Zusammenhang von DTC- und CTC-Nachweis mit dem Überleben bei Patienten mit Ösophaguskarzinom untersucht. Hierzu wurden Blut- und Knochenmarkproben sowie Daten von Patienten mit Ösophaguskarzinom, die an der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des UKSH operiert wurden, analysiert. Im folgenden Kapitel wird das für diese Arbeit relevante Patientenkollektiv näher beschrieben:

**Das Patientenkollektiv R0** besteht aus 77 Patienten, deren Tumoren mit kurativer Intention (R0) reseziert wurden mit einem Altersmedian von 61 Jahren zum Operationszeitpunkt. Von den 77 Patienten sind 64 (83,1%) männlich und 13 (16,9%) weiblich.

Die histologische Tumorart verteilt sich wie in Tabelle 7 dargestellt.

*Tabelle 7: Verteilung der histologischen Tumorart beim Patientenkollektiv R0 (n=77)*

Tumorart	Häufigkeit absolut (in %)
Plattenepithelkarzinom	37 (48,1)
Adenokarzinom	39 (50,6)
Neuroendokriner Tumor	1 (1,3)

Die Verteilung der TNM-Klassifizierung und der UICC-Stadien stellt sich für das Patientenkollektiv R0 wie folgt dar:

*Tabelle 8: Verteilung der TNM-Klassifikation beim Patientenkollektiv R0 (n=77)*

	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>		34 (44,2%)	66 (85,7%)
<b>1</b>	18 (23,4%)	43 (55,8%)	10 (13%)
<b>2</b>	23 (29,9%)		
<b>3</b>	32 (41,5%)		
<b>4</b>	1 (1,3%)		
<b>X</b>	3 (3,9%)		1 (1,3%)

*Tabelle 9: Verteilung der UICC-Stadien beim Patientenkollektiv R0 (n=77)*

<b>Stadium</b>	<b>Häufigkeit absolut (in %)</b>
<b>I</b>	16 (20,8)
<b>II</b>	28 (36,3)
<b>III</b>	19 (24,7)
<b>IV</b>	10 (13)
<b>Unbekannt</b>	4 (5,2)

Beim Patientenkollektiv R0 verteilt sich der Differenzierungsgrad folgendermaßen:

*Tabelle 10: Verteilung des Differenzierungsgrades beim Patientenkollektiv R0(n=77)*

<b>Grade</b>	<b>Häufigkeit absolut (in %)</b>
<b>1</b>	5 (6,5)
<b>2</b>	37 (48,05)
<b>3</b>	32 (41,55)
<b>Unbekannt</b>	3 (3,9)

Als neoadjuvante Therapie hatten 32 (41,6%) der Patienten zuvor eine Chemotherapie erhalten, 45 (58,4%) der Patienten hatten keine Chemotherapie erhalten. Die beobachtete Rezidivhäufigkeit im vorliegenden Patientenkollektiv beträgt 46,75% im Beobachtungszeitraum. Das mediane Überleben in Patientenkollektiv R0 beträgt 26 Monate. Die 5-JÜR für das Patientenkollektiv R0 beträgt 33,23%.

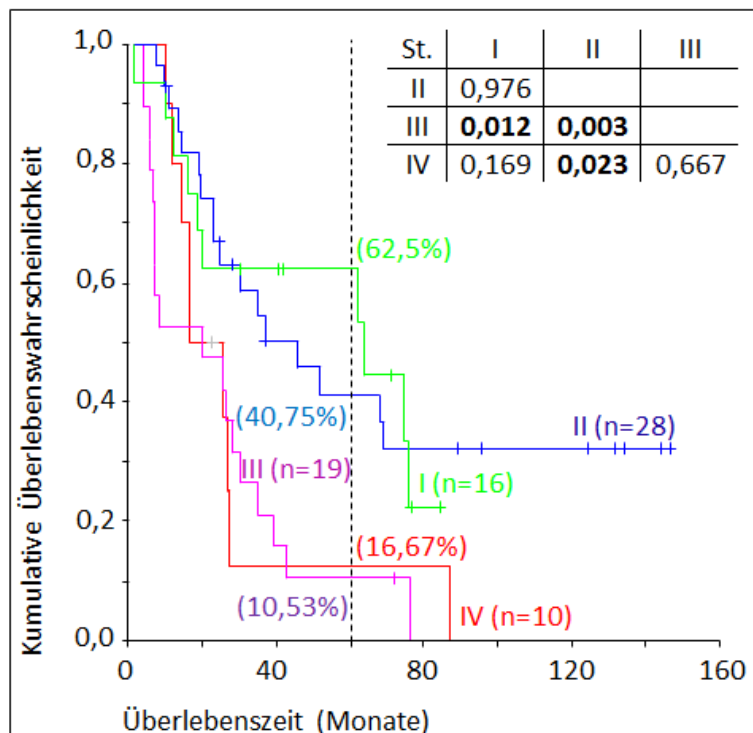
Das Patientenkollektiv R0 bis R2 wurde zur besseren Übersichtlichkeit der Arbeit in den Anhang verschoben, es dient insbesondere der Darstellung der eigentlichen klinischen Situation bei Patienten mit Ösophaguskarzinom, in welcher viele Patienten nicht R0-reseziert werden können.

## **3.2 Zusammenhang zwischen Überlebenswahrscheinlichkeiten und ausgewählten klinischen Daten**

### **3.2.1 Für das Patientenkollektiv R0**

Für das Patientenkollektiv R0 wurde der Einfluss ausgewählter klinischer Parameter auf das Überleben berechnet.

In Abbildung 3 ist der Einfluss des **UICC-Stadiums** auf das Überleben für das Patientenkollektiv R0 (n=77) dargestellt.



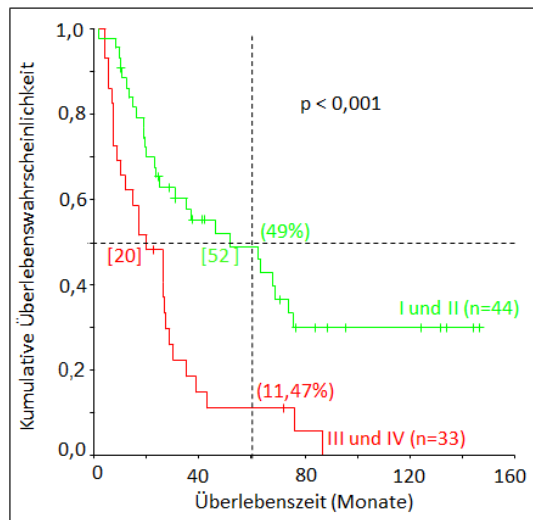
**Abb. 3:** Zusammenhang zwischen UICC-Stadium und Überleben für das Patientenkollektiv R0

An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5-JÜR in Klammern dargestellt. Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeiten der verschiedenen UICC-Stadien wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet und sind jeweils paarweise (Spalte: Zeile) für die verschiedenen Stadien in der Tabelle rechts oben angegeben. St.: UICC-Stadium.

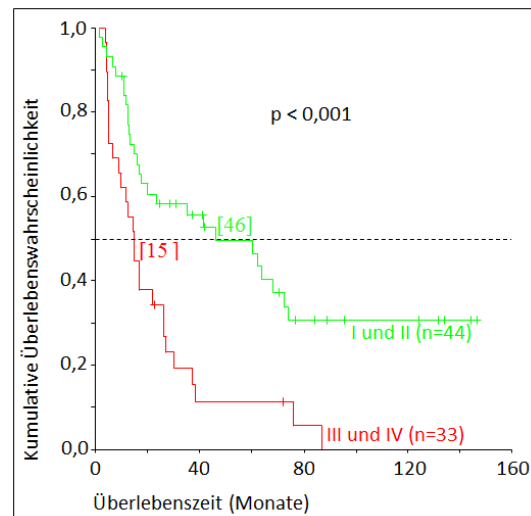
Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Überlebenswahrscheinlichkeiten zwischen Stadium I und III ( $p=0,012$ ), II und III ( $p=0,003$ ) und II und IV ( $p=0,023$ ). Es besteht offenbar jeweils kein signifikanter Unterschied der Überlebenswahrscheinlichkeiten zwischen Stadium I und II ( $p=0,976$ ) und III und IV ( $p=0,667$ ), und auch der Zusammenhang zwischen Stadium I und IV ( $p=0,169$ ) erwies sich trotz der deutlich unterschiedlichen Kurvenverläufe und 5-JÜR rechnerisch als nicht signifikant. Nach fünf Jahren leben noch 62,5% der Stadium I Patienten, 40,75% der Stadium II Patienten, 10,53% der Stadium III Patienten und 16,67% der Stadium IV Patienten.

Nachfolgend wurden die Überlebenszeiten zusätzlich für kombinierte frühe Stadien (Stadium I und II) und fortgeschrittene Stadien (Stadium III und IV) berechnet. In Abbildung 4 ist der Einfluss des UICC-Stadiums getrennt nach frühen Stadien (Stadium I und II) und späten Stadien (Stadium III und IV) auf das Überleben für das Patientenkollektiv R0 in Form von Kaplan-Meier Kurven dargestellt.

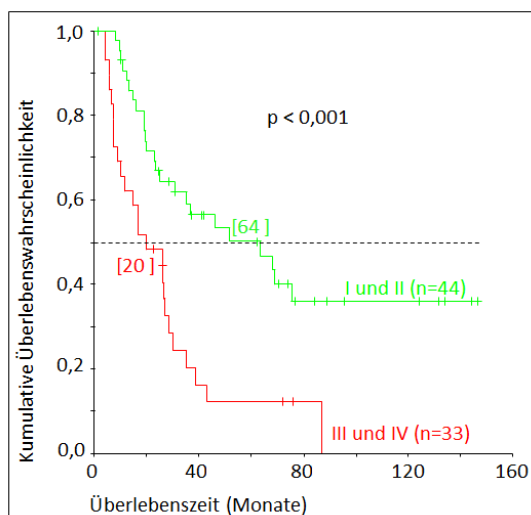
## a) Gesamtüberleben



## b) Rezidivfreies Überleben



## c) Tumorspezifisches Überleben



**Abb. 4:** Zusammenhang zwischen Stadiengruppe und Überleben für das Patientenkollektiv R0

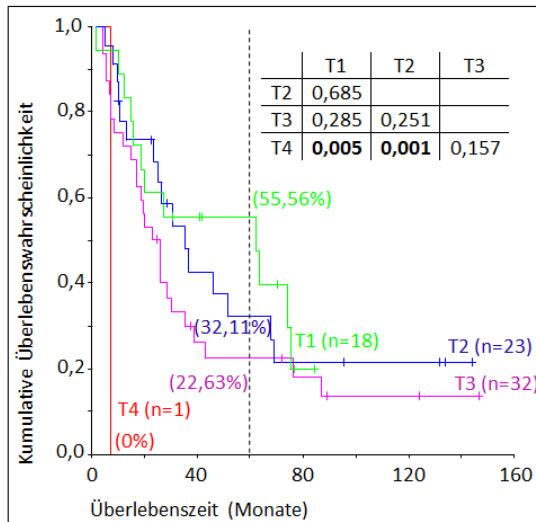
a) Gesamtüberleben b) rezidivfreies und c) tumorspezifisches Überleben. Die  $p$ -Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebendwahrscheinlichkeiten der beiden Gruppen wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5-JÜR in Klammern dargestellt (4a). An der horizontalen gestrichelten Linie bei der kumulativen Überlebendwahrscheinlichkeit von 0,5 ergibt sich das mediane Überleben und ist in Monaten in eckigen Klammern angegeben. I und II: UICC-Stadien I und II, III und IV: UICC-Stadien III und IV.

Patienten mit frühen UICC-Stadien haben ein signifikant längeres Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben und tumorspezifisches Überleben als Patienten mit späten Stadien (jeweils  $p < 0,001$ ). Dies zeigt sich auch in der 5-JÜR, die mit 49% für die Patienten mit

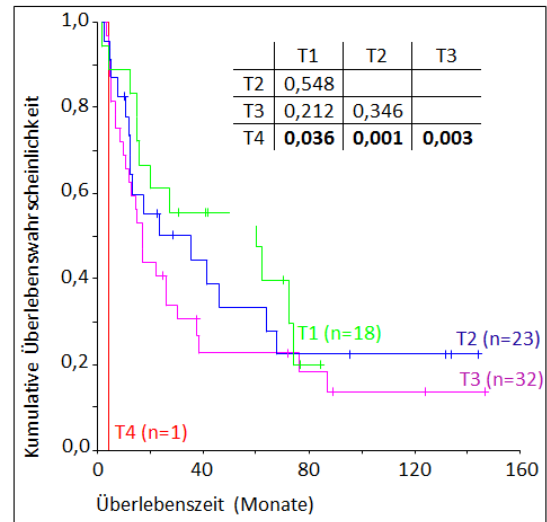
niedrigen UICC-Stadien deutlich oberhalb von Patienten mit hohen UICC-Stadien (11,47%) liegt. Das mediane Überleben für Patienten mit frühen Stadien beträgt 52 Monate beim Gesamtüberleben, 46 Monate beim rezidivfreien Überleben und 64 Monate beim tumorspezifischen Überleben. Bei Patienten mit späten Stadien beträgt es nur 20 Monate beim Gesamtüberleben und tumorspezifischen Überleben und 15 Monate beim rezidivfreien Überleben.

In Abbildung 5 ist der Einfluss der T-Kategorie auf das Überleben in Form von Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das Patientenkollektiv R0 graphisch dargestellt.

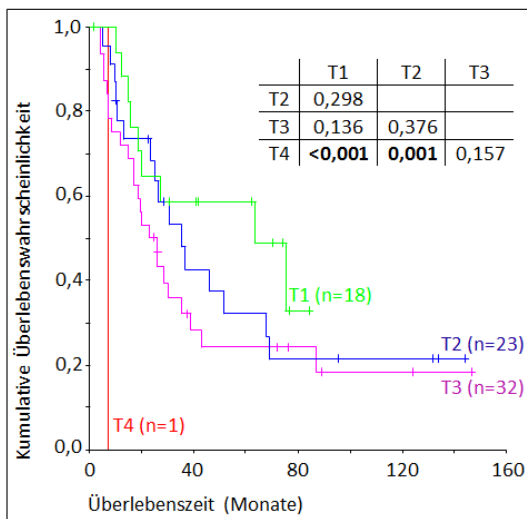
a) Gesamtüberleben



b) Rezidivfreies Überleben



c) Tumorspezifisches Überleben



**Abb. 5:** Zusammenhang zwischen T-Kategorie und Überleben für das Patientenkollektiv R0

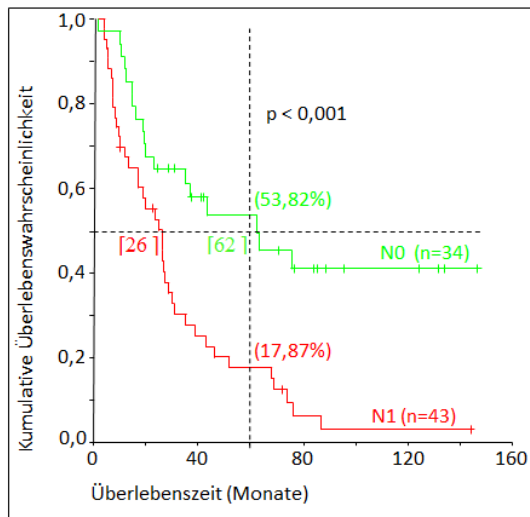
a) Gesamtüberleben, b) rezidivfreies Überleben und c) tumorspezifisches Überleben für das Patientenkollektiv R0. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5- JÜR in Klammern dargestellt (5a). Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeiten bei den verschiedenen T-Kategorien wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet und sind jeweils paarweise (Spalte: Zeile) für die verschiedenen T-Kategorien in der Tabelle rechts oben angegeben.



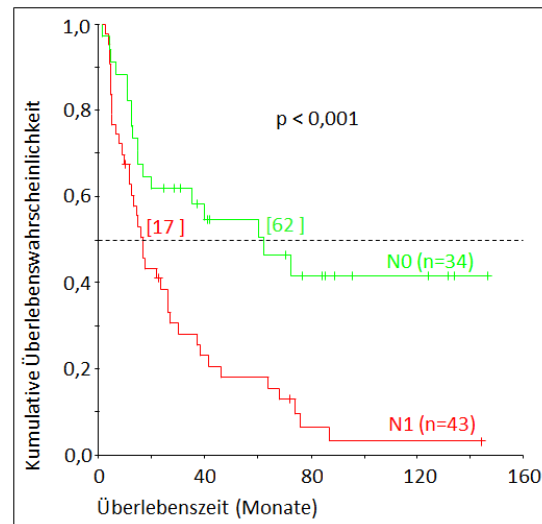
Beim Gesamtüberleben und tumorspezifischen Überleben zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Überlebenswahrscheinlichkeiten zwischen T1- und T4- Tumoren ( $p=0,005/ p<0,001$ ) sowie T2- und T4- Tumoren ( $p=0,001$ ). Beim rezidivfreien Überleben zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Überlebenswahrscheinlichkeiten zwischen T1- und T4-Tumoren ( $p=0,036$ ), T2- und T4-Tumoren ( $p=0,001$ ) und T3 und T4-Tumoren ( $p=0,001$ ). Die 5-JÜR ist mit steigender T-Kategorie abnehmend (T1: 55,56%, T2: 32,11%, T3: 22,63% und T4: 0%). Es ist jedoch sowohl für die 5-JÜR als auch für den Log-Rank-Test zu beachten, dass nur ein Patient mit T4-Tumor in die Rechnungen eingeflossen ist.

In Abbildung 6 ist der Einfluss der N-Kategorie auf das Überleben für das Patientenkollektiv R0 anhand von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

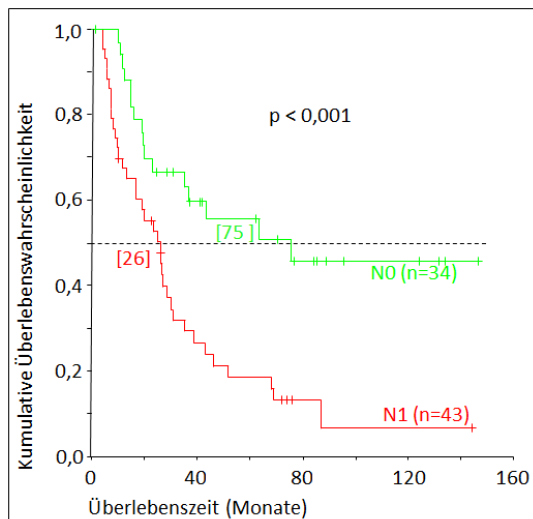
a) Gesamtüberleben



b) Rezidivfreies Überleben



c) Tumorspezifisches Überleben



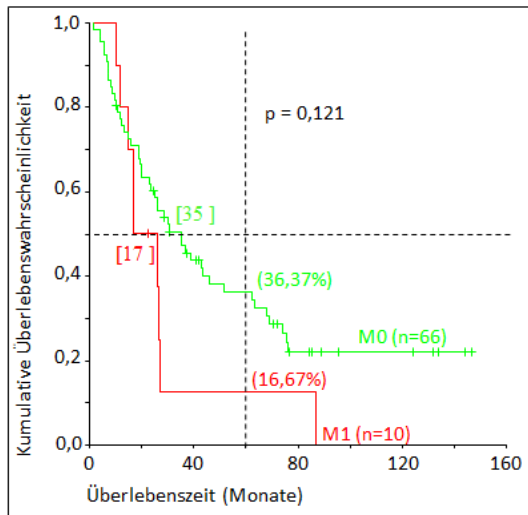
**Abb. 6:** Zusammenhang zwischen N-Kategorie und Überleben für das Patientenkollektiv R0

a) Gesamtüberleben, b) rezidivfreies Überleben und c) tumorspezifisches Überleben. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5- JÜR in Klammern dargestellt (6a). Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebendwahrscheinlichkeiten der beiden N-Kategorien wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet. An der horizontalen gestrichelten Linie bei der kumulativen Überlebendwahrscheinlichkeit von 0,5 ergibt sich das mediane Überleben und ist in Monaten in eckigen Klammern angegeben.

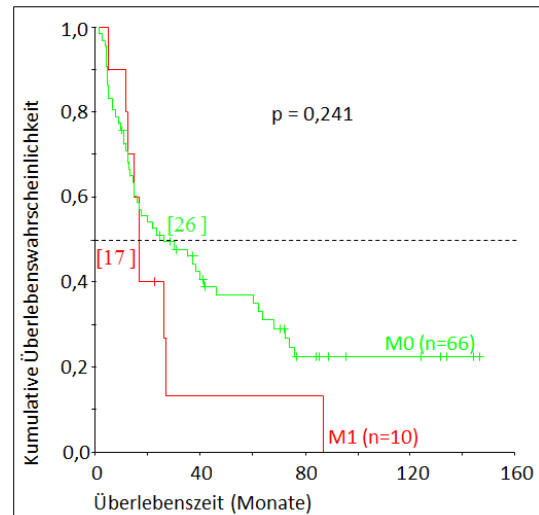
Es zeigt sich, dass Patienten ohne Lymphknotenmetastasen eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit haben für das Gesamtüberleben ( $p \leq 0,001$ ), das rezidivfreie Überleben ( $p \leq 0,001$ ) und das tumorspezifische Überleben ( $p \leq 0,001$ ). Auch die 5-JÜR ist mit 53,82% für die N0 Patienten deutlich höher als für die N1 Patienten (17,87%). Das mediane Überleben für die Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0) beträgt 62 Monate für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben und 75 Monate für das tumorspezifische Überleben. Das mediane Überleben für die Patienten mit Lymphknotenmetastasen (N1) beträgt 26 Monate beim Gesamtüberleben und tumorspezifischen Überleben und 17 Monate beim rezidivfreien Überleben.

In Abbildung 7 ist der Zusammenhang zwischen der M-Kategorie und dem Überleben für das Patientenkollektiv R0 in Form von einer Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

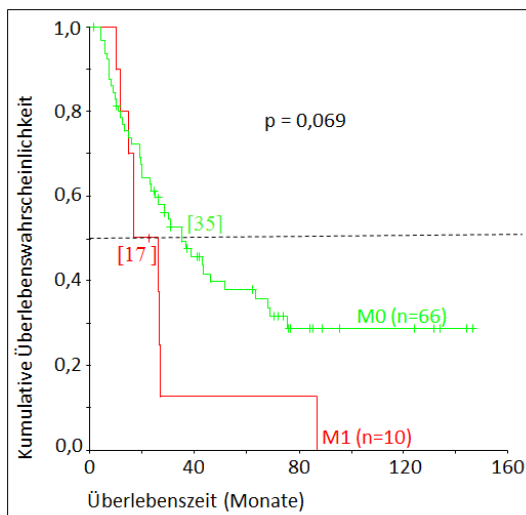
a) Gesamtüberleben



b) Rezidivfreies Überleben



c) Tumorspezifisches Überleben



**Abb. 7:** Zusammenhang zwischen M-Kategorie und Überleben für das Patientenkollektiv R0

a) Gesamtüberleben, b) rezidivfreies Überleben und c) tumorspezifisches Überleben. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5- JÜR in Klammern dargestellt (7a). Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebenschancen der beiden M-Kategorien wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet. An der horizontalen gestrichelten Linie bei der kumulativen Überlebenschance von 0,5 ergibt sich das mediane Überleben und ist in Monaten in eckigen Klammern angegeben.

Für das Patientenkollektiv R0 bis R2 (siehe Anhang) konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der M-Kategorie und dem Überleben nachgewiesen werden. Für das Patientenkollektiv R0 konnte dies jedoch nicht gezeigt werden (Gesamtüberleben:  $p=0,121$ , rezidivfreies Überleben:  $p=0,241$  und tumorspezifisches Überleben  $p=0,069$ ). Die 5-JÜR der Patienten ohne Fernmetastasen (M0) liegt mit 36,37% deutlich oberhalb der 5-JÜR der Patienten mit Fernmetastasen (M1), die 16,67% beträgt. Nach 35 Monaten ist die Hälfte dieser Patientengruppe verstorben (auch tumorspezifisches Überleben), nach 26 Monate ist die Hälfte der Patienten ohne Fernmetastasen verstorben oder an einem Rezidiv erkrankt. In der Gruppe der M1 Patienten beträgt das mediane Überleben 17 Monate für das Gesamtüberleben, das rezidivfreie Überleben und das tumorspezifische Überleben.

### 3.2.2 Zusammenfassung: Zusammenhang zwischen Überlebenschancen und ausgewählten klinischen Daten für das Patientenkollektiv R0

In Tabelle 11 ist der Zusammenhang zwischen Überlebenschancen und einigen klinischen Parametern für das Patientenkollektiv R0 dargestellt. Die p-Werte sind dabei jeweils mit dem Log-Rank-Test berechnet worden. Signifikante p-Werte sind dabei gelb hinterlegt und werden im Kapitel 3.5 zur Durchführung der Multivariaten Analysen herangezogen.

*Tabelle 11: Assoziation zwischen Überlebenschancen und ausgewählten klinischen Parametern*

Variable	Gesamtüberleben (p-Wert)	Rezidivfreies Überleben (p-Wert)	Tumorspezifisches Überleben (p-Wert)
Geschlecht	0,655	0,62	0,697
Alter	0,658	0,676	0,475
Histologie	0,808	0,847	0,977
N-Kategorie	< 0,001	< 0,001	< 0,001
M-Kategorie	0,121	0,241	0,069
Grade	0,428	0,537	0,463
Stadiengruppe	< 0,001	< 0,001	< 0,001

### 3.3 Nachweis von CK-20

#### 3.3.1 Immunhistochemischer Nachweis von CK-20 in Gewebeproben von Ösophaguskarzinom- und peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe des Ösophagus

Um zu untersuchen, ob CK-20 ein geeigneter Marker zum Nachweis von Ösophaguskarzinomzellen ist, wurden immunhistochemische Färbungen an Ösophaguskarzinomgewebe und peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe an Gewebeschnitte von 8 exemplarischen Patienten durchgeführt. In Tabelle 12 sind die klinischen Daten und die Ergebnisse der CK-20 RT-PCR im Blut und im Knochenmark dieser 8 repräsentativen Patienten dargestellt und in Tabelle 13 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbungen von Tumorgewebe und peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe für eben diese 8 Patienten dargestellt. Es muss dabei betont werden, dass nicht nur Proben von den gleichen Patienten wie für die PCR-Analysen herangezogen worden sind, so dass auch Proben von Patienten mit AEG-Typ III dabei sind. Proben von Ösophagusnormalgewebe stehen unserem Labor nicht zur Untersuchung zur Verfügung.

**Tabelle 12: Klinische Daten von 8 exemplarischen Patienten, bei denen immunhistochemische Färbungen durchgeführt wurden**

P. Nr.	Histologie	UICC-Stadium	Grade	G	CK-20 Blut	CK-20 KM
1	Adenokarzinom AEG III	IV	3	m	positiv	positiv
2	Adenokarzinom	III	3	w	positiv	positiv
3	Plattenepithelkarzinom	II	1	m	positiv	negativ
4	Adenokarzinom	IV	3	m	positiv	negativ
5	Plattenepithelkarzinom	II	2	w	negativ	negativ
6	Plattenepithelkarzinom	III	3	m	positiv	n. u.
7	Plattenepithelkarzinom.	III	3	w	n. u.	n. u.
8	Adenokarzinom AEG III	III	3	w	negativ	negativ

*P. Nr.: Patienten-Nr., G: Geschlecht, n.u.: Nicht untersucht*

**Tabelle 13: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von Tumorgewebe und peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe von 8 exemplarischen Patienten**

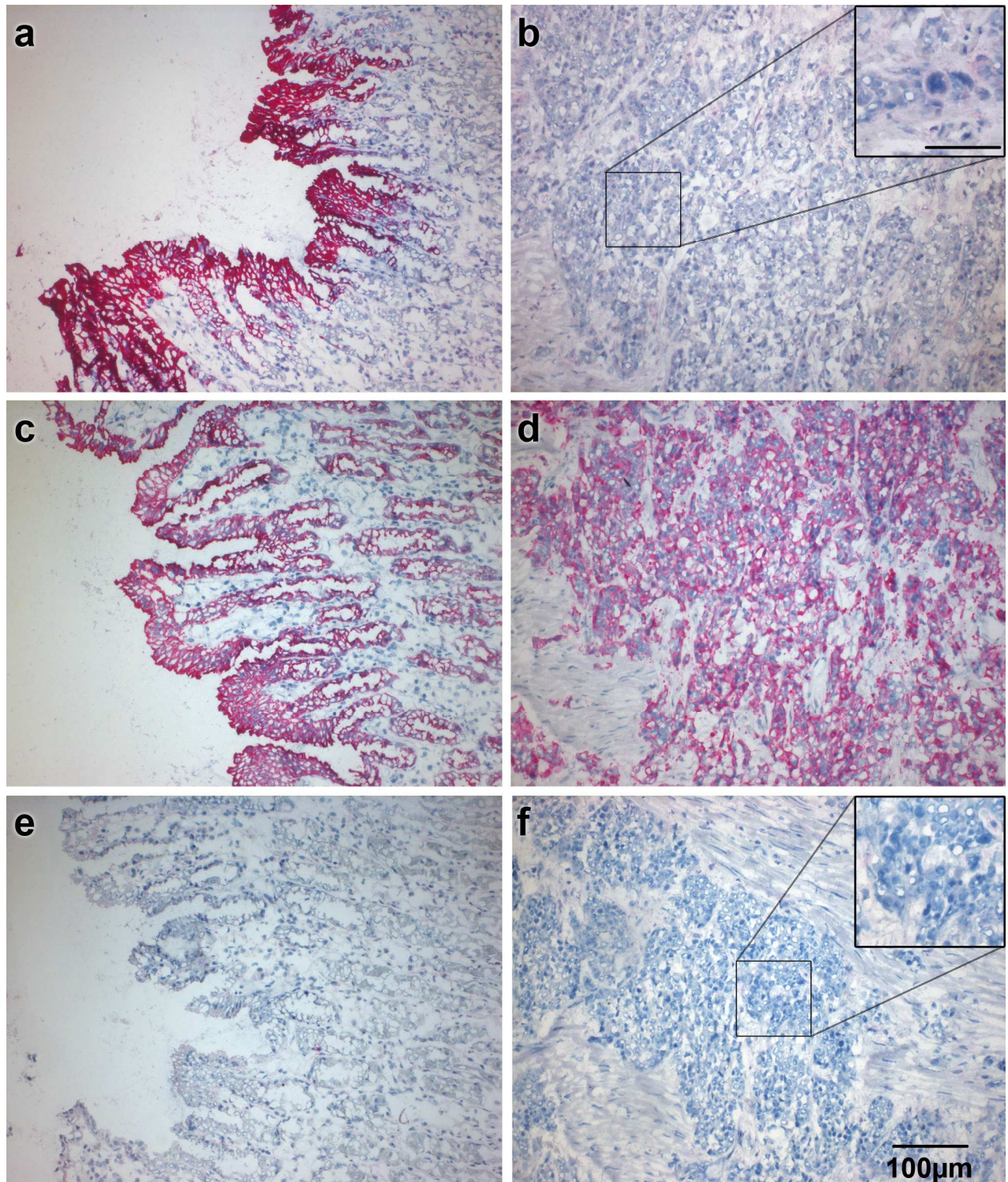
Verwendete Antikörper und Gewebeproben					
Patienten Nr.	CK-20.10 PT	CK-20.10 TG	KL1 (Positivkontrolle) TG / PT	Negativkontrolle TG/ PT	Bemerkungen
1	+++	+/-	++ / +++	-/ -	Die Färbung des PT ist noch intensiver mit CK-20.10 als mit KL1
2	+++	+	+++ / +++	-/ -	Mit CK-20.10 wurden im TG andere Zellen angefärbt als mit KL1
3	Kein Gewebe vorhanden	+	+++ /	-/ -	
4	+++	+	++ / ++	-/ -	Im PT mit CK-20.10 sehr inhomogene Anfärbung
5	+	+	++ / ++	-/ -	
6	-	+	+++ / ++	-/ -	
7	+	+	++ / +++	-/ -	
8	+++	+	+++ / ++	-/ -	

*PT: peritumorales nicht-neoplastisches Gewebe, TG: Tumorgewebe; +/-: sehr schwache Färbung, +: schwache Färbung, ++: mittlere Färbung, +++: starke Färbung, -: keine Färbung.*

Aus der Tabelle 13 geht hervor, dass in 6 (85,71%) von insgesamt 7 analysierten Schnitten von peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe ein Nachweis von CK-20 durch den Antikörper CK-20.10 gelang. Von diesen zeigte sich bei 4 von 6 sogar eine stark positive Färbung, während bei 2 Präparaten nur eine schwache Färbung nachweisbar war. Bei denjenigen 4 Fällen, bei denen ein stark positiver Nachweis im peritumoralen nicht-neoplastischen Gewebe gelang, handelt es sich um die 4 untersuchten Patienten mit Adenokarzinomen. Bei diesen zeigt sich jeweils eine Barrett-Metaplasie im peritumoralem nichtmalignen Gewebe. Für die Barrett-Schleimhaut des Ösophagus konnte schon früher gezeigt werden, dass sie eine starke Expression von CK-20 aufweist (Van Baal et al., 2008). Beim Tumorgewebe gelang bei 7 von 8 (87,5%) Gewebeschnitten ein Nachweis von CK-20, wobei jedoch in allen 7 Schnitten jeweils die Intensität der Färbung im Vergleich zur Positivkontrolle nur relativ schwach war. Differenziert nach der histologischen Tumorart zeigte sich bei 4 von 4 (100%) der Plattenepithelkarzinome und bei 3 von 4 (75%) der Adenokarzinome ein schwacher CK-20 Nachweis im Tumorgewebe.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen im Tumorgewebe und im peritumoralen nicht-neoplastischen Gewebe sowie die jeweiligen Positiv- und Negativkontrollen für den Patienten 1 dargestellt.



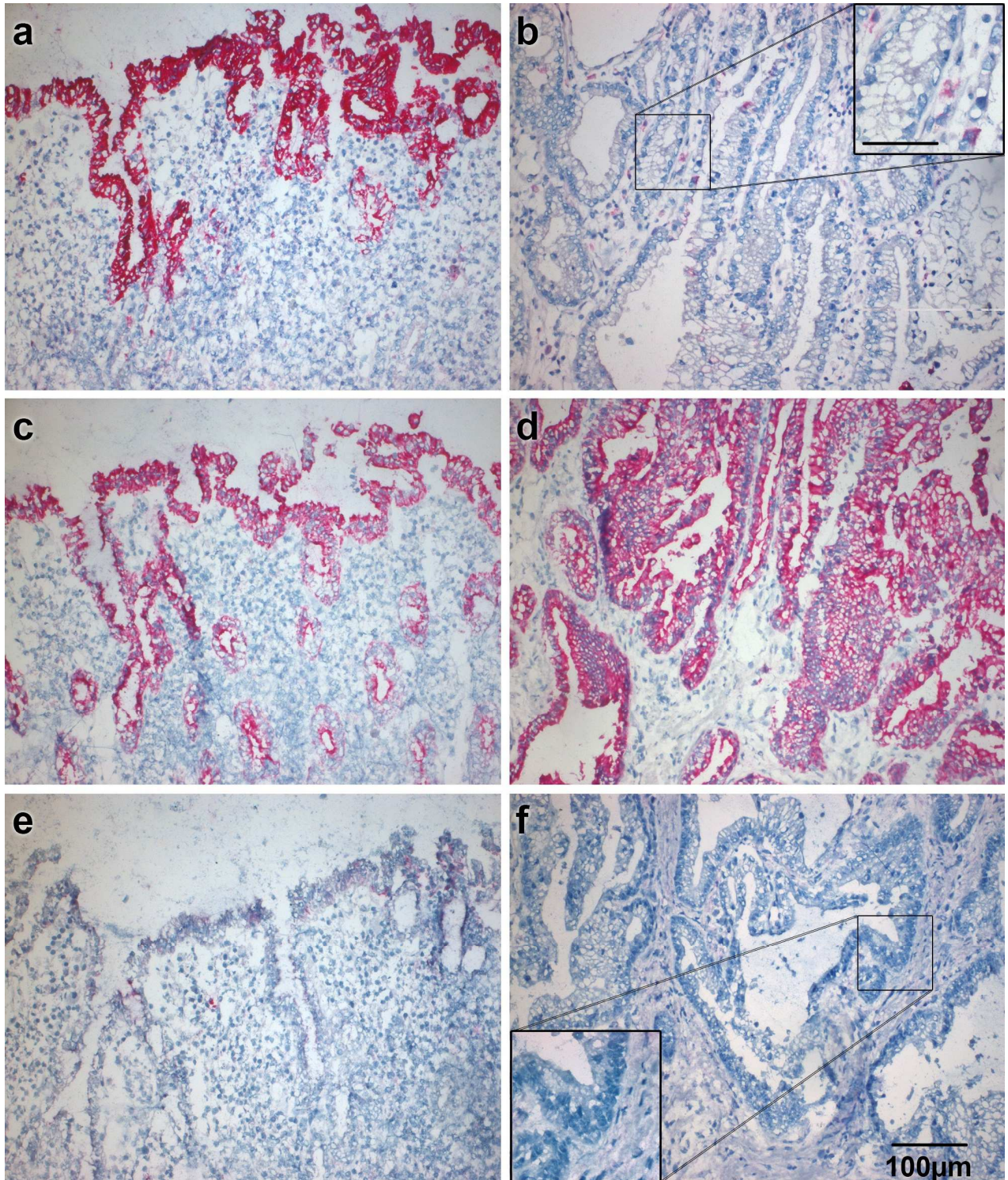


**Abb. 8:** Immunhistochemische Anfärbungen von peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe und Ösophaguskarzinomgewebe für den Patienten 1

*a:* Färbung von peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe mit dem CK-20 AK CK 20.10, *b:* Färbung von Tumorgewebe mit dem CK-20 AK CK 20.10, *c:* Färbung von peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe mit dem Panzytokeratin-AK KL1, *d:* Färbung von Tumorgewebe mit dem Panzytokeratin-AK KL1, *e:* Peritumorales nicht-neoplastisches Gewebe Negativkontrolle, *f:* Tumorgewebe Negativkontrolle. Der Maßstab für alle Abbildungen dargestellt in Abbildung f entspricht 100 µm, der Maßstab im Detailbild in Abbildung b entspricht 50 µm und gilt auch für f.

In Abbildung 8a ist die immunhistochemische Färbung vom peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe mit dem CK-20 Antikörper CK-20-10 dokumentiert. Es zeigt sich hier eine typische Barrett-Metaplasie des Ösophagus. Es zeigt sich eine sehr starke Reaktion (Rotfärbung der Epithelzellen), die verglichen mit der Positivkontrolle durch den Panzytokeratin Antikörper KL1 (dargestellt in Abb. 8c) sogar noch eine höhere Farbtintensität aufweist. In der Negativkontrolle des peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebes (Abb. 8 e) zeigt sich nur eine sehr marginale Rosafärbung. In Abbildung 8 b ist die immunhistochemische Färbung vom Tumorgewebe desselben Patienten (Patient 1) dargestellt, das als Adenokarzinom befundet wurde. Es zeigt sich hier eine schwache Rosafärbung, die tendenziell sowohl in der Übersichtsvergrößerung als auch im Detail etwas prominenter ist als in der Negativkontrolle (vergleiche Abb. 8 b und f). In der Positivkontrolle durch den Panzytokeratin Antikörper KL1 zeigt sich auch für das Tumorgewebe eine deutlich intensive Rotfärbung der Tumorzellnester (Abb. 8 d).

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen im Tumorgewebe und im peritumoralen nicht-neoplastischen Gewebe sowie die jeweiligen Positiv- und Negativkontrollen für den Patienten 2 dokumentiert.

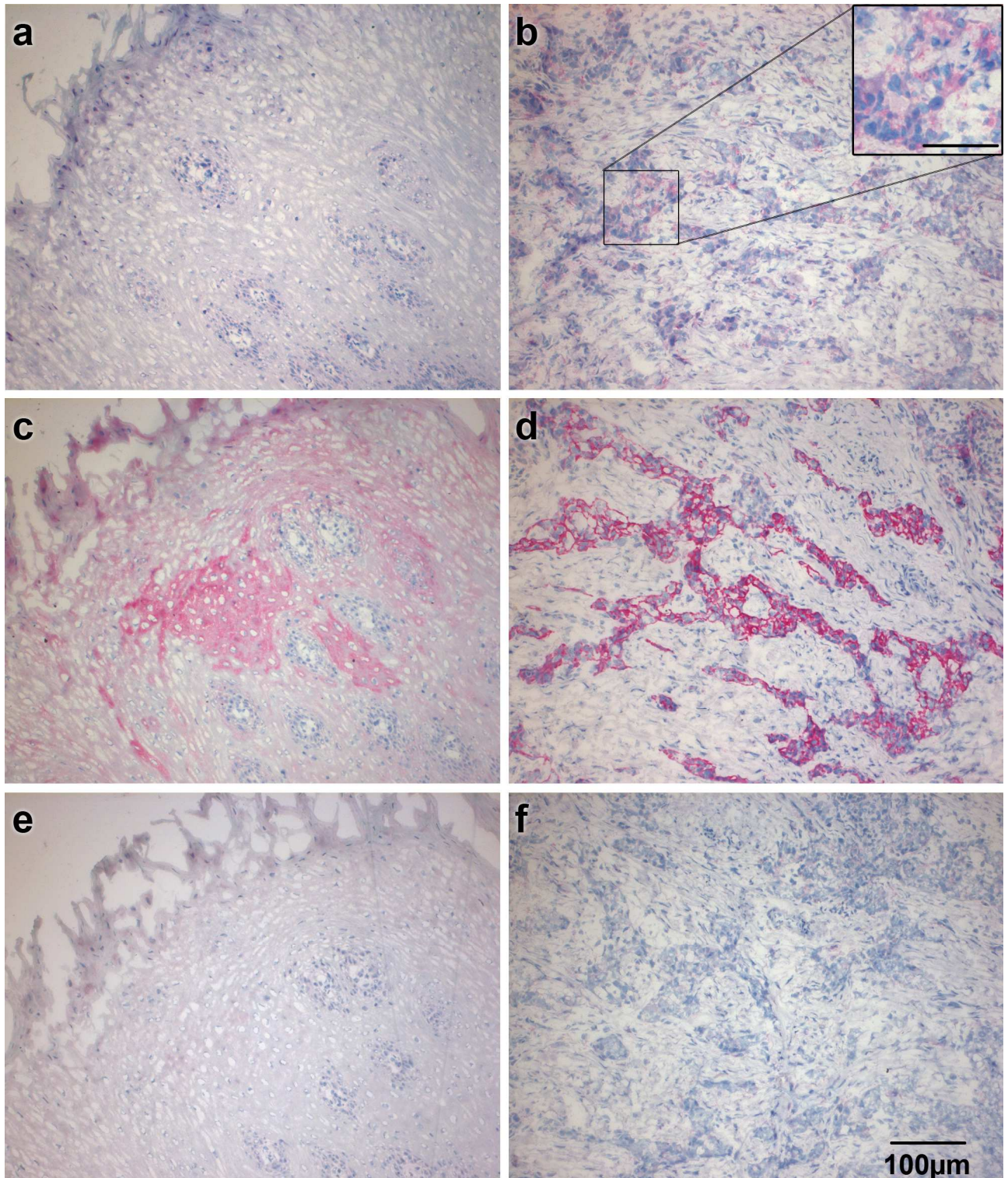


**Abb. 9:** Immunhistochemische Anfärbungen von peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe und Ösophaguskarzinomgewebe für den Patienten 2

*a:* Färbung von peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe mit dem CK-20 AK CK 20.10, *b:* Färbung von Tumorgewebe mit dem CK-20 AK CK 20.10, *c:* Färbung von peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe mit dem Panzytokeratin-AK KL1, *d:* Färbung von Tumorgewebe mit dem Panzytokeratin-AK KL1, *e:* Peritumorales nicht-neoplastisches Gewebe Negativkontrolle, *f:* Tumorgewebe Negativkontrolle. Der Maßstabsbalken für alle Abbildungen dargestellt in Abbildung f entspricht 100 µm, Maßstabsbalken im Detailbild in Abbildung b entspricht 50 µm. Dieser Maßstab gilt auch für das Detailbild in f.

Es zeigt sich auch hier wieder eine typische Barrett-Schleimhaut im peritumoralen nicht-malignen Gewebe mit einer sehr starken Färbung durch den CK-20 Antikörper CK-20.10 (Abb. 9 a). Wie schon für den Patienten 1 dokumentiert wurde, ist auch für den Patienten 2 die Farbintensität bei der Färbung des peritumoralen nicht-neoplastischen Gewebes durch den CK-20 Antikörper CK-20.10 höher als in der Positivkontrolle durch den Panzytokeratin Antikörper KL1 (Abb. 9 c). In der Negativkontrolle (Abb. 9 e) zeigt sich auch hier keine oder eine nur marginale Färbung des peritumoralen nicht-neoplastischen Gewebes. Im Tumorgewebe (es handelt sich auch hier um ein Adenokarzinom) wird beim Patienten 2 durch die CK-20 Immunhistochemie eine sehr schwache Färbung erreicht, die bei einzelnen Zellen aber auch deutlich ausgeprägt ist (vgl. Abb. 9 b Übersicht und Vergrößerung) und im Vergleich mit der Negativkontrolle für das Tumorgewebe (Abb. 9 f) eindeutig nachweisbar ist. Diese Reaktion wird als schwach positiv (+) gewertet. Die immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes durch den Panzytokeratin Antikörper KL1 zeigt auch für den Patienten 2 wieder deutlich rot gefärbte Tumorzellnester.

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von Tumorgewebe und peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe durch den CK-20 Antikörper CK-20.10 sowie die entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen für den Patienten 6 dargestellt.



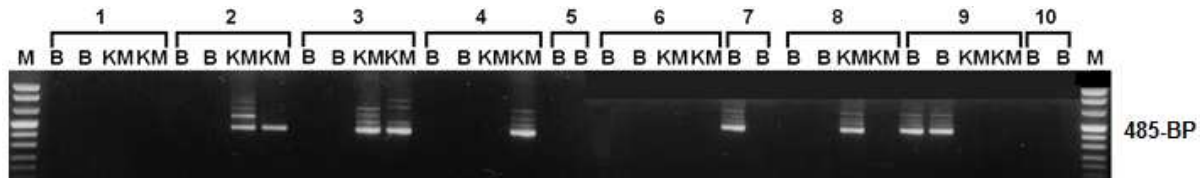
**Abb. 10:** Immunohistochemische Anfärbungen von peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe und Ösophaguskarzinomgewebe für den Patienten 6

*a:* Färbung von peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe mit dem CK-20 AK CK 20.10, *b:* Färbung von Tumorgewebe mit dem CK-20 AK CK 20.10 mit Detailvergrößerung, *c:* Färbung von peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe mit dem Panzytokeratin-AK KLI, *d:* Färbung von Tumorgewebe mit dem Panzytokeratin-AK KLI, *e:* Peritumorales nicht-neoplastischen Gewebe Negativkontrolle, *f:* Tumorgewebe Negativkontrolle. Der Maßstabbalken für alle Abbildungen dargestellt in Abbildung f entspricht 100 µm, Maßstabbalken im Detailbild in Abbildung b entspricht 50 µm.

Beim Patienten 6 gelang im peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebe kein Nachweis von CK-20 in der Immunhistochemie. Es zeigt sich hier kein Unterschied in der Färbung verglichen mit der Negativkontrolle (siehe Abb. 10 a und e). In der Positivkontrolle für das peritumorale nicht-neoplastische Gewebe (Abb. 10 c) zeigt sich hingegen eine mäßig starke Rotfärbung (++). Im korrespondierenden Tumorgewebe, das als Plattenepithelkarzinom befundet wurde, zeigt sich eine leichte bis mäßige Färbung einzelner Zellen und Zellverbände durch den CK-20 Antikörper (Abb. 10 b, Übersicht und Vergrößerung), die sich deutlich von der kaum nachweisbaren Färbung in der Negativkontrolle (Abb. 10 f) unterscheidet und somit als positiv gewertet wird. Der KL1 Antikörper in der Positivkontrolle zeigt beim Tumorgewebe auch hier wieder ein stark positives Ergebnis (Abb. 10 d).

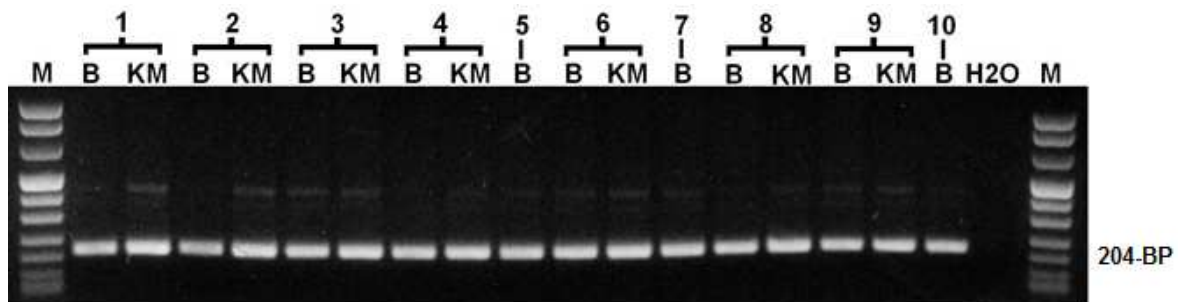
Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen durch den CK-20 Antikörper CK-20.10 können folgendermaßen zusammengefasst werden. Im peritumoralen nicht-neoplastischen Gewebe gelang in den meisten Fällen (6/7) ein Nachweis von CK-20, wobei die Färbung in den Präparaten, die eine Barrett-Metaplasie aufwiesen (4/6), als stark positiv gewertet wurde. Im Tumorgewebe konnte in 7 von 8 Schnitten CK-20 nachgewiesen werden, wobei hier die Intensität der Färbung jeweils nur als schwach gewertet wurde.

### 3.3.2 Ergebnisse der CK-20 RT-PCR



**Abb. 11:** Ergebnis der CK-20 RT-PCR und anschließender Elektrophorese repräsentativ für 10 Patienten

*M= Molekulargewichtsmarker, B= Blut, KM= Knochenmark, BP= Basenpaare, 1 bis 10 = Proben 1 bis 10, alle Proben wurden doppelt getestet; positive Banden für CK-20 ergaben sich für 2 KM, 3 KM, die zweite Probe für 4 KM, die erste Probe von 7 B, die erste Probe von 8 KM und für 9 B.*



**Abb. 12:** Ergebnisse der PBGD-PCR mit anschließender Elektrophorese repräsentativ für 10 Patienten

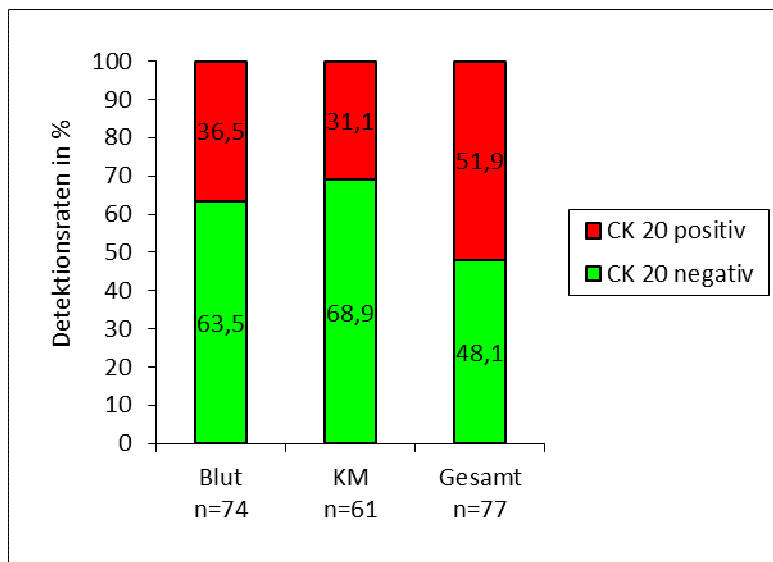
*M= Molekulargewichtsmarker, B= Blut, KM= Knochenmark, H<sub>2</sub>O= Negativkontrolle, 1-10 = Proben 1-10, alle Proben haben eine positive Bande für PBGD außer der Negativkontrolle.*

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Agarosegel-Elektrophorese nach durchgeführter CK-20 RT PCR von 10 Patienten repräsentativ für das Gesamtkollektiv dargestellt. Es wurden jeweils Blut- und Knochenmarkproben untersucht. Jede Probe wurde doppelt getestet. Gut zu erkennen sind die positiven Banden bei 485 Basenpaaren, die eine CK-20 Positivität indizieren für die Proben 2 Knochenmark (KM) 3 KM, die zweite Probe für 4 KM, die erste Probe von 7 Blut (B), die erste Probe von 8 KM und für 9 B.

In Abbildung 12 ist die Agarosegel-Elektrophorese nach PBGD-PCR (Positivkontrolle) für eben diese 10 Patienten dargestellt. Die Bande bei 204 Basenpaaren stellt das Amplikon der PBGD-RT-PCR dar. Es ist für alle Proben eine positive Bande nachweisbar. Nur für die Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) ist keine positive Bande nachzuweisen.

### 3.3.3 Detektionsraten von CK-20 mRNA mittels CK-20 RT-PCR beim Patientenkollektiv R0

Die folgenden Ergebnisse sind für das Patientenkollektiv R0 (n=77) dargestellt, da sämtliche Berechnungen der Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom CK-20 Nachweis ebenfalls für dieses Kollektiv durchgeführt wurden. In Abbildung 13 sind die Detektionsraten von CK-20 im Blut und im Knochenmark für das Patientenkollektiv R0 in Form eines Säulendiagrammes dargestellt.



**Abb. 13:** Detektionsraten von CK-20 mRNA im Knochenmark und im Blut sowie im Knochenmark und /oder im Blut für das Patientenkollektiv R0

**KM= Knochenmark**

Es wurden Blutproben von 74 Patienten auf CK-20 untersucht, von denen 27 (36,5%) positiv waren. Von 61 Patienten wurden Knochenmarkproben untersucht, von denen 19 (31,1%) positiv waren. Entweder im Blut oder im Knochenmark oder doppelt positiv waren 40 (51,9%) der 77 getesteten Patienten. Die Detektionsrate im Blut ist somit etwas höher als die Rate im Knochenmark.



### **3.3.4 Detektionsraten von CK-20 in Abhängigkeit von bestimmten klinischen Parametern**

Um der Frage nachzugehen, ob das Vorhandensein von CK-20 im Blut oder im Knochenmark mit bestimmten klinischen Parametern assoziiert ist, wird im folgenden Kapitel die Korrelation zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark und verschiedenen klinischen Parametern analysiert. Die Korrelation wird jeweils für die Detektionsraten in den Knochenmarkproben, in den Blutproben sowie für die Detektion in einem von beiden Kompartimenten getrennt berechnet (Tabelle 14 bis 16). Man beachte, dass bei bestimmten Variablen, z. B. das UICC-Stadium nur Patienten mit für diese Variable bekanntem Status in die Berechnung mit eingeschlossen wurden und so die Patientenzahl variieren kann. Die Korrelation ist in Form einer sogenannten Kreuztabelle dargestellt, wobei Unterschiede in den Verteilungen mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests auf Signifikanz geprüft werden.

In Tabelle 14 ist die Korrelation zwischen einem CK-20 Nachweis im Knochenmark und angegebenen klinischen Parametern dargestellt. Knochenmarkproben wurden insgesamt von 61 Patienten getestet.

**Tabelle 14: Korrelation zwischen dem CK-20 Nachweis im Knochenmark und bestimmten klinischen Parametern**

Variable		Nachweis von CK-20 im Knochenmark (n=61 Patienten)			Korrelation $\chi^2$ -Test (p-Wert)
		Ge- samt	Positiv (%)	Negativ (%)	
Geschlecht	weiblich	9	2 (22,22%)	7 (77,78%)	<b>0,531</b>
	männlich	52	17 (32,69%)	35 (67,31%)	
UICC-Stadium (n=59)	I	12	3 (25%)	9 (75%)	<b>0,49</b>
	II	24	10 (41,67%)	14 (58,33%)	
	III	15	3 (20%)	12 (80%)	
	IV	8	3 (37,5%)	5 (62,5%)	
T-Kategorie (n=59)	I	14	5 (35,71%)	9 (64,29%)	<b>0,815</b>
	II	19	7 (36,84%)	12 (63,16%)	
	III	25	7 (28%)	18 (72%)	
	IV	1	0	1 (100%)	
N-Kategorie	0	27	8 (29,63%)	19 (70,37%)	<b>0,82</b>
	I	34	11 (32,35%)	23 (67,65%)	
M-Kategorie	0	53	16 (30,19%)	37 (69,81%)	<b>0,677</b>
	I	8	3 (37,5%)	5 (62,5%)	
Neoadjuvante Therapie	Ja	25	7 (28%)	18 (72%)	<b>0,658</b>
	Nein	36	12 (33,33%)	24 (66,67%)	
Rezidiv	Ja	28	8 (28,57%)	20 (71,43%)	<b>0,689</b>
	Nein	33	11 (33,33%)	22 (66,67%)	
Tumorart (histologisch) (n=60)	Adenokarzinom	29	7 (24,14%)	22 (75,86%)	<b>0,338</b>
	Plattenepithelkarzi- nom	31	11 (35,48%)	20 (64,52%)	

Es besteht keine Korrelation zwischen dem CK-20 Nachweis im Knochenmark und einem der getesteten klinischen Parameter. Aus der Tabelle geht zudem hervor, dass 17 (32,69%) der insgesamt 52 getesteten männlichen Patienten eine CK-20 positive Knochenmarksprobe aufweisen. Damit ist die Detektionsrate bei den Männern deutlich oberhalb der Detektionsrate der Frauen, die bei 22,22% liegt. Im Chi-Quadrat-Test zeigt sich jedoch keine Korrelation zwischen dem CK-20 Nachweis im Knochenmark und dem Geschlecht ( $p=0,531$ ). Bei der Analyse der Korrelation zwischen dem UICC-Stadium und dem CK-20 Nachweis im Knochenmark ist eine erhöhte CK-20 Detektionsrate für Patienten mit UICC-Stadium II

(41,67%) sowie eine relativ niedrige Detektionsrate für die Patienten mit UICC-Stadium III (20%) auffällig. Auch diese Beobachtung ist jedoch nicht statistisch signifikant ( $p=0,49$ ). Es zeigt sich keine Korrelation zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und der T-Kategorie ( $p=0,815$ ), der N-Kategorie ( $p=0,82$ ) oder der M-Kategorie ( $p=0,677$ ). Auch zwischen der Tatsache, ob eine neoadjuvante Chemotherapie erfolgt ist und der Detektionsrate von CK-20 im Knochenmark konnte keine Assoziation nachgewiesen werden ( $p=0,658$ ). Die Rezidivhäufigkeit in unserem Patientenkollektiv ist nicht abhängig vom CK-20 Nachweis im Knochenmark ( $p=0,689$ ).

Es fällt auf, dass sich bei den Patienten mit Adenokarzinomen (Detektionsrate 24,14%) eine etwas geringere Nachweisrate von CK-20 im Knochenmark zeigt als bei den Plattenepithelkarzinomen (Detektionsrate 35,48%). Im Chi-Quadrat-Test konnte jedoch auch hier keine Korrelation festgestellt werden ( $p=0,338$ ).

In Tabelle 15 ist die Korrelation zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und den untersuchten klinischen Parametern dargestellt. Blutproben wurden von insgesamt 74 Patienten untersucht.

Tabelle 15: Korrelation zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und bestimmten klinischen Parametern

Variable		Nachweis von CK-20 im Blut (n=74 Patienten)			Korrelation $\chi^2$ -Test (p-Wert)
		Gesamt	Positiv (%)	Negativ (%)	
Geschlecht	weiblich	13	7 (53,85%)	6 (46,15%)	<b>0,152</b>
	männlich	61	20 (32,79%)	41 (67,21%)	
UICC-Stadium (n=70)	I	16	5 (31,25%)	11 (68,75%)	<b>0,447</b>
	II	26	9 (34,62%)	17 (65,38%)	
	III	18	6(33,33%)	12 (66,67%)	
	IV	10	6 (60%)	4 (40%)	
T-Stadium (n=71)	I	18	5 (27,78%)	13 (72,22%)	<b>0,439</b>
	II	22	7 (31,82%)	15 (68,18%)	
	III	30	14 (46,67%)	16 (53,33%)	
	IV	1	0	1 (100%)	
N-Stadium	0	33	13 (39,39%)	20 (60,61%)	<b>0,641</b>
	I	41	14 (34,15%)	27 (65,85%)	
M-Stadium (n=73)	0	63	21 (33,33%)	42 (66,67%)	<b>0,105</b>
	I	10	6 (60%)	4 (40%)	
Neoadjuvante Therapie	Ja	31	12 (38,71%)	19 (61,29%)	<b>0,736</b>
	Nein	43	15 (34,88%)	28 (65,12%)	
Rezidiv	Ja	34	15 (44,12%)	19 (55,88%)	<b>0,209</b>
	Nein	40	12 (30%)	28 (70%)	
Tumorart (histologisch) (n=73)	Adenokarzinom	38	10 (26,32%)	28 (73,68%)	<b>0,084</b>
	Plattenepithelkarzinom	35	16 (45,71%)	19 (54,29%)	

Auch zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und den getesteten klinischen Parametern konnte keine Korrelation nachgewiesen werden. Es zeigt sich in der Tabelle, dass 7 (53,85%) der insgesamt 13 getesteten Frauen eine positiv getestete Blutprobe aufweisen, während bei den Männern nur bei 20 (32,79%) der 61 getesteten Proben ein Nachweis gelingt. Trotz der wesentlich höheren Detektionsrate für das weibliche Geschlecht konnte hier jedoch keine Korrelation nachgewiesen werden ( $p=0,152$ ). Auch kann für den Zusammenhang zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und dem UICC-Stadium keine Korrelation nachgewiesen werden ( $p=0,439$ ), wobei jedoch die relativ hohe Rate an CK-20 positiven Proben bei den Stadium IV Patienten auffällt ,6 (60%) von 10 getesteten Proben. Es zeigt sich keine Korrelation zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und der T-

Kategorie ( $p=0,439$ ) sowie der N-Kategorie ( $p=0,641$ ). Auch zwischen M-Kategorie und dem CK-20 Nachweis im Blut besteht keine Assoziation ( $p=0,105$ ). Für die Patienten mit Fernmetastasen (M1) zeigt sich jedoch eine deutlich höhere Detektionsrate von CK-20 im Blut (die Detektionsrate liegt bei 60%) als für die Patienten ohne Fernmetastasen (hier liegt die Detektionsrate nur bei 33,33%). Eine neoadjuvante Therapie beeinflusst in unserem Kollektiv nicht die Detektion von CK-20 im Blut ( $p=0,736$ ). Auch die Rezidivhäufigkeit ist nicht mit dem CK-20 Nachweis im Blut assoziiert ( $p=0,209$ ). Es zeigt sich auch im Blut eine deutlich höhere Nachweisrate von CK-20 für die Plattenepithelkarzinome als für die Adenokarzinome (45,71% versus 26,32%). Dieser Zusammenhang ist jedoch nicht signifikant ( $p=0,084$ ).

In Tabelle 16 ist die Korrelation zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und /oder im Knochenmark und den getesteten klinischen Parametern dargestellt. D. h. alle Patienten, die entweder im Knochenmark oder im Blut oder in beiden Kompartimenten positive Proben hatten, wurden als positiv gewertet.

**Tabelle 16: Korrelation zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und/oder im Knochenmark und bestimmten klinischen Parametern**

Variable		Nachweis von CK-20 im Blut und/oder im Knochenmark (n=77 Patienten)			Korrelation $\chi^2$ -Test (p-Wert)
		Gesamt	Positiv (%)	Negativ (%)	
Geschlecht	weiblich	13	8 (61,54%)	5 (38,46%)	<b>0,448</b>
	männlich	64	32 (50%)	32 (50%)	
UICC-Stadium (n=73)	I	16	7 (43,75%)	9 (56,25%)	<b>0,038</b>
	II	28	18 (64,29%)	10 (35,71%)	
	III	19	6 (31,58%)	13 (68,52%)	
	IV	10	8 (80%)	2 (20%)	
T-Stadium (n=74)	I	18	9 (50%)	9 (50%)	<b>0,598</b>
	II	23	14 (60,87%)	9 (39,13%)	
	III	32	16 (50%)	16 (50%)	
	IV	1	0	1 (100%)	
N-Stadium	0	34	19 (55,88%)	15 (44,12%)	<b>0,539</b>
	I	43	21 (48,84%)	22 (51,16%)	
M-Stadium (n=76)	0	66	32 (48,48%)	34 (51,52%)	<b>0,063</b>
	I	10	8 (80%)	2 (20%)	
Neoadjuvante Therapie (n=77)	Ja	32	17 (53,13%)	15 (46,87%)	<b>0,862</b>
	Nein	45	23 (51,11%)	22 (48,89%)	
Rezidiv	Ja	36	19 (52,78%)	17 (47,22%)	<b>0,891</b>
	Nein	41	21 (51,22%)	20 (48,78%)	
Tumorart (histologisch) (n=76)	Adenokarzinom	39	16 (41%)	23 (59%)	<b>0,065</b>
	Plattenepithelkarzinom	37	23 (62,16%)	14 (37,84%)	

**Signifikante p-Werte sind gelb hinterlegt.**

Folgende Ergebnisse werden aus der Tabelle ersichtlich:

Die Detektionsrate von CK-20 im Blut und/ oder im Knochenmark zeigt sich abhängig vom UICC-Stadium ( $p=0,038$ ). Insgesamt 7 (43,75%) der 16 Patienten mit Stadium I weisen eine positive Probe für CK-20 auf. Bei den 28 Patienten mit Stadium II ist die CK-20 Nachweisrate mit 64,29% deutlich höher. Noch höher ist die Rate bei den Patienten mit UICC-Stadium IV. Hier weisen 8 (80%) der 10 getesteten Patienten eine positive Probe für

CK-20 im Blut und/oder im Knochenmark auf. Bei den Patienten mit Stadium III sind es dagegen nur 16 (50%) der insgesamt 32 Patienten.

Es besteht keine Korrelation zwischen dem Geschlecht und dem CK-20 Nachweis im Blut und/oder im Knochenmark ( $p=0,448$ ). Es besteht keine Korrelation zwischen dem Nachweis von CK-20 im Blut und/oder im Knochenmark und der T-Kategorie ( $p=0,598$ ), der N-Kategorie ( $p=0,539$ ) oder der M-Kategorie ( $p=0,063$ ). Für Patienten mit Fernmetastasen (M1) liegen jedoch deutlich höhere Detektionsraten von CK-20 im Blut und/oder im Knochenmark vor als für die Patienten ohne Fernmetastasen (80% versus 48,48%). Es konnte keine Korrelation zwischen einem Nachweis von CK-20 im Blut und/oder im Knochenmark und einer neoadjuvanten Therapie nachgewiesen werden ( $p=0,891$ ). Auch die Rezidivhäufigkeit zeigt sich nicht abhängig von der CK-20 Nachweisrate im Blut und/oder im Knochenmark ( $p=0,891$ ). Bei der Analyse der histologischen Tumorart fällt auf, dass für die Patienten mit Adenokarzinomen eine niedrigere Detektionsrate (41%) vorliegt als für Patienten mit Plattenepithelkarzinomen (62,16%). Der p-Wert ist jedoch mit  $p=0,065$  nicht signifikant.

### **3.4 Zusammenhang zwischen CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark und dem Überleben**

In dieser Arbeit wird der Frage nachgegangen, wie sich die CK-20 Positivität im Blut und im Knochenmark auf das Überleben bei Patienten mit Ösophaguskarzinom auswirken. Hierzu wurden für das oben beschriebene Patientenkollektiv R0 Kaplan-Meier-Überlebensanalysen durchgeführt

Im folgenden Kapitel wird der Einfluss der CK-20 Positivität im Blut und im Knochenmark auf das Überleben zunächst für das Gesamtkollektiv der R0-resezierten Patienten und dann an ausgewählten Subkollektiven untersucht. Die Subkollektive werden dabei ausgehend vom Patientenkollektiv R0 ( $n=77$ ) gebildet. Es werden zunächst nur die Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0) ( $n=34$ ) betrachtet, da sich bei diesen scheinbar kurativ operierten Patienten (R0, N0) eine Tumorzell dissemination vorrausichtlich stärker auf das Überleben auswirken könnte als bei Patienten, die bereits Lymphknotenmetastasen haben. Dann wird der Einfluss der CK-20 Positivität im Blut und im Knochenmark nur für die UICC-Stadien I und II sowie für die UICC-Stadien III und IV getrennt betrachtet. Hier ist

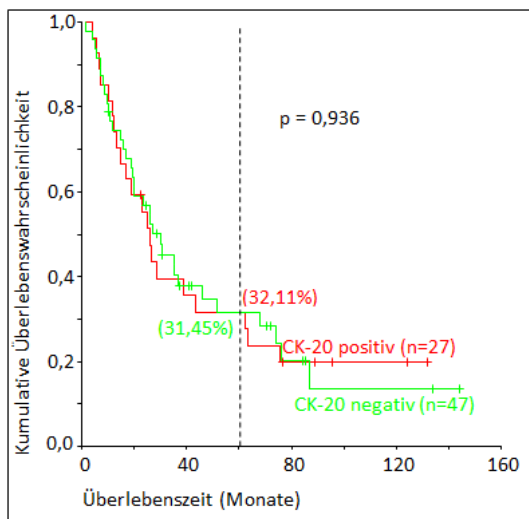
besonders die Frage interessant, ob sich bei den Patienten mit scheinbar frühen Stadien und relativ guter Prognose eine Untergruppe von Patienten mit Tumorzelldisseminierung abgrenzen lässt, die eine schlechtere Prognose haben und eventuell von weiteren Therapieoptionen profitieren würden. Als letztes wird der Einfluss der CK-20 Positivität im Blut und im Knochenmark nur für jene Patienten berechnet, die zuvor keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben, da es möglich ist, dass zuvor vorhandene DTC und CTC durch eine neoadjuvante Chemotherapie eliminiert worden sind und so das Ergebnis verändert wurde (siehe Kapitel 4.3.5).



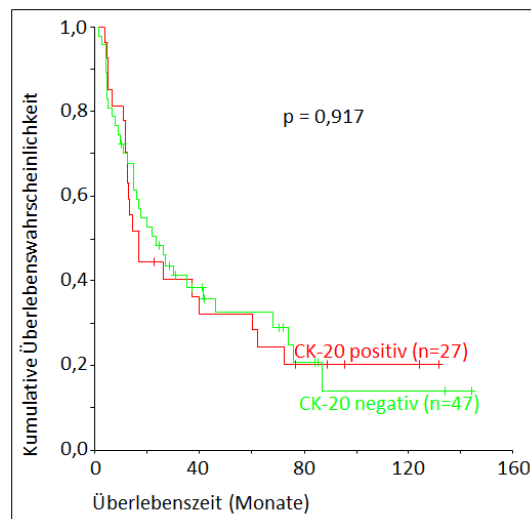
### 3.4.1 Zusammenhang zwischen CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark und dem Überleben für das Patientenkollektiv R0

In Abbildung 14 ist der Einfluss der CK-20 Positivität im Blut auf das Überleben dargestellt.

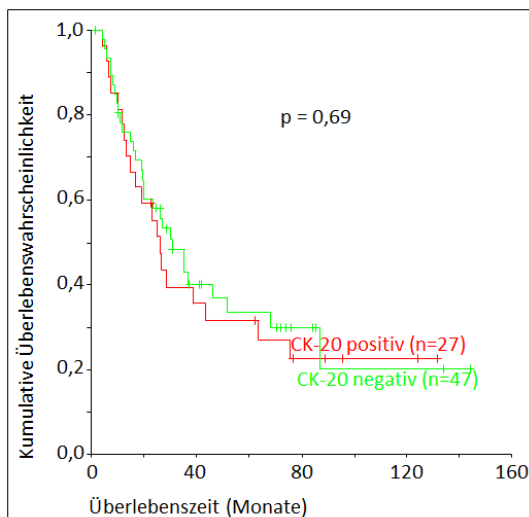
#### a) Gesamtüberleben



#### b) Rezidivfreies Überleben



#### c) Tumorspezifisches Überleben



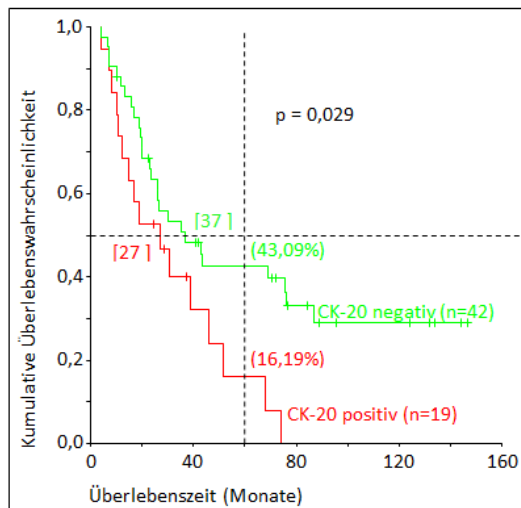
**Abb. 14:** Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Überleben für das Patientenkollektiv R0

a) Gesamtüberleben, b) rezidivfreies Überleben und c) tumorspezifisches Überleben. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5-JÜR in Klammern dargestellt (14a). Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebendwahrscheinlichkeiten der beiden Gruppen (CK-20 positiv versus CK-20 negativ) wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet.

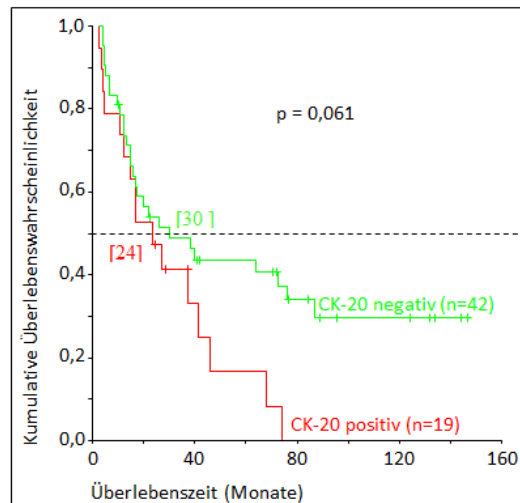
Es zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Gesamtüberleben ( $p=0,917$ ), dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,936$ ) oder dem tumorspezifischen Überleben ( $p=0,69$ ). Die Kurven der CK-20 positiv- und der CK-20 negativ getesteten Patienten verlaufen nahezu parallel. Auffällig ist weiterhin, dass die 5-JÜR für die CK-20 positiven Patienten mit 32,11% sogar etwas oberhalb der 5-JÜR für die CK-20 negativen Patienten liegt (diese liegt bei 31,45%).

In Abbildung 15 ist der Einfluss der CK-20 Positivität im Knochenmark auf das Überleben dargestellt.

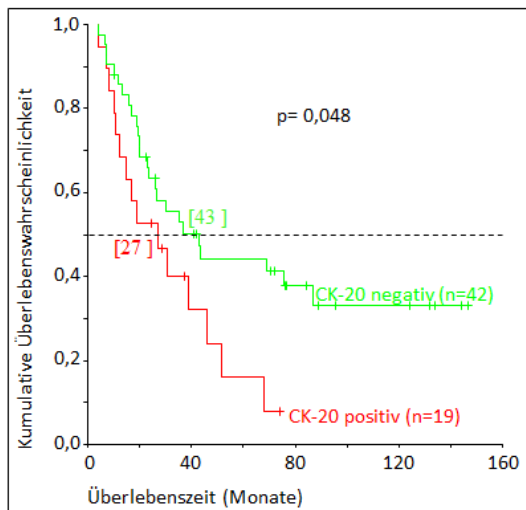
a) Gesamtüberleben



b) Rezidivfreies Überleben



c) Tumorspezifisches Überleben



**Abb. 15:** Assoziation zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Überleben für das Patientenkollektiv R0

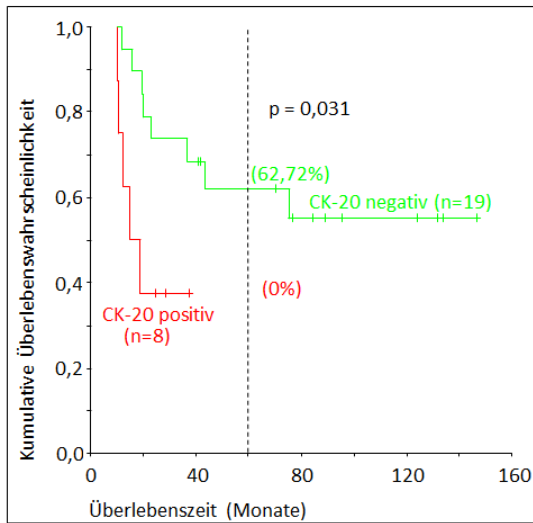
a) Gesamtüberleben, b) rezidivfreies Überleben und c) tumorspezifisches Überleben. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5-JÜR in Klammern dargestellt (Abbildung 15a). Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebenseinswahrscheinlichkeiten der beiden Gruppen (CK-20 positiv versus CK-20 negativ) wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet. An der horizontalen gestrichelten Linie bei der kumulativen Überlebenseinswahrscheinlichkeit von 0,5 ergibt sich das mediane Überleben und ist in Monaten in eckigen Klammern angegeben.

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Gesamtüberleben ( $p=0,029$ ) sowie dem tumorspezifischen Überleben ( $p=0,048$ ), wobei die CK-20 negativen Patienten deutlich länger leben als die CK-20 positiven Patienten. Nach fünf Jahren leben noch 43,09% der CK-20 negativen Patienten während von den CK-20 positiven nur noch 16,19% leben. Insgesamt ist nach 37 Monaten (43 Monaten: tumorspezifisch) die Hälfte der Patienten mit CK-20 negativen Knochenmarkproben verstorben, während von den Patienten mit positiven Proben schon nach 27 Monaten die Hälfte der Patienten verstorben ist (auch tumorspezifisch). Zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem rezidivfreien Überleben konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ( $p=0,061$ ). Die Hälfte der Patienten mit CK-20 Nachweis im Knochenmark hat nach 24 Monaten ein Rezidiv erlitten oder ist verstorben. Bei den Patienten ohne CK-20 Nachweis ist dies erst nach 30 Monaten geschehen.

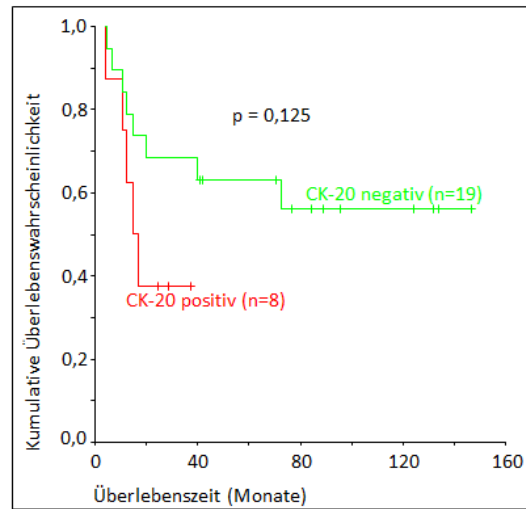
### **3.4.2 Zusammenhang zwischen CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark und Überleben bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen**

In Abbildung 16 ist der Einfluss der CK-20 Positivität im Knochenmark auf das Überleben für die N0-diagnostizierten Patienten dargestellt. Von den 34 Patienten ohne Lymphknotenmetastasen wurden Knochenmarkproben von 27 Patienten getestet. Von diesen sind 8 Proben CK 20 positiv. Blutproben wurden von 33 Patienten getestet hiervon sind 13 positiv für CK-20 getestet (siehe Tabelle 14 und 15).

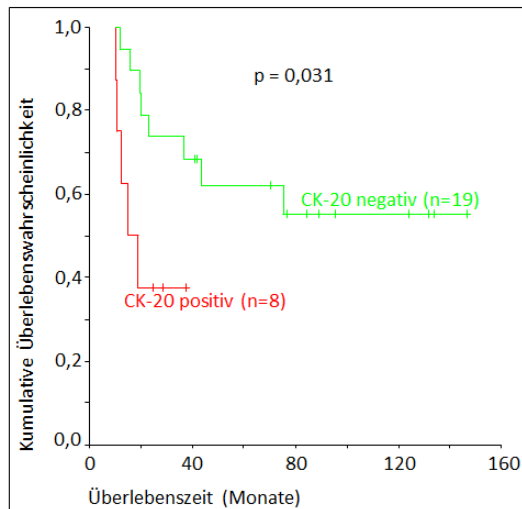
## a) Gesamtüberleben



## b) Rezidivfreies Überleben



## c) Tumorspezifisches Überleben



**Abb. 16:** Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Überleben für die Patienten ohne Lymphknotenmetastasen

a) Gesamtüberleben, b) rezidivfreies Überleben und c) tumorspezifisches Überleben. Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeiten der beiden Gruppen (CK-20 positiv versus CK-20 negativ) wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5- JÜR in Klammern dargestellt (16a).

Aus der Abbildung 16 gehen folgende Ergebnisse hervor:

Für die N0-diagnostizierten Patienten besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Gesamtüberleben ( $p = 0,031$ ) sowie dem

tumorspezifischen Überleben ( $p= 0,031$ ), wobei die CK-20 negativen Patienten jeweils eine deutlich höhere Überlebenschance haben als die CK-20 positiven Patienten. Dies spiegelt sich auch in der deutlich höheren 5-JÜR von 62,72% für die CK-20 negativen Patienten wieder. Von den CK-20 positiven Patienten lebt in diesem Subkollektiv nach fünf Jahren kein Patient mehr. Die 3-JÜR für diese Gruppe beträgt 35,71%.

Beim rezidivfreien Überleben besteht dagegen kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und der Überlebenschance ( $p=0,125$ ) für das Subkollektiv der N0-diagnostizierten Patienten.

Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und dem Überleben hat für das Kollektiv der N0-diagnostizierten Patienten folgende p-Werte ergeben:

*Tabelle 17: Assoziation zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Überleben für die Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0)*

Überleben	p-Wert
Gesamtüberleben	0,688
Rezidivfreies Überleben	0,727
Tumorspezifisches Überleben	0,694

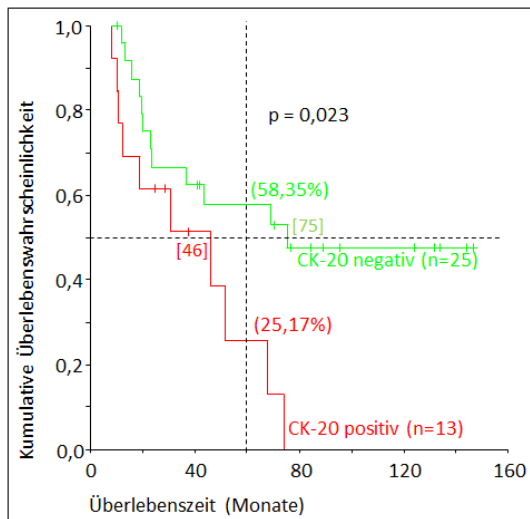
*CK-20 positiv (n= 13), CK-20 negativ (n= 20).*

Wie aus der Tabelle hervorgeht, besteht jeweils kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Gesamtüberleben ( $p=0,688$ ), dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,727$ ) und dem tumorspezifischen Überleben ( $p=0,694$ ) für die N0-diagnostizierten Patienten. Die Kurvenverläufe der Kaplan-Meier Kurven werden für diese Zusammenhänge nicht dargestellt, da sich hieraus keine weiteren Erkenntnisse ableiten lassen.

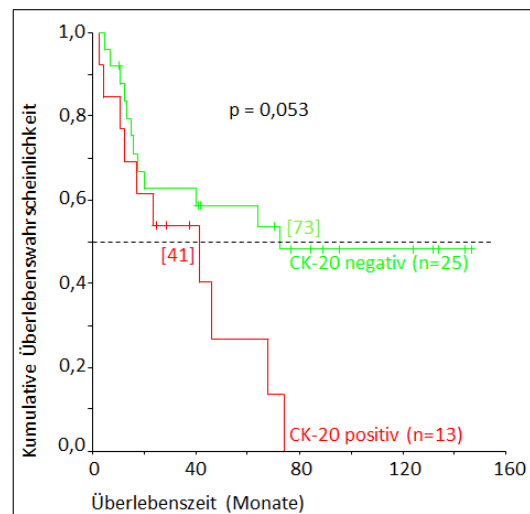
### **3.4.3 Zusammenhang zwischen CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark und Überleben bei Patienten mit UICC-Stadium I und II**

In Abbildung 17 ist der Zusammenhang zwischen dem CK-20 Nachweis im Knochenmark und dem Überleben für die UICC-Stadien I und II (n=44) dargestellt. Von den 44 Patienten der UICC-Stadien I oder II wurden von 36 Patienten Knochenmarkproben getestet, von denen 13 CK-20 positiv waren. Blutproben wurden von 42 Patienten untersucht, von denen 14 Proben positiv waren.

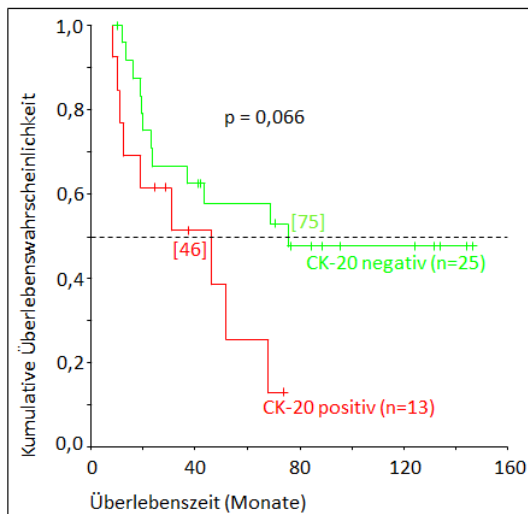
## a) Gesamtüberleben



## b) Rezidivfreies Überleben



## c) Tumorspezifisches Überleben



**Abb. 17:** Assoziation zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Überleben für die Patienten mit UICC-Stadium I und II

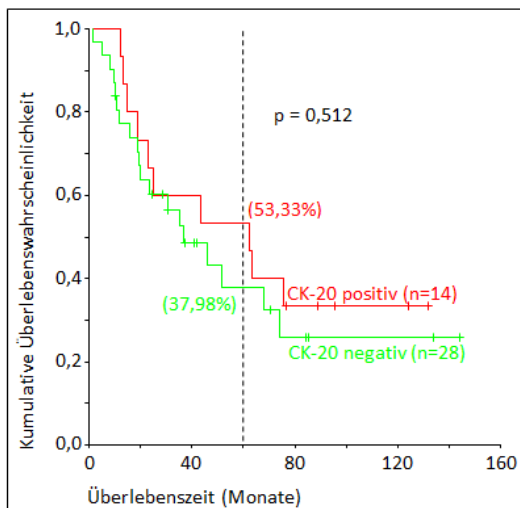
a) Gesamtüberleben, b) rezidivfreies Überleben und c) tumorspezifisches Überleben. Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeiten der beiden Gruppen (CK-20 positiv versus CK-20 negativ) wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5-JÜR in Klammern dargestellt (17a). An der horizontalen gestrichelten Linie bei der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeit von 0,5 ergibt sich das mediane Überleben und ist in Monaten in eckigen Klammern angegeben.

Aus der Abbildung 17 ergeben sich folgende Ergebnisse:



Es zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Gesamtüberleben für die Patienten mit UICC-Stadium I und II ( $p=0,023$ ). Die CK-20 negativen Patienten haben deutlich höhere Überlebenschancen als die CK-20 positiven. Dies zeigt sich auch in der deutlich höheren 5-JÜR von 58,35% für die CK-20 negativen Patienten gegenüber 25,17% für die CK-20 positiven. Der Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,053$ ) sowie dem tumorspezifischem Überleben ( $p=0,066$ ) für die Patienten mit UICC-Stadium I und II ist jeweils nicht als signifikant zu werten, es zeigt sich jedoch ein deutlicher Trend, dass die Verläufe unterschiedlich sind, was auch aus der Kaplan Meier Graphik hervorgeht. CK-20 negative Patienten haben ein medianes Überleben von 75 Monaten für das Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben sowie von 73 Monaten für das rezidivfreie Überleben, während die CK-20 positiven Patienten für das Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben nur ein medianes Überleben von 46 Monaten haben und für das rezidivfreie Überleben von 41 Monaten.

In Abbildung 18 ist der Einfluss der CK-20 Positivität im Blut auf das Gesamtüberleben für die Patienten mit UICC-Stadium I und II in Form von einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.



**Abb. 18:** Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Gesamtüberleben für die Patienten mit UICC-Stadium I und II

Der  $p$ -Wert für den Vergleich der kumulativen Überlebenschancen der beiden Gruppen (CK-20 positiv versus CK-20 negativ) wurde mit dem Log-Rank-Test errechnet. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5-JÜR in Klammern dargestellt.

Die Berechnung des Zusammenhanges zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und dem Überleben hat für das Kollektiv der Patienten mit UICC-Stadium I oder II folgende p-Werte ergeben:

*Tabelle 18: Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Überleben für die Patienten mit UICC-Stadium I und II*

Überleben	p-Wert
Gesamtüberleben	0,512
Rezidivfreies Überleben	0,582
Tumorspezifisches Überleben	0,597

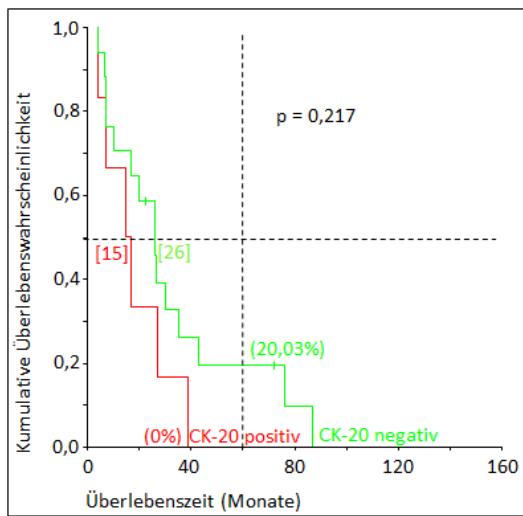
*CK-20 positiv (n=14), CK-20 negativ (n=28).*

Der Zusammenhang zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und dem Überleben für die Patienten mit UICC-Stadium I und II ist nicht signifikant für das Gesamtüberleben ( $p=0,512$ ), das rezidivfreie Überleben ( $p=0,582$ ) und das tumorspezifische Überleben ( $p=0,597$ ). Aus der Kaplan-Meier Kurve, die für das Gesamtüberleben dargestellt ist, geht hervor, dass Patienten mit CK-20 positiven Blutproben in frühen UICC-Stadien eine deutlich höhere 5-JÜR haben als Patienten mit CK-20 negativen Proben (53,33% versus 37,98%).

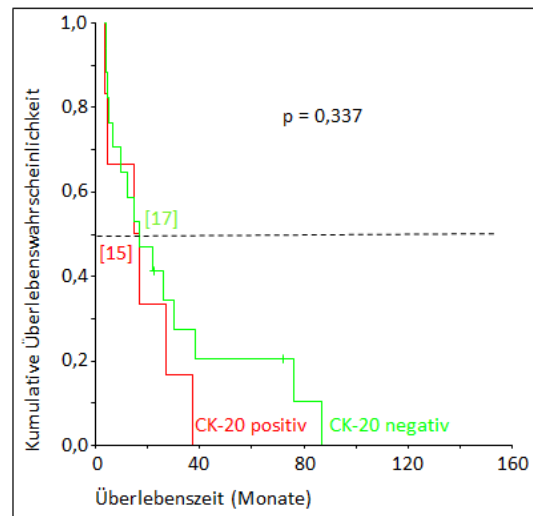
#### **3.4.4 Zusammenhang zwischen CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark und Überleben bei Patienten mit UICC-Stadium III und IV**

In Abbildung 19 ist der Einfluss der CK-20 Positivität im Knochenmark auf das Überleben für die Patienten mit UICC-Stadien III und IV ( $n=29$ ) dargestellt. Von den 29 Patienten mit UICC-Stadium III oder IV wurden Knochenmarkproben von 23 Patienten getestet, von denen 6 positiv waren. Blutproben wurden von 28 Patienten getestet von denen 12 positiv waren.

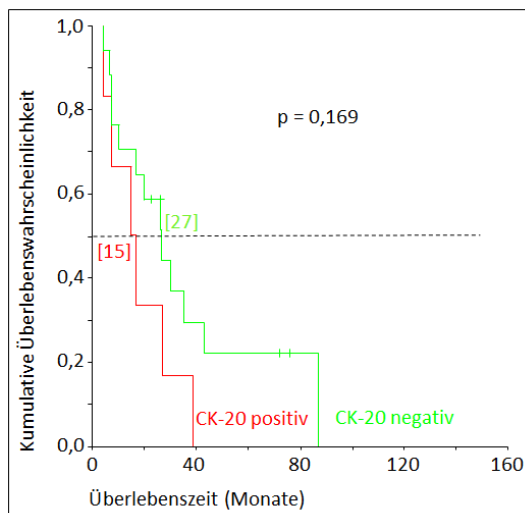
## a) Gesamtüberleben



## b) Rezidivfreies Überleben



## c) Tumorspezifisches Überleben

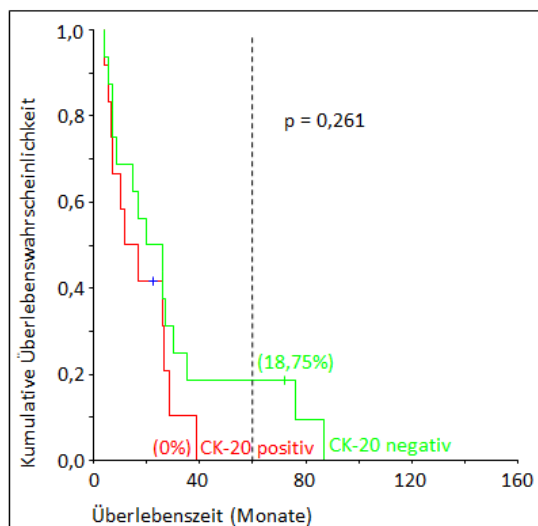


**Abb. 19:** Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Überleben für die Patienten mit UICC-Stadium III und IV

a) Gesamtüberleben b) rezidivfreies Überleben und c) tumorspezifisches Überleben. Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeiten der beiden Gruppen (CK-20 positiv versus CK-20 negativ) wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5- JÜR in Klammern dargestellt (19a). An der horizontalen gestrichelten Linie bei der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeit von 0,5 ergibt sich das mediane Überleben und ist in Monaten in eckigen Klammern angegeben. CK-20 positiv (n=8), CK-20 negativ (n=17).

Es zeigen sich die folgenden Ergebnisse: Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Gesamtüberleben ( $p=0,217$ ), dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,337$ ) und dem tumorspezifischen Überleben ( $p=0,169$ ). Die 5-JÜR der CK-20 negativen Patienten liegt jedoch deutlich oberhalb der Rate der CK-20 positiv getesteten Patienten. So leben von den Patienten mit CK-20 negativen Knochenmarkproben nach 5 Jahren noch 20,03%, dagegen sind von den Patienten mit CK-20 positiven Proben nach 39 Monaten bereits 100% verstorben. Auch das mediane Überleben der CK-20 negativen Patienten ist länger. Von diesen lebt nach 26 Monaten noch die Hälfte der Patienten (tumorspezifisch: 27 Monate), während von den CK-20 positiven Patienten schon nach 15 Monaten die Hälfte der Patienten verstorben ist (auch tumorspezifisch). Von den CK-20 negativen Patienten bekommt die Hälfte der Patienten nach 17 Monaten ein Rezidiv oder verstirbt, bei den CK-20 positiven Patienten ist das nach 15 Monaten eingetreten.

In Abbildung 20 ist der Zusammenhang zwischen der CK 20 Positivität im Blut und dem Gesamtüberleben für die Patienten mit UICC-Stadium III und IV in Form von einer Kaplan Meier Kurve dargestellt.



**Abb. 20:** Assoziation zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Gesamtüberleben für die Patienten der UICC-Stadien III und IV

Der  $p$ -Wert für den Vergleich der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeiten der beiden Gruppen (CK-20 positiv versus CK-20 negativ) wurde mit dem Log-Rank-Test errechnet. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5-JÜR in Klammern dargestellt. CK-20 positiv ( $n=12$ ), CK-20 negativ ( $n=16$ ).

Der Zusammenhang für die CK-20 Positivität im Blut und dem Überleben hat für das Kollektiv der Patienten mit UICC-Stadium III und IV folgende p-Werte ergeben:

*Tabelle 19: Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Überleben für die Patienten mit UICC-Stadium III und IV*

Überleben	p-Wert
Gesamtüberleben	0,261
Rezidivfreies Überleben	0,248
Tumorspezifisches Überleben	0,196

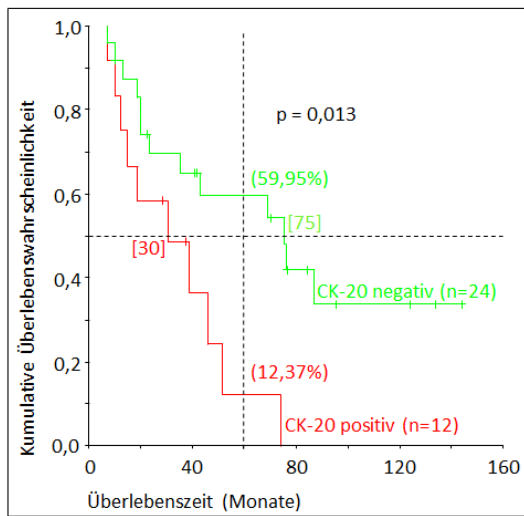
**CK-20 positiv (n=12), CK-20 negativ (n=16).**

Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und dem Gesamtüberleben ( $p=0,261$ ), dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,248$ ) und dem tumorspezifischen Überleben ( $p=0,196$ ). Im Gegensatz zu dem Subkollektiv der Patienten mit frühen UICC-Stadien zeigt sich bei den späten UICC-Stadien jedoch eine höhere 5-JÜR für CK-20 negative Patienten als für CK-20 positive Patienten. So leben von den CK-20 negativen Patienten nach 5 Jahren noch 18,75% von den CK-20 positiven sind nach 39 Monaten bereits 100% verstorben.

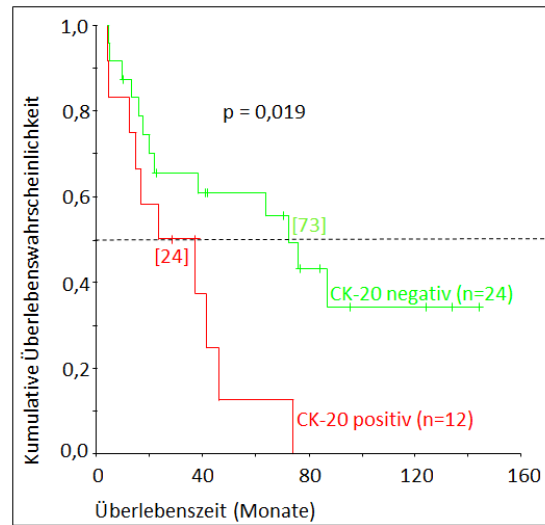
### **3.4.5 Zusammenhang zwischen CK-20 Nachweis im Blut und im Knochenmark und Überleben bei den Patienten, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben**

In Abbildung 21 ist der Einfluss der CK-20 Positivität im Knochenmark auf das Überleben für die Patienten dargestellt, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben ( $n=45$ ). Von den 45 Patienten, die keine Chemotherapie erhalten haben, wurden Knochenmarkproben von 36 Patienten getestet, von denen 12 positiv waren. Blutproben wurden von 43 Patienten getestet, von denen 15 CK-20 positiv waren.

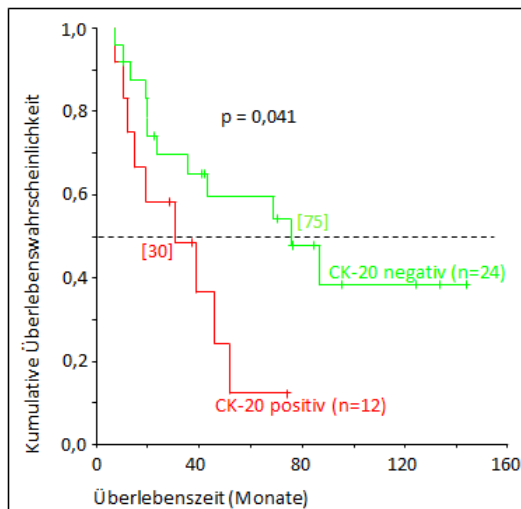
## a) Gesamtüberleben



## b) Rezidivfreies Überleben



## c) Tumorspezifisches Überleben



**Abb. 21:** Assoziation zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Überleben für die Patienten, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben

a) Gesamtüberleben, b) rezidivfreies Überleben und c) tumorspezifisches Überleben. Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeiten der beiden Gruppen (CK-20 positiv versus CK-20 negativ) wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5-JÜR in Klammern dargestellt (21a). An der horizontalen gestrichelten Linie bei der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeit von 0,5 ergibt sich das mediane Überleben und ist in Monaten in eckigen Klammern angegeben.

Aus der Abbildung 21 lassen sich folgende Ergebnisse ableiten:

Für die Patienten, die zuvor keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben, zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem Gesamtüberleben ( $p=0,013$ ), der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,019$ ) sowie der CK-20 Positivität im Knochenmark und dem tumorspezifischen Überleben ( $p=0,041$ ). Damit besteht im Gegensatz zum Gesamtkollektiv R0 ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem CK-20 Nachweis im Knochenmark und dem rezidivfreien Überleben. Die CK-20 negativen Patienten haben jeweils deutlich höhere Überlebenschancen als die CK-20 positiven. Die 5-JÜR für die CK-20 negativen Patienten liegt bei 59,95 %, während sie für die CK-20 positiven bei 12,37% liegt. Von den CK-20 positiven Patienten ist in diesem Subkollektiv nach 30 Monaten (auch tumorspezifisch) die Hälfte der Patienten verstorben, bei den CK-20 negativen ist das erst nach 75 Monaten geschehen (auch tumorspezifisch). Bereits nach 24 Monaten hat die Hälfte aller CK-20 positiven Patienten ein Rezidiv erlitten oder ist verstorben, bei den CK-20 negativen ist das erst nach 73 Monaten der Fall.

In folgender Tabelle ist der Einfluss der CK-20 Positivität im Blut auf das Überleben für die Patienten, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben, dargestellt.

**Tabelle 20: Zusammenhang zwischen der CK-20 Positivität im Blut und dem Überleben für die Patienten, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben**

Überleben	p-Wert
Gesamtüberleben	0,776
Rezidivfreies Überleben	0,714
Tumorspezifisches Überleben	0,593

*CK-20 positiv (n=15), CK-20 negativ (n=28).*

Wie bereits für das Gesamtkollektiv besteht auch für das Subkollektiv der Patienten, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben, kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und dem Gesamtüberleben ( $p=0,776$ ), der CK-20 Positivität im Blut und dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,714$ ) und der CK-20 Positivität im Blut und dem tumorspezifischen Überleben ( $p=0,593$ ).

### 3.5 Ergebnisse der Multivariaten Analysen

Um der Frage nachzugehen, ob der Nachweis von CK-20 ein unabhängiger prognostischer Faktor für Patienten mit Ösophaguskarzinom ist, werden im folgenden Kapitel multivariate Analysen mit Hilfe des Cox-Regressionsmodell durchgeführt und mit der Methode des schrittweisen Einschlusses mittels LR (likelihoodquotienten) Methode berechnet. Es wurden nur Variablen mit in die Rechnung eingeschlossen, für die in der univariaten Analyse (Log-Rank-Test) ein signifikanter p-Wert errechnet wurde. Somit geht die CK-20 Positivität im Knochenmark mit in die Rechnungen für das Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben ein, der CK-20 Nachweis im Blut wird dagegen nicht multivariat analysiert. Die p-Werte für die multivariaten Analysen, die in den folgenden drei Tabellen (Tabelle 21 bis 23) genannt werden, wurden jeweils mit dem Cox-Regressionsmodell errechnet.

*Tabelle 21: Ergebnisse der multivariaten Analysen für ausgewählte Faktoren assoziiert mit dem Gesamtüberleben berechnet für das Patientenkollektiv R0*

Variable	P-Wert (univariat)	P-Wert (multivariat)	Hazard Quotient
CK-20 Nachweis im Knochenmark	0,029	<b>0,006</b>	<b>2,529</b>
N-Kategorie	<0,001	0,357	1,53
Stadiengruppe	<0,001	<b>&lt;0,001</b>	<b>3,128</b>

Der Einfluss des CK-20 Nachweises im Knochenmark auf das Gesamtüberleben stellt für das Patientenkollektiv R0 einen unabhängigen prognostischen Faktor dar ( $p=0,006$ ). Die Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum zu versterben ist dabei für die CK-20 positiven Patienten mehr als doppelt so hoch wie für die CK-20 negativen ( $HR=2,529$ ). Die N-Kategorie stellt dagegen keinen unabhängigen prognostischen Faktor für dieses Patientenkollektiv dar ( $p=0,357$ ,  $HR=1,53$ ). Weiterhin stellt der Einfluss der Zugehörigkeit zu einer Stadiengruppe (Stadium I und II versus Stadium III und IV) auf das Gesamtüberleben einen unabhängigen prognostischen Faktor dar ( $p<0,001$ ,  $HR=3,128$ ).



*Tabelle 22: Ergebnisse der multivariaten Analysen für ausgewählte Faktoren assoziiert mit dem rezidivfreien Überleben berechnet für das Patientenkollektiv R0*

Variable	P-Wert (univariat)	P-Wert (multivariat)	Hazard Quotient
N-Kategorie	<0,001	0,258	1,646
Stadiengruppe	<0,001	<b>0,001</b>	<b>2,913</b>

Die N-Kategorie stellt auch für das rezidivfreie Überleben keinen unabhängigen prognostischen Faktor für dieses Patientenkollektiv dar ( $p=0,258$ ,  $HR=1,646$ ). Dagegen stellt der Einfluss der Zugehörigkeit zu einer Stadiengruppe (Stadium I und II versus Stadium III und IV) auch für das rezidivfreie Überleben einen unabhängigen prognostischen Faktor dar ( $p<0,001$ ,  $HR=2,913$ ).

*Tabelle 23: Ergebnisse der multivariaten Analysen für ausgewählte Faktoren assoziiert mit dem tumorspezifischen Überleben berechnet für das Patientenkollektiv R0*

Variable	P-Wert (univariat)	P-Wert (multivariat)	Hazard Quotient
CK-20 Nachweis im Knochenmark	0,048	<b>0,013</b>	<b>2,37</b>
N-Kategorie	<0,001	0,548	1,319
Stadiengruppe	<0,001	<b>0,002</b>	<b>2,873</b>

Auch für das tumorspezifische Überleben stellt der CK-20 Nachweis im Knochenmark einen unabhängigen prognostischen Faktor dar ( $p=0,013$ ,  $HR=2,37$ ). Die N-Kategorie stellt auch hier wieder keinen unabhängigen prognostischen Faktor für dieses Patientenkollektiv dar ( $p=0,548$ ,  $HR=1,319$ ). Der Einfluss der Zugehörigkeit zu einer Stadiengruppe (Stadium I und II versus Stadium III und IV) auf das tumorspezifische Überleben ergibt einen weiteren unabhängigen prognostischen Faktor für dieses Patientenkollektiv ( $p<0,001$ ,  $HR=3,128$ ).

## **4. Diskussion**

### **4.1 Patientenkollektive und Studie**

#### **4.1.1 Epidemiologische Daten, Histologie und Stadienverteilung**

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Gesamtkollektiv umfasst Patienten mit Residualtumorstatus R0 bis R2. Die Beschreibung dieses Patientenkollektivs R0 bis R2 hinsichtlich klinischer Parameter sowie ihres Einflusses auf das Überleben der Patienten wird aus Gründen der Übersichtlichkeit und Fokussierung im Anhang zu dieser Dissertation dargestellt. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung eines möglichen prognostischen, prädiktiven Wertes der CK-20 RT-PCR Analyse im Blut und Knochenmark. Daher wurden im Hauptteil der Dissertation nur diejenigen Fälle weitergehend untersucht, bei denen nach Operation kein Residualtumor mehr vorlag, also die kurativ behandelten Fälle (R0 Status). Dieses Patientenkollektiv R0 entspricht jedoch nicht der eigentlichen klinischen Situation bei Patienten mit Ösophaguskarzinom und wird somit an dieser Stelle nicht diskutiert.

Das Gesamtkollektiv R0 bis R2 besteht aus 94 Patienten mit einem Altersmedian von 61 Jahren zum Operationszeitpunkt. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten beträgt 5,2:1. Diese epidemiologischen Daten stimmen in etwa mit anderen in der Literatur genannten Daten überein. So zeigt sich z. B. bei Tachezy et al. (Tachezy et al., 2012) in einem Kollektiv aus 289 Patienten mit Ösophaguskarzinom ein Geschlechtsverhältnis von 3,59:1 und ein Altersmedian von 63,6 Jahren. Bezüglich der histologischen Tumorart stellt sich das Gesamtkollektiv R0 bis R2 folgendermaßen dar: 45,7 % der Patienten haben ein Adenokarzinom, 45,7 % Plattenepithelkarzinome, ein Patient hat einen neuroendokrinen Tumor und bei den restlichen 7,5% der Patienten ist die Tumorart unbekannt (siehe Tabelle 7). In der Literatur lässt sich hier eine große Variation der Verteilung der histologischen Tumorart erkennen. So zeigt sich z. B. in einer Arbeit von 2004 (Medical Research Council Oesophageal Cancer Working Group, 2002) eine Verteilung von 31% Plattenepithelkarzinomen, 66% Adenokarzinomen und 3% undifferenzierten Tumoren bei insgesamt 802

randomisierten Patienten aus unterschiedlichen Zentren. Dagegen beschreibt Sievert mit seiner Arbeitsgruppe (Sievert et al., 2001) ein Patientenkollektiv von 1635 Patienten mit einer Verteilung von 62% Plattenepithelkarzinomen und 33% Adenokarzinomen. Diese Unterschiede in der Verteilung der histologischen Tumorart sind sehr wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Rekrutierungszeiträume zu begründen, da sich in den letzten Jahren der Anteil der Patienten mit Adenokarzinom stark erhöht hat (Kong et al., 2011; Reynolds et al., 2012) (siehe Kapitel 1.2). Die Verteilung der TNM-Kategorie stellt sich beim Patientenkollektiv R0 bis R2 folgendermaßen dar: Einen T1-Tumor haben 24,5%, einen T2-Tumor 29,8% einen T3 Tumor 40,4% und einen T4-Tumor 2,1%. Keine Lymphknotenmetastasen haben 44,7% und bereits Lymphknotenmetastasen haben 55,3% der Patienten. Keine Fernmetastasen haben 84% und bereits Fernmetastasen haben 14,9% (siehe Tabelle 8). Daraus ergibt sich für das Patientenkollektiv R0 bis R2 folgende Verteilung der UICC-Stadien: Stadium I: 21,3%, Stadium II: 36,2%, Stadium III: 23,4%, Stadium IV: 14,9% und ein unbekanntes Stadium bei 4,2% der Patienten (siehe Tabelle 9). Eine ähnliche Verteilung der T und der N-Kategorie zeigt sich auch in einer Studie von Kaifi (Kaifi et al., 2005). In dieser Studie waren jedoch nur Patienten ohne Fernmetastasen mit eingeschlossen. Bei Tachezy et al. (Tachezy et al., 2012) zeigen sich dagegen in der Verteilung der UICC-Stadien mehr Patienten mit Stadium IV (17,7%), mit Stadium III (30,45%) und mit Stadium II (39,4%) als in unserem Patientenkollektiv R0 bis R2. Dafür zeigen sich weniger Patienten mit UICC-Stadium I (12,45%). Dieser höhere Anteil von späten Stadien entspricht eher der klinischen Situation.

#### **4.1.2 Prognose**

Die 5-JÜR für das Patientenkollektiv R0 bis R2 beträgt 37,29%. Verteilt auf die einzelnen UICC-Stadien zeigen sich dabei folgenden 5-JÜR: Stadium I: 65%, Stadium II: 48,19%, Stadium III: 13,64% und Stadium IV: 12,96%. Im Vergleich hierzu gibt eine Arbeitsgruppe von Hagen (Hagen et al., 2001) eine wesentlich höhere 5-JÜR von 52% für ein Kollektiv von 100 Patienten mit Adenokarzinomen des Ösophagus an. Verteilt auf die UICC-Stadien zeigen sich bei Hagen et al. die folgenden 5-JÜR: Stadium I: 94%, Stadium II: 65%, Stadium III: 23% und Stadium IV: 27%. Diese wesentliche höheren 5-JÜR sind vielleicht dadurch zu begründen, dass bei Hagen et al. nur Patienten mit Adenokarzinom untersucht worden sind, welche insgesamt eine bessere Prognose haben als die Patienten mit

Plattenepithelkarzinom (Rice et al., 2010) und, dass der Altersmedian der Patienten in dieser Studie mit 57 Jahren unterhalb des Altersmedians in unserem Patientenkollektiv liegt. In anderen Studien in der Literatur zeigen sich dagegen deutlich niedrigere 5-JÜR. So wird z. B. in einer Studie von Oezcelic et al. (Oezcelic et al., 2012) für ein Kollektiv von 114 Patienten mit Ösophaguskarzinom nur eine 5-JÜR von 25% erreicht. Zusammenfassend kann hier gesagt werden, dass die in der Literatur angegebenen 5-JÜR bei Patienten mit Ösophaguskarzinom sehr stark variieren, dass sich die Prognose in den letzten Jahren jedoch insgesamt deutlich verbessert hat (Reynholds et al., 2012) (siehe Kapitel 1.2.5).

#### **4.1.3 Zusammenhang zwischen TNM-Status und Überleben**

In dieser Arbeit wurde zunächst mittels Kaplan-Meier Überlebensanalysen der Einfluss bestimmter klinischer Parameter auf das Überleben für das Patientenkollektiv R0 berechnet. Die T-Kategorie wirkt sich in unserem Patientenkollektiv R0 nicht signifikant auf das Überleben aus. Ein signifikanter Unterschied der Überlebenswahrscheinlichkeiten besteht nur jeweils zwischen T4-Tumoren und allen anderen Tumoren (siehe Abb. 5). Dieser signifikante Zusammenhang ist jedoch außer Acht zu lassen, da das Patientenkollektiv R0 nur 1 Patienten mit T4-Tumor beinhaltet. Die N-Kategorie wirkt sich dagegen bei unserem Patientenkollektiv signifikant auf das Gesamtüberleben, das rezidivfreie Überleben und das tumorspezifische Überleben aus, wobei die Patienten ohne Lymphknotenmetastasen insgesamt deutlich länger leben als die Patienten mit Lymphknotenmetastasen ( $p < 0,001$ ) (siehe Abb. 6). Dagegen zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen M-Kategorie und Überleben für das Patientenkollektiv R0 (siehe Abb. 7). In der Literatur wird in den meisten Studien ein signifikanter Zusammenhang zwischen TNM-Kategorie und Überleben nachgewiesen. So zeigt sich z. B. bei der Arbeitsgruppe von Kato (Kato et al., 1993) für ein Patientenkollektiv von 351 Patienten aus Japan ein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen Patienten mit T2 und T3-Tumoren ( $p = 0,028$ ) und zwischen T3 und T4-Tumoren ( $p = 0,01$ ). Auch die M- und die N-Kategorie wirken sich in dieser Studie jeweils signifikant auf das Überleben aus (jeweils  $p < 0,0001$ ). In unserem Patientenkollektiv R0 kann ein signifikanter Zusammenhang lediglich für die N-Kategorie und das Überleben nachgewiesen werden, nicht jedoch für die M-Kategorie und die T-Kategorie und dem

Überleben. Dies ist wahrscheinlich dadurch zu begründen, dass für das Patientenkollektiv R0 viele Patienten mit höheren Tumorstadien nicht berücksichtigt wurden, da alle Patienten mit Residualtumor ausgeschlossen worden sind. Ebenfalls nicht berücksichtigt worden sind die nicht operablen (palliativen) Patienten, da diese gar nicht erst in der Chirurgischen Datenbank auftauchen. Insgesamt beinhaltet das Patientenkollektiv R0 nur 10 Patienten (13%) mit Fernmetastasen und nur einen Patienten mit T4-Tumor. Dies entspricht nicht der realen klinischen Situation, in der das Ösophaguskarzinom oft erst spät diagnostiziert wird.

## **4.2 CK-20 als Marker der Tumorzell dissemination**

### **4.2.1 CK-20 zum Nachweis von isolierten Tumorzellen bei unterschiedlichen Tumorentitäten**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob CK-20 ein geeigneter Marker zum Nachweis von DTC und CTC bei Patienten mit Ösophaguskarzinom ist. Ein Marker für die klinische Routine sollte methodisch möglichst einfach detektierbar sein. Außerdem sollte er in möglichst allen Tumoren einer Entität nachweisbar sein (Kalthoff et al., 2005). Zytokeratine gehören zu den besten Markern zum Nachweis von DTC und CTC bei soliden epithelialen Tumoren (Pantel et al., 2004). CK-20 wurde schon in vielen Studien bei unterschiedlichen Tumorentitäten zum Nachweis von DTC und CTC eingesetzt, wie z. B. beim Pankreaskarzinom (Soeth et al., 2005), beim Kolorektalen Karzinom (Funaki et al., 1998; Hardingham et al., 2000; Wyld et al., 1998; Koch et al., 2005), beim Magenkarzinom (Soeth et al., 1997; Oki et al., 2007; Fujita et al., 2006; Dardaei et al., 2011; Wu et al., 2006), beim Blasenkarzinom (Retz et al., 2001) beim Granulosazelltumor des Ovars (Altaras et al., 2002), beim oralen Plattenepithelkarzinom (Toyoshima et al., 2009) und bei Patientinnen mit Brustkrebs (Hwang et al., 2012). Der Nachweis erfolgte dabei entweder mittels einer spezifischen CK-20 RT-PCR (Soeth et al. 2005; Soeth et al., 1996; Yamaguchi et al., 2000; Retz et al., 2001, Koch et al., 2005) oder mittels Immunhistochemie zum Nachweis von Zytokeratinen (Leinung et al. 2000; Thorban et al., 1996b). Die Nachweisraten von CK-20 im Blut oder Knochenmark variieren dabei sehr stark und sind abhängig von der Methode. So zeigte sich in einer Studie von Fujita (Fujita et al., 2006), in der der Nachweis von CEA, CK19 und CK-20 bei 65 Knochenmarkproben von Patienten mit Ma-

genkarzinom getestet wurde, lediglich eine Nachweisrate von 1,5% für CK-20. In der weiteren Literatur werden dagegen wesentlich höhere Nachweisraten für CK-20 bei unterschiedlichen Tumorentitäten (Pankreaskarzinom, Magenkarzinom, Kolorektalem Karzinom) zwischen 33,8 % und 55% im Blut (Soeth et al., 2005; Funaki et al., 1998; Wyld et al., 1998) und zwischen 11,2% und 35% im Knochenmark (Soeth et al., 2005, Oki et al., 2007, Dardaei et al., 2001) erreicht. Bei Wu et al. (Wu et al., 2006) waren sogar 61,9% der untersuchten Blutproben von Patienten mit Magenkarzinom positiv für CK-20. Studien zum Nachweis von CTC/ DTC mittels CK-20 Nachweis beim Ösophaguskarzinom liegen nur sehr wenige in der Literatur vor und werden in Kapitel 4.2.3 beschrieben.

#### **4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis von CK-20 bei Patienten mit Ösophaguskarzinom**

Ich habe immunhistochemische Färbungen mit dem CK-20 Antikörper CK-20.10 an Kryoschnitten von peritumoralem nicht-neoplastischen Ösophagusgewebe - und korrespondierenden Ösophaguskarzinomgewebe von 8 exemplarischen Patienten durchgeführt. Hier zeigte sich in den Färbungen des peritumoralem nicht-neoplastischen Gewebes in 6/7 Patienten (85,71%) ein Nachweis von CK-20, wobei die Färbung bei den meisten Schnitten (4/6) als stark positiv gewertet wurde. Hierbei handelte es sich jeweils um eine Barrett-Metaplasie für die auch in aktuellen Studien in der Literatur eine starke CK-20 Positivität gezeigt werden konnte (Van Baal et al., 2008). Dieses Ergebnis überrascht somit nicht. Auch im Tumorgewebe konnte bei 7 von 8 Patienten (87,5%) CK-20 nachgewiesen werden, wobei hier die Intensität der Färbung jedoch jeweils nur als schwach gewertet wurde (Siehe Abbildungen 8- 10 und Tabelle 13). Hier ist bemerkenswert, dass bei 4 von 4 Plattenepithelkarzinom-Schnitten ein positiver CK-20 Nachweis gelang, obwohl Plattenepithelkarzinome in der Literatur bisher eher als CK-20 negativ bzw. dieses nur sehr schwach exprimierend galten. Der immunhistochemische Nachweis des Markers CK-20 in Ösophaguskarzinom-Gewebeproben wurde bereits von verschiedenen Studiengruppen überprüft und es liegen heterogene Ergebnisse darüber vor, inwieweit CK-20 von Ösophaguskarzinomzellen (insbesondere Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus) exprimiert wird. Die Arbeitsgruppe von Moll (Moll et al., 1992) testete bereits 1992 Gewebeschnitte von fünf Ösophaguskarzinom-Patienten (jeweils mit Plattenepithelkarzinom des Ösopha-

gus) und konnte nur bei einer Probe (20%) CK-20 nachweisen, wobei auch bei dieser Probe nur ein sehr schwacher Nachweis gelang. Schnitte von Ösophagus-Normalgewebe wurden in dieser Arbeit nicht getestet. Es gelang jedoch ein stark positiver Nachweis von CK-20 in der Magenschleimhaut. In einer Studie von Chu et al. (Chu et al., 2000) zeigt sich bei 14 getesteten Gewebeschnitten von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus bei keinem Patienten ein positiver CK-20 Nachweis (0%).

Auch zu den Adenokarzinomen des Ösophagus liegen in der Literatur verschiedene Studien vor. In der Arbeitsgruppe von Driessen (Driessen et al., 2004) wurde das Verhältnis von CK-7/CK-20 Expression im Vergleich bei Patienten mit Adenokarzinomen des Ösophagus (AEG-Typen I und II), bei subkardialen Adenokarzinomen (AEG-Typ III) und bei Adenokarzinomen des Magens untersucht. Dabei fand sich ein positiver CK-20 Nachweis bei 14 (22%) der 66 Proben von Ösophaguskarzinom-Gewebeschnitten mit AEG-Typ I oder II, bei 10 (13%) der Gewebeschnitte mit AEG-Typ III und bei 15 (20%) der 75 Magenkarzinom-Gewebe. Als positiv wurde eine Färbung in dieser Studie nur dann gewertet, wenn über 50% der Karzinomzellen angefärbt wurden. Eine Aussage über die Anzahl von schwach positiven Färbungen wird in der Studie nicht gemacht, und es wurde auch kein Ösophagus-Normalgewebe untersucht.

Auch Tarniere et al. (Tarniere et al., 2002) untersuchten das Verhältnis von CK-7/CK-20 Expression bei Patienten mit Adenokarzinomen des Magens und des Ösophagus. Es wurden insgesamt Gewebeproben von 85 Patienten mit Adenokarzinomen des Ösophagus mittels eines immunhistochemischen Nachweises getestet. Von diesen 85 Proben zeigten sich insgesamt 15 (17,64%) positiv, während mit der gleichen Nachweismethode bei den Proben von den distalen Adenokarzinomen des Magens 37 (55,2%) von 67 Proben positiv waren. Zu beachten ist, dass auch in dieser Studie das Ergebnis nur dann als positiv gewertet wurde, wenn über 50% der Tumorzellen markiert waren. Schwach oder stark positiv waren in der Studie von Tarniere 59 (69,4%) der 85 getesteten Ösophaguskarzinom-Gewebeschnitte. Ösophagusnormalgewebe wurde auch hier nicht untersucht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in den aktuell vorliegenden Studien zum immunhistochemischen Nachweis von CK-20 an Gewebeproben des Ösophagus nur eine Nachweiserate zwischen 0 und 20% gelingt. Schaut man sich die Studien jedoch genauer an, fällt auf, dass hier oft eine sehr hohe Rate von mindestens 50% der Zellen angefärbt

sein muss, damit das Ergebnis als positiv gewertet wird. Werden auch schwach positive Ergebnisse gezählt, zeigt sich eine wesentlich höhere Nachweisrate z. B. 69,4% bei Tarniere et al. Weiterhin muss betont werden, dass sich in der Literatur bei Plattenepithelkarzinomen noch geringere Nachweisraten zeigen als bei Adenkarzinomen. Warum in der hier vorgelegten Arbeit auch ein klarer Nachweis von CK-20 bei den Plattenepithelkarzinomen gelang, kann durch die unterschiedlichen Nachweismethoden erklärt werden. So wurden in den oben zitierten Arbeiten Paraffinschnitte untersucht, wohingegen in dieser Dissertation Kryoschnitte analysiert werden. Zur Detektion des Markers CK-20 in dieser Arbeit wurde der Anti-CK-20 Antikörper KS 20.10 benutzt; bei Moll wurden die Anti-CK-20 Antikörper KS 20.3, KS 20.5 und KS 20.8 verwendet. Es ist außerdem bemerkenswert, dass auch in der Arbeit von Moll immerhin einer von 5 untersuchten Fällen (20%) CK-20-positiv war. Ebenfalls in der Arbeit von Chu wurde der KS 20.8 Antikörper in Verbindung mit Paraffin-Schnitten verwendet (Moll et al., 1992; Chu et al., 2000). Diese methodischen Unterschiede erklären möglicherweise das in dieser Dissertation beschriebene überraschende Ergebnis. Es ist nicht davon auszugehen, dass es sich bei meinen Ergebnissen um falsch positive Ergebnisse handelt; Um die Frage eindeutig zu klären, ob CK-20 auch bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus exprimiert wird, müssen größere Kollektive mit vergleichbaren Methoden untersucht werden. Die Untersuchung von Kryoschnitten erscheint mir dabei sinnvoller, da Gewebe und Antigene bei diesen eher in seinem nativen Zustand vorliegt.

#### **4.2.3 Nachweis von CK-20 bei Patienten mit Ösophaguskarzinom mittels CK-20 RT-PCR**

In der hier vorliegenden Studie wurden Blutproben von 74 Patienten mit Ösophaguskarzinom mittels CK-20 RT-PCR untersucht, von denen 27 (36,5%) positiv für CK-20 waren. Knochenmarkproben wurden von 61 Patienten untersucht, von denen 19 (31,1%) positiv für CK-20 waren. Entweder im Blut oder im Knochenmark oder doppelt positiv waren 40 (51,9%) der 77 getesteten Patienten (siehe Abbildung 13). Die in dieser Studie erreichten Nachweisraten stimmen sehr gut mit Nachweisraten von CK-20 im Blut und im Knochenmark überein, die in anderen Studien bei unterschiedlichen Tumorentitäten erreicht wurden (siehe Kapitel 4.2.1). So liegen in der Literatur die Nachweisraten von CK-20 im Blut zwi-



schen 33,8% und 55% und die Nachweisraten von CK-20 im Knochenmark zwischen 11,2% und 35%.

Studien zum Nachweis von CTC oder DTC beim Ösophaguskarzinom mit dem Marker CK-20 liegen in der Literatur nur sehr wenige vor: Bei Huang et al. (Huang et al., 2003) wurden Blutproben von 62 Patienten mit gastrointestinalen Tumoren auf das Vorhandensein von CEA, CK19 und CK-20 untersucht. Von den 62 Patienten hatten 6 ein Ösophaguskarzinom, 31 ein Magenkarzinom und 25 ein Kolorektales Karzinom. Insgesamt waren 30 (48,4%) der getesteten Blutproben positiv für CK-20. Es wird jedoch in der Studie nicht erwähnt, wie viele der 6 Patienten mit Ösophaguskarzinom positiv für CK-20 getestet wurden. Diese Studie ist also aufgrund der sehr geringen Patientenzahl und der geringen Stratifizierung der Ergebnisse kaum mit der hier vorliegenden Arbeit zu vergleichen. Ito et al. (Ito et al., 2004) untersuchten Blutproben von 28 Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus auf das Vorhandensein von DTC/CTC. Als Nachweis diente eine real-time quantitative RT-CK-20-PCR sowie eine CEA-PCR aus Vollblutproben. 20 von insgesamt 35 Testpatienten (von denen 11 gesunde Testpersonen und 24 Patienten mit benignen entzündlichen Erkrankungen waren) zeigen in der Studie von Ito et al. schwache Nachweise von CK-20 mRNA in den Blutproben. Von den 28 Blutproben von Ösophaguskarzinom-Patienten waren 7 positiv für CEA mRNA und 4 waren positiv für CK-20. Warum in dieser Studie bei den gesunden Testpersonen überhaupt und sogar eine höhere Nachweisrate für CK-20 gelingt als bei den Patienten mit Ösophaguskarzinom bleibt kritisch zu hinterfragen und stellt einen klaren Schwachpunkt dieser Arbeit dar. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass CK-20 einen sehr unspezifischen Marker zum Nachweis von DTC/CTC beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus darstellt. Ein Marker muss nach Möglichkeit spezifisch für eine Tumorzell disseminierung sein (d. h. er darf bei gesunden Probanden oder Patienten mit entzündlichen Erkrankungen des jeweiligen Organes nicht nachweisbar sein) (Kalthoff et al., 2005).

Schon im Vorfeld dieser Dissertation konnte die Spezifität der hier angewandten CK-20 RT-PCR an einem Kontrollkollektiv gesunder Probanden an unserer Klinik bestätigt werden (Soeth et al., 1996). Für eine aktuelle Arbeit, die ebenfalls, an unserem Institut mit demselben CK-20 Test durchgeführt wurde, wurde das Kontrollkollektiv um weitere 10 Knochenmarkproben und 10 Blutproben erweitert (Hinz et al., 2012). Insgesamt besteht das Kontrollkollektiv, an dem der in dieser Dissertation verwendete PCR-Test validiert worden ist, aus 38 gesunden Spendern, von denen jeweils Blutproben untersucht worden

sind, sowie zusätzlichen 32 Knochenmark- und 30 Blutproben von weiteren 38 Kontrollpatienten. Dieses Kontrollkollektiv setzt sich zusammen aus 6 gesunden Knochenmarkspendern, 8 Leukämiepatienten sowie 24 Patienten mit nicht malignen Erkrankungen (Leberzysten, Leberadenome, Sigmadivertikulitis, FAP, Pankreatitis, Hernien, Ulcera ventriculi und Primär Sklerosierende Cholangitis.) In den insgesamt 68 untersuchten Blutproben und 32 untersuchten Knochenmarkproben wurde CK-20 mRNA bei insgesamt 3 Patienten nachgewiesen (in jeweils 2 Blutproben und 2 Knochenmarkproben). Diese CK-20 positiven Patienten zeigen dabei folgende Erkrankungen. Bei einem Patient mit Leberadenom wurde CK-20 sowohl im Knochenmark als auch im Blut nachgewiesen. Für einen Patienten mit FAP zeigte sich eine positive Knochenmarkprobe. Und ein dritter Patient mit chronischer Pankreatitis zeigte eine CK-20 positive Blutprobe. Keiner der gesunden Spender zeigte eine positive Blut- oder Knochenmarkprobe. Die Spezifität von CK-20 als Marker für eine Tumorzell dissemination wurde weiterhin von vielen Studiengruppen untersucht und bestätigt (Koch et al., 2006; Retz et al., 2000; Funaki et al., 1998). In einer Arbeit von Hermanek et al. (Hermanek et al. 1999) heißt es, durch Immunhistochemische Nachweismethoden sei eine geringere Rate von falsch positiven Ergebnissen zu erreichen als bei der PCR. Diese Aussage wurde in der Literatur oft zitiert, kann aber in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Das Problem bei diesen Studien besteht mit großer Wahrscheinlichkeit darin, dass oft PCR-Analysen an Vollblutproben durchgeführt worden sind. In Vollblutproben ist jedoch noch eine Subpopulation von Granulozyten enthalten, die CK-20 exprimieren (Jung et al., 1999) und auch bei gesunden Probanden vorhanden sind. Durch die Ficoll-Dichtekissenzentrifugation lassen sich diese Zellen jedoch abtrennen und gelangen ins Pellet und sind somit für die hier vorliegende Arbeit unerheblich, da hier eine Ficoll-Dichtekissenzentrifugation durchgeführt wurde. Die Spezifität des Markers CK-20 zum Nachweis einer Tumorzell dissemination ist somit mit den von uns durchgeführten Nachweismethoden als sehr hoch einzustufen.

An dieser Stelle kann zusammengefasst werden, dass in der Literatur nur eine sehr geringe Anzahl von Studien vorliegt, die mit dem Marker CK-20 zum Nachweis von CTC und DTC beim Ösophaguskarzinom arbeiten. Die publizierten Studien weisen zudem nur sehr geringe Patientenzahlen auf. Daher wird in der hier vorliegende Arbeit zum ersten Mal der Marker CK-20 an einem größeren Kollektiv von Patienten mit Ösophaguskarzinom evaluiert. Aufgrund der geringen Anzahl entsprechender Studien sind unsere Ergebnisse derzeit nur schwer zu vergleichen. Weitere Studien an größeren Kollektiven sollten durchgeführt

werden, um eine verlässliche Aussage über diese Methode bei Patienten mit Ösophaguskarzinom treffen zu können.

### **4.3 Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit Ösophaguskarzinom und deren Einfluss auf das Überleben**

#### **4.3.1 Nachweisraten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark bei Patienten mit Ösophaguskarzinom**

In dieser Arbeit wurden DTC im Knochenmark bei 19 (31,1%) von 61 Patienten nachgewiesen (vgl. Abb. 13). Dies stimmt sehr gut mit aktuellen Daten aus der Literatur überein. So heißt es in einem Review von Pantel et al., dass DTC im Knochenmark in 20 bis 40 % aller Patienten selbst in Studien, in denen nur N0 oder nur M0 diagnostizierte Patienten eingeschlossen wurden, nachgewiesen werden (Pantel et al., 2004). In meiner Studie ist die Nachweisrate von CTC im Blut etwas höher als die Nachweisrate von DTC im Knochenmark. Hier gibt es widersprüchliche Daten in der Literatur. Bisher wurde in den meisten Studien ein höherer Prozentsatz von Tumorzellen im Knochenmark als im Blut nachgewiesen (wobei es nur sehr wenige Studien gibt, die direkt den Nachweis von DTC/CTC im Knochenmark und im Blut vergleichen) (Pantel et al., 2008). Man geht daher davon aus, dass die Bedingungen für disseminierte Tumorzellen im Knochenmark besser sind als im Blut, wo sie als zirkulierende Tumorzellen nur kurz überdauern (Pantel et al., 2008).

In meiner Studie wurden die Knochenmarkproben am rechten Beckenkamm punktiert (siehe Kapitel 2.2). Eine Arbeitsgruppe von Bonavina et al. (Bonavina et al., 2001) untersuchte im Vergleich Knochenmarkproben aus dem Beckenkamm sowie resezierte gespülte Rippen von Patienten mit Ösophaguskarzinom. Von 48 gespülten, resezierten Rippen waren 38 (79,1%) positiv für Zytokeratine in der Immunhistochemie. Bei 25 Patienten wurden Knochenmark-Aspirat und die gespülten resezierten Rippen verglichen. Davon hatten 18 einen positiven Nachweis in der gespülten Rippe. Von diesen 18 hatten lediglich 2 ein positives Knochenmark-Aspirat. Die Autoren schließen daraus, dass die resezierte, gespülte Rippe sich besser zum Nachweis von DTC eignet. In der Praxis ist diese Methode jedoch sehr aufwändig und invasiv und somit als Routine-Untersuchung nicht zu empfehlen. Wei-

terhin sollte betont werden, dass es in der Studie von Bonavina et al. lediglich um die Nachweisraten von DTC geht, deren Einfluss auf das Überleben wird dabei nicht untersucht. Es bleibt somit offen, ob die Patienten, bei denen in der gespülten resezierten Rippe ein Nachweis von DTC gelang, ein kürzeres Überleben hatten als die Patienten, bei denen keine DTC nachgewiesen wurden. Außerdem müsste die Spezifität der Methode überprüft werden z. B. an gesunden Spendern und Patienten mit entzündlichen Erkrankungen. Eine derartig invasive Untersuchung bei gesunden Patienten wäre jedoch ethisch und ärztlich nicht zu rechtfertigen.

#### **4.3.2 Die Korrelation zwischen dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und bestimmten klinischen Parametern**

In dieser Arbeit konnte keine Korrelation (mittels Chi-Quadrat-Test) zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und dem UICC-Stadium, der TNM-Kategorie, dem Geschlecht, der histologischen Tumorart, der Rezidivhäufigkeit und der Häufigkeit einer neoadjuvanten Chemotherapie gezeigt werden (siehe Tabelle 14). Auch in anderen Studien in der Literatur gelingt oft nicht der Nachweis einer Korrelation zwischen DTC im Knochenmark und den untersuchten klinischen Parametern bei Patienten mit Ösophaguskarzinom. So konnte in der Arbeitsgruppe von Thorban et al. (Thorbán et al., 1996a), die bereits 1996 Knochenmarkproben von 90 Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus auf das Vorhandensein von DTC untersuchte, ebenfalls keine Korrelation zwischen dem UICC-Stadium und der Präsenz von DTC im Knochenmark nachgewiesen werden. Schon 4 der 8 Patienten mit Stadium I hatten in der Arbeit von Thorban et al. DTC im Knochenmark. Die Autoren erklären dieses Phänomen damit, dass eine Tumorzeldisseminierung schon in einem sehr frühen Tumorstadium möglich sei und somit viel früher beginne als bisher angenommen. In einer anderen Arbeit von (Ryan et al., 2004) wurden Knochenmarkproben von 106 Patienten mit Ösophaguskarzinom auf das Vorhandensein von DTC untersucht. Hier konnte genau wie in unserer Studie keine Korrelation zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und dem UICC-Stadium sowie dem histologischen Typ nachgewiesen werden. Noguchi et al. (Noguchi et al., 2003) untersuchten Knochenmarkproben (aus den Rippen) von 24 Patienten mit Ösophaguskarzinom auf das Vorhandensein von DTC. Auch bei Noguchi et al. konnte keine Korrelation zwischen dem Nach-

weis von DTC im Knochenmark und den untersuchten klinischen Parametern (Alter, Geschlecht, Tumor-Lokalisation, TNM-Kategorie, UICC-Stadium, Lymphgefäßinvasion und Blutgefäßinvasion) nachgewiesen werden. In einer Studie von Inoue (Inoue et al., 2004) wurden Knochenmarkproben von 57 Patienten mit Ösophaguskarzinom auf CEA mRNA zum Nachweis von DTC untersucht. Es wurde auch in dieser Studie keine Korrelation zwischen der CEA-Positivität und den untersuchten klinischen Parametern (Alter, Geschlecht, Histologie, Operationsradikalität, TNM-Kategorie, UICC-Stadium) nachgewiesen. Es zeigte sich jedoch auch hier wie schon bei Thorban et al. eine sehr hohe Rate von DTC im Knochenmark bei Patienten mit UICC-Stadium I (4/6). Die Autoren schließen daraus, dass es möglich sei, dass DTC im Knochenmark „keine biologische Bedeutung“ haben. Sie untersuchten jedoch in ihrem Patientenkollektiv nicht den Einfluss von DTC auf das Überleben, und auch die Rezidivhäufigkeit von Patienten mit und ohne DTC wurde nicht analysiert. Eine Aussage über die biologische und die klinische Bedeutung von DTC ist somit anhand dieser Studie kaum möglich. In unserem Patientenkollektiv konnte keine erhöhte Nachweisrate von DTC für Patienten mit UICC-Stadium I gezeigt werden. Es fällt jedoch die relativ hohe Nachweisrate von DTC für Patienten mit Stadium II verglichen mit Stadium III Patienten auf. So zeigt sich bei 10 (41,67%) der 24 Patienten mit Stadium II DTC im Knochenmark, während nur bei 3 (20%) der 15 Patienten mit Stadium III DTC im Knochenmark nachgewiesen wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die höhere Rate von neoadjuvanten Therapien ab dem UICC-Stadium III (siehe Kapitel 1.2.4). In unserem Patientenkollektiv wurden von den insgesamt 28 Stadium II Patienten nur 11 (39,29%) mit einer neoadjuvanten Therapie behandelt, während von den 19 Stadium III Patienten 9 (47,37%) mit einer neoadjuvanten Chemotherapie behandelt worden sind. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass für das Ösophaguskarzinom in dieser Arbeit sowie in den meisten Arbeiten in der Literatur keine Korrelation zwischen dem Nachweis von DTC und den untersuchten klinischen Parametern nachgewiesen werden kann. Schon bei Patienten mit frühen Tumorstadien werden oft DTC im Knochenmark nachgewiesen. Daraus lässt sich jedoch keine Aussage über die Qualität der DTC und damit darüber treffen, ob die DTC im Knochenmark einen Einfluss auf das Überleben und die Rezidivhäufigkeit der betroffenen Patienten haben.

### **4.3.3 Zusammenhang zwischen dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und dem Überleben**

Ich konnte in meiner Arbeit für Patienten mit Ösophaguskarzinom eine Korrelation zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und dem Überleben aufzeigen: Im untersuchten Patientenkollektiv besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und dem Gesamtüberleben ( $p=0,029$ ) sowie dem tumorspezifischen Überleben ( $p=0,048$ ) (Vgl. Abb.15 a und c). Der Zusammenhang zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und dem rezidivfreien Überleben ist gerade nicht signifikant, zeigt jedoch eine deutliche Tendenz ( $p=0,061$ ) wie auch der Verlauf der Kaplan Meier Graphik in Abb. 15 b zeigt. Die Patienten mit DTC im Knochenmark leben in meiner Studie deutlich kürzer. So leben von den Patienten mit DTC im Knochenmark nach fünf Jahren nur noch 16,19%, von den Patienten, bei denen keine DTC nachgewiesen worden, leben dagegen noch 43,09%. Weiterhin stellt der Nachweis von DTC im Knochenmark in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse für mein Patientenkollektiv einen unabhängigen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben ( $p=0,006$ ) und für das tumorspezifische Überleben ( $p=0,013$ ) dar (vgl. Tabelle 21 und 23).

Ein negativer Einfluss von DTC im Knochenmark auf das Überleben konnte bereits für Patienten mit Brustkrebs (Wiedswang et al., 2003), mit Lungenkrebs (Cote et al., 1995) mit Kolorektalem Karzinom (Lindemann et al., 1992) und Pankreaskarzinom (Roder et al., 1999) gezeigt werden. Auch für Patienten mit Ösophaguskarzinom konnte in anderen Studien bereits ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von DTC im Knochenmark und einem kürzerem Überleben nachgewiesen werden: So zeigte sich auch in der Studie von Thorban et al. (Thorbán et al., 1996a) für die Patienten, bei denen DTC im Knochenmark nachgewiesen wurden, ein kürzeres Gesamtüberleben ( $p=0,036$ ) als bei den Patienten ohne Nachweis von DTC. Zytokeratin positive Patienten haben in der Studie von Thorban et al. zudem eine höhere Rezidivrate ( $p=0,019$ ) als Zytokeratin negative. In einer Studie von Kaifi (Kaifi et al., 2005) wurden Knochenmarkproben von 136 Patienten mit Ösophaguskarzinom untersucht, von denen sich bei 60 (44%) DTC im Knochenmark zeigten. Die Kaplan-Meier-Analyse ergab, dass der Nachweis von DTC im Knochenmark einen negativen Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben und dem tumorspezifischen Überleben hatte. Eine Arbeitsgruppe von Stöcklein (Stöcklein et al., 2008) untersuchte 104 Knochenmarkproben von Patienten mit Ösophaguskarzinom auf das Vorhandensein von DTC.

In dieser Studie konnte zwar kein signifikanter Zusammenhang von DTC im Knochenmark auf dem Überleben nachgewiesen werden ( $p=0,134$ ), es wurden jedoch weitere Analysen an den isolierten Tumorzellen durchgeführt. Hier zeigte sich, dass Patienten, bei denen auf den DTC eine Her2-Rezeptor Überexpression vorlag, kürzer überlebten als alle anderen Patienten mit DTC ( $p=0,032$ ).

In den meisten Studien für Patienten mit Ösophaguskarzinom, in denen der Einfluss von DTC im Knochenmark auf das Überleben untersucht wurde, konnte also, wie in meiner Arbeit auch, ein negativer Zusammenhang von DTC mit dem Überleben nachgewiesen werden. Weitere Studien an größeren Patientenkollektiven mit Ösophaguskarzinom sind notwendig, um diese Befunde zu verifizieren.

Auch spezifische Rezeptor-Expressionsmuster der DTC haben einen Einfluss auf das Überleben bei Patienten mit Ösophaguskarzinom. Dieses Ergebnis ist von besonderer Bedeutung, da sich hieraus im besten Falle neue Zieltherapien für Patienten mit Ösophaguskarzinom ableiten ließen (siehe Kapitel 4.5).

#### **4.3.4 Zusammenhang zwischen dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen und Überleben in unterschiedlichen Stadien**

In dieser Arbeit wurde zusätzlich für unterschiedliche Subkollektive (N0-Patienten, Patienten, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben, Stadium I und II und Stadium III und IV Patienten) jeweils der Zusammenhang zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und dem Überleben berechnet, weil sich daraus möglicherweise weitere für die klinische Behandlung der Patienten wichtige Aspekte ergeben könnten.

Für das Subkollektiv der 34 Patienten ohne Lymphknotenmetastasen zeigte sich ähnlich wie für das Patientenkollektiv R0 ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und dem Gesamtüberleben ( $p=0,031$ ) sowie dem tumorspezifischen Überleben ( $p=0,031$ ), wobei die Gruppe mit Nachweis von DTC im Knochenmark ein deutlich kürzeres Überleben hat (vgl. Abb. 16 a und c). Für das Subkollektiv der 44 Patienten mit Stadium I oder II zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und dem Gesamtüberleben ( $p=0,023$ ) (siehe Abb. 17a). Die Zusammenhänge zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,053$ ) und dem tumorspezifischen Überleben

( $p=0,066$ ) sind dagegen gerade nicht signifikant, zeigen jedoch eine sehr deutliche Tendenz wie auch die entsprechenden Graphiken unterstreichen (vgl. Abb. 17 b und c). Gerade für diese Subkollektive der Patienten mit frühen UICC-Stadien sowie der Patienten ohne Lymphknotenmetastasen ist die Feststellung eines signifikanten Zusammenhanges zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und dem Überleben besonders interessant und klinisch bedeutsam, da diese Patienten normalerweise keine adjuvanten Therapien erhalten (Zhang et al., 2012). Es erscheint somit möglich, über den Nachweis von DTC im Knochenmark die Patienten zu identifizieren, die von einer adjuvanten Therapie profitieren würden und eventuell über eine genauere Analyse der DTC spezielle zielgerichtete Substanzen (sogenannte target therapy) zu entwickeln und somit die Prognose dieser Patienten weiter zu verbessern (siehe Kapitel 4.5).

Im Gegensatz zu dem Patientenkollektiv mit frühen Tumorstadien zeigt sich für das Subkollektiv der 29 Patienten mit UICC-Stadium III und IV kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und dem Gesamtüberleben ( $p=0,217$ ), dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,337$ ) und dem tumorspezifischen Überleben ( $p=0,169$ ) (siehe auch Abb. 19). Das könnte daran liegen, dass es bei diesen Patienten, die schon Lymphknoten- oder Fernmetastasen aufweisen, für die Prognose nur eine untergeordnete Rolle spielt, ob sie auch DTC im Knochenmark aufweisen. Trotzdem leben aus diesem Kollektiv ohne DTC nach 5 Jahren noch 20,03% der Patienten, während von den Patienten mit DTC bereits nach 39 Monaten 100% verstorben sind (vgl. Abb. 19 a).

Es kann also zusammengefasst werden, dass DTC im Knochenmark im von mir untersuchten Patientenkollektiv für die frühen UICC-Stadien einen prognostischen Faktor darstellen, für die Patienten mit späten UICC-Stadien konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von DTC und dem Überleben festgestellt werden. Dieses Ergebnis wird auch durch andere Studien in der Literatur bestätigt (Bidard et al., 2008).

#### **4.3.5 Zusammenhang zwischen Tumorzell dissemination und einer (neo)adjuvanten Therapie**

Für das Subkollektiv der 49 Patienten, die keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten haben, besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und dem Gesamtüberleben ( $p=0,013$ ), dem rezidivfreien Überleben



( $p=0,019$ ) und dem tumorspezifischen Überleben ( $p=0,041$ ) (siehe Abb. 21). Die 5-JÜR für die Patienten ohne DTC im Knochenmark liegt bei 59,95 % während sie für die Patienten, bei denen DTC im Knochenmark nachgewiesen wurden, bei 12,37% liegt. Von den Patienten mit DTC im Knochenmark ist in diesem Subkollektiv nach 30 Monaten (auch tumorspezifisch) die Hälfte der Patienten verstorben bei den Patienten ohne DTC ist das erst nach 75 Monaten geschehen (auch tumorspezifisch). Bereits nach 24 Monaten hat die Hälfte aller Patienten mit DTC im Knochenmark ein Rezidiv erlitten oder ist verstorben, bei den Patienten ohne DTC im Knochenmark ist das erst nach 73 Monaten der Fall.

Es kann somit festgehalten werden, dass für das Patientenkollektiv ohne neoadjuvante Chemotherapie insgesamt deutlichere Ergebnisse erzielt werden können, die einen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark mit einer kürzeren Überlebenschance signifikant nachweisen als für das gesamte Patientenkollektiv. Dies ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass die DTC im Knochenmark durch eine neoadjuvante Chemotherapie teilweise eliminiert werden können. So wurde z. B. in einer Studie von Braun (Braun et al., 2000) der Effekt einer adjuvanten Chemotherapie auf DTC im Knochenmark untersucht. Dazu wurden Knochenmarkproben von 59 Brustkrebspatientinnen vor und nach der Chemotherapie auf DTC untersucht. Von den 29 Proben, die vor der Chemotherapie positiv für DTC gewesen waren, zeigten sich 14 (48,3%) nach der Chemotherapie negativ. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass DTC auch durch eine Chemotherapie nicht vollständig eliminiert werden. Es muss jedoch betont werden, dass in dieser Studie in fast bei der Hälfte der zuvor positiven Proben die DTC durch die Chemotherapie eliminiert werden konnten. In einer Arbeit von Ryan et al. (Ryan et al., 2003) konnte kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und einer neoadjuvanten Chemotherapie gezeigt werden. In dieser Arbeit wurden Knochenmarkproben von 106 Patienten mit Ösophagus- oder Magenkarzinom auf das Vorhandensein von DTC untersucht, von denen 55 eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten während 51 nur operativ behandelt worden waren. 23 (42%) der 55 Patienten, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten, zeigten einen positiven Nachweis. Von den Patienten, die nur eine operative Therapie erhalten hatten, waren 34 (67%) der 51 Proben positiv. Eine mögliche Korrelation zwischen dem Nachweis von DTC im Knochenmark und dem Therapiekonzept erwies sich dabei jedoch als nicht signifikant. Ryan et al. konnten weiterhin nachweisen, dass sich bei Patienten, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten, in 10 von 18 Zellkulturen aus DTC von Knochenmarkproben vitale Zellen nach-

weisen ließen. Die Autoren schlossen daraus, dass es sehr viele DTC gäbe, die gegen die gängigen Therapiekonzepte resistent seien. Auch andere Autoren (Müller et al., 2005) kommen zu dem Schluss, dass ein Großteil der DTC nicht durch die gängigen Chemotherapeutika eliminiert werde.

Es kann zusammengefasst werden, dass bereits in vielen Studien nachgewiesen wurde, dass nicht alle DTC durch die gängigen Chemotherapeutika eliminiert werden können, trotzdem wird jedoch immerhin ein Teil der zuvor positiven Proben nach der Chemotherapie negativ getestet. In meiner Studie konnte ich wesentlich deutlichere Ergebnisse für das Patientenkollektiv erzielen, welches zuvor keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatte (besonders auch für das rezidivfreie Überleben). Daraus kann geschlossen werden, dass in zukünftigen Studien, die den Zusammenhang zwischen DTC und dem Überleben untersuchen, die Knochenmarkproben auch vor Beginn der Chemotherapie und nicht wie in unserer Studie nur vor der Operation entnommen werden sollten, um so eine Beeinflussung der Ergebnisse zu verhindern. Da gerade die Patienten, bei denen nach der Chemotherapie weiterhin DTC im Knochenmark vorhanden sind, eine besonders schlechte Prognose haben (Braun et al., 2000), kann man weiterhin daraus schließen, dass diese Patienten ebenfalls identifiziert werden sollten, um andere Therapiekonzepte zu erhalten (siehe auch Kapitel 4.5). D. h. es sollte sowohl vor als auch nach der eventuellen Chemotherapie eine Knochenmarkspunktion erfolgen.

#### **4.4 Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im Blut bei Patienten mit Ösophaguskarzinom und deren Einfluss auf das Überleben**

##### **4.4.1 Detektionsraten von zirkulierenden Tumorzellen im Blut bei Patienten mit Ösophaguskarzinom**

In dieser Arbeit wurden CTC bei 27 (36,5%) von 74 Blutproben von Patienten mit Ösophaguskarzinom nachgewiesen. Dies stimmt sehr gut mit Daten aus verschiedenen Studien in der Literatur überein, in denen die Detektionsraten von CTC bei Patienten mit Ösophaguskarzinom zwischen 28,6% und 57,4% liegen (Kagonoi et al, 2004; Nakashima et al.2003; Hashimoto et al., 2008). In unserer Studie erfolgte der Nachweis von CTC im Blut

bei Patienten mit Ösophaguskarzinom mittels CK-20 RT-PCR. In den meisten entsprechenden Studien in der Literatur wird mit einem Nachweis von CEA mRNA gearbeitet (Hashimoto et al., 2008; Nakashima et al., 2003; Setoyama et al., 2006; Liu et al., 2007). In anderen Studien erfolgt der Nachweis von CTC über einem Nachweis von squamos cell carcinoma antigen (SCAA) (Kagonoi et al., 2004) oder Survivin (Hoffmann et al., 2010; Cao et al., 2009). Nur sehr selten erfolgt der Nachweis von CTC beim Ösophaguskarzinom dagegen über einen Nachweis von Zytokeratinen (Huang et al., 2003).

#### **4.4.2 Die Korrelation zwischen dem Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen und bestimmten untersuchten klinischen Parametern**

In dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen dem Nachweis von CTC im Blut und dem UICC-Stadium, der TNM-Kategorie, dem Geschlecht, der histologischen Tumorart, der Rezidivhäufigkeit und der Häufigkeit einer neoadjuvanten Chemotherapie festgestellt werden (siehe Tabelle 15). In anderen Studien in der Literatur, in denen jeweils der Zusammenhang zwischen dem Nachweis von CTC im Blut bei Patienten mit Ösophaguskarzinom und bestimmten klinischen Parametern untersucht wird, zeigt sich dagegen eine Korrelation zwischen dem Nachweis von CTC im Blut und dem UICC-Stadium (Kagonoi et al, 2004; Setoyame et al., 2006; Nakashima et al., 2003), der N-Kategorie (Setoyame et al., 2006; Nakashima et al.2003), dem Geschlecht (Setoyame et al., 2006) sowie der Tumoringressionstiefe (Kagonoi et al, 2004; Setoyame et al., 2006). In der hier vorliegenden Studie fällt die relativ hohe Nachweisrate von CK-20 im Blut bei Stadium IV Patienten auf. So haben von den 10 Patienten mit Fernmetastasen insgesamt 6 (60%) einen positiven CK-20 Nachweis im Blut, während bei den 63 Patienten ohne Fernmetastasen nur bei 21 (33,3%) ein Nachweis von CK-20 im Blut gelang.

Es kann somit festgehalten werden, dass in den meisten Studien ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von CTC im Blut und bestimmten klinischen Parametern wie dem UICC-Stadium und der N-Kategorie besteht. In der hier vorliegenden Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von CTC im Blut und den untersuchten klinischen Parametern gezeigt werden. Es fiel jedoch eine erhöhte Nachweisrate von CTC bei Patienten mit Fernmetastasen auf. Außerdem zeigte sich in unserer Studie eine Assoziation zwischen dem CK-20 Nachweis im Blut und/ oder im Knochen-

mark und dem UICC-Stadium ( $p=0,038$ ) (siehe Tabelle 16). Es ist also möglich, dass da die CTC im Blut nur kurz überdauern können und sie somit nur eine Momentaufnahme darstellen, hier keine Assoziation nachgewiesen werden konnte. Betrachtet man aber sowohl die CTC im Blut als auch die DTC im Knochenmark, kann eine Assoziation zum UICC-Stadium gezeigt werden, wobei die Nachweisrate bei Stadium IV Patienten deutlich erhöht ist. Es ist somit also möglich, dass die von uns nachgewiesenen CTC lediglich eine Momentaufnahme darstellen. Dass sie sich also lediglich kurzfristig z. B. von den Metastasen oder vom Primärtumor gelöst haben. Eine weitere Analyse der CTC wäre hilfreich, um eine genauere Aussage über diese Tumorzellen treffen zu können.

#### **4.4.3 Zusammenhang zwischen dem Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen und dem Überleben**

In dem von mir untersuchten Patientenkollektiv konnte kein signifikanter Einfluss der CTC im Blut auf das Überleben festgestellt werden. Der Zusammenhang zwischen dem Nachweis von CTC im Blut und dem Gesamtüberleben ( $p=0,936$ ), zwischen dem Nachweis von CTC im Blut und dem rezidivfreien Überleben ( $p=0,919$ ) und zwischen dem Nachweis von CTC im Blut und dem tumorspezifischen Überleben ( $p=0,69$ ) ist jeweils nicht signifikant. Es zeigt sich sogar für die CK-20 positiven Patienten eine etwas höhere 5-JÜR von 32,11%, während die 5-JÜR der CK-20 negativen Patienten nur bei 31,45% liegt (vgl. Abb. 14).

Im Gegensatz dazu wird in fast allen Studien in der Literatur, die den prognostischen Einfluss von CTC bei Patienten mit Ösophaguskarzinom auf das Überleben untersuchen, ein negativer Einfluss von CTC auf das Überleben nachgewiesen. So wurden z. B. in der Arbeitsgruppe von Kagonoi et al. (Kagonoi et al., 2004) Blutproben von 70 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus auf CTC untersucht. Das rezidivfreie Überleben ( $p=0,008$ ) und das Gesamtüberleben ( $p=0,032$ ) waren dabei signifikant kürzer für die Patienten, bei denen CTC im Blut nachgewiesen wurden, als für die negativen Patienten. In einer Arbeitsgruppe von Setoyama (Setoyama et al., 2006) wurden Blutproben von 106 Patienten mit Karzinomen des Ösophagus mittels RT-PCR für CEA mRNA untersucht. Auch in dieser Studie haben die Patienten, bei denen ein Nachweis von CTC gelang, ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben ( $p<0,001$ ). Die CEA-Positivität stellt dabei

außerdem einen unabhängigen prognostischen Faktor für das rezidivfreie Überleben dar ( $p=0,002$ ). Bei Nakashima et al. (Nakashima et al., 2003) wurden Blutproben von 54 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus, die eine R0-Resektion erhalten hatten, mittel RT-PCR für CEA mRNA untersucht. CEA positive Patienten weisen in dieser Studie eine höhere Rezidivrate auf ( $P=0,036$ ). So erleiden 21 der 31 Patienten mit CTC-Nachweis ein Rezidiv, von den 23 CEA negativen Patienten erleiden dagegen nur 9 ein Rezidiv.

Es gibt jedoch auch viele Arbeiten in der Literatur, bei denen sich CTC im Gegensatz zu DTZ nicht prognostisch auf das Überleben bei Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten auswirken: Bereits 1997 konnte in einer Studie von Soeth et al. (Soeth et al., 1997) gezeigt werden, dass der Nachweis von DTC im Knochenmark für Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen prognostisch relevant für das Überleben ist, der Nachweis von CTC im Blut jedoch nicht. Auch in Studien, in denen DTC im Vergleich zu CTC bei Brustkrebspatientinnen untersucht wurde, konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. So zeigte sich z. B. in einer Studie von Wiedswang (Wiedswang et al., 2006) für ein Kollektiv von 341 Patientinnen mit Brustkrebs, dass der Nachweis von DTC einen signifikanten Zusammenhang mit dem tumorspezifischen Überleben hat, der Nachweis von CTC im Blut dagegen nicht. Benoy et al. (Benoy et al., 2006) untersuchten bei 148 Patientinnen mit Brustkrebs im Vergleich die Auswirkung von DTC im Knochenmark und von CTC im Blut auf das Überleben. Es zeigte sich auch dort, dass sich das Vorhandensein von DTC im Knochenmark negativ auf das Überleben auswirkt. Das Vorhandensein von CTC im Blut zeigte dagegen keinen Einfluss auf das Überleben. Eine Erklärung der Autoren hierfür ist, dass die Detektion von DTC im Knochenmark möglicherweise weniger abhängig vom Zeitpunkt der Entnahme sei, da die Zellen hier längere Zeit überdauern, und dass das Knochenmark eventuell als ein Filterorgan für die DTC im Blut fungiere (Soeth et al., 1997; Benoy et al., 2006).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass im Gegensatz zu unserer Studie in den meisten Studien in der Literatur, ein negativer Einfluss von CTC im Blut auf das Überleben bei Patienten mit Ösophaguskarzinom nachgewiesen wird. Eventuell ist für die in meiner Arbeit dargestellten Ergebnisse der Zeitpunkt der Probenentnahme verantwortlich, da die Blutproben erst kurz vor der Operation und damit nach einer eventuellen neoadjuvanten Chemotherapie entnommen wurden, was die Ergebnisse eventuell beeinflusst hat. Es ist weiterhin denkbar, dass der Nachweis von CTC, da CTC lediglich einen passageren

Zustand darstellen (Pantel et al., 2008) und die Tumorzellen im Blut nur kurz überdauern, gar keinen Einfluss auf das Überleben hat und somit die Ergebnisse der zuvor zitierten Studien hinterfragt werden müssen. So hat in vielen Studien in der Literatur der Nachweis von DTC im Knochenmark wie auch in unserer Studie einen stärkeren Einfluss auf das Überleben als der Nachweis von CTC im Blut. Die Halbwertszeit von CTC im Blut ist nur kurz und stellt somit nur eine Momentaufnahme dar. In einer Studie von Meng konnte für Brustkrebspatientinnen nach Operation eine Halbwertszeit der CTC im Blut von 1 bis 2,4h nachgewiesen werden (Meng et al., 2004). Weiterhin wurde in mehreren Arbeiten belegt, dass sich die Anzahl von CTC im Blut direkt nach der Operation erhöht (Ikeguchi et al., 2005; Liu et al., 2007). Das bedeutet also, dass es sich bei diesen Zellen teilweise lediglich um Zellen handelt, die sich während der Operation vom Primärtumor gelöst haben und in sehr kurzer Zeit zu Grunde gehen werden (Ikeguchi et al., 2005). Es sind weitere Studien an größeren Patientenkollektiven mit Ösophaguskarzinom notwendig, um die Bedeutung von CTC bei Patienten mit Ösophaguskarzinom klären zu können. Stellen diese nur einen passageren Befund im Blut dar oder sind sie Ausdruck von einer erhöhten Rezidiv- und Metastasierungswahrscheinlichkeit? In meiner Studie kommen wir zu dem Schluss, dass die CTC im Blut nur eine Momentaufnahme darstellen und somit keinen Einfluss auf das Überleben und die Rezidivhäufigkeit der Patienten haben.

## **4.5 Ausblick**

Sollte der Nachweis von isolierten Tumorzellen mit in die UICC-Klassifikation für das Ösophaguskarzinom aufgenommen werden? Bisher fließt nur der TNM-Status, das Grading und die R-Kategorie mit in die Stadieneinteilung und somit in die Beurteilung der Prognose und des Therapiekonzeptes ein. Es wird schon lange diskutiert, ob auch die isolierten Tumorzellen mit in die Klassifizierung aufgenommen werden sollen, weil in der aktuellen Stadieneinteilung bei vielen Patienten mit gastrointestinalen Tumoren ein anscheinend zu niedriges Stadium diagnostiziert wird, was dazu führt, dass es sogar bei Patienten mit frühen Tumorstadien nach kurativer Resektion zum Auftreten von Rezidiven kommt (Wolfrum et al., 2005). Für andere Tumorentitäten wurden bereits isolierte Tumorzellen oder Mikrometastasen in den Lymphknoten nach Wächterlymphknotenresektion in die UICC-Klassifizierung mit aufgenommen. So wurde für die Stadieneinteilung beim

Mammakarzinom der Nachweis von isolierten Tumorzellen in sonst tumorfreien Lymphknoten als N0(i+) und N0 (mol+) mit in die N-Kategorie aufgenommen, wobei (i+) für den morphologischen Nachweis der isolierten Tumorzelle z. B. durch eine Immunhistochemie steht, während (mol+) den nicht morphologischen Nachweis also z. B. durch PCR beschreibt (Singletary et al., 2002). Für das Melanom ist das Vorhandensein von Mikrometastasen (nicht von isolierten Tumorzellen) in untersuchten Wächterlymphknoten ebenfalls in die UICC-Klassifizierung mit aufgenommen worden (Gershenwald et al., 2010). Beim Ösophaguskarzinom ist das noch nicht der Fall, denn es liegen nur wenige Studien an relativ kleinen Patientenkollektiven für das Ösophaguskarzinom vor. Es sollten weitere Studien an größeren Patientenkollektiven durchgeführt werden, um den Einfluss von DTC und CTC auf die Prognose bei Patienten mit Ösophaguskarzinom einschätzen zu können, erst dann kann über eine Modifikation der Stadieneinteilung nachgedacht werden. Außerdem müssen einheitliche Methoden zur Bestimmung von DTC im Knochenmark und CTC im Blut bei Patienten mit Ösophaguskarzinom festgelegt werden. Es ist generell ein Problem der Studien über Tumorzell dissemination bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren, dass keine einheitlichen Standards vorliegen (Wolfrum et al., 2005). Es sollten weitere Studien an größeren Patientengruppen mit vergleichbaren Methoden durchgeführt werden (Wolfrum et al., 2005). Für Patientinnen mit Brustkrebs wurde durch einen Konsensus bereits eine Methode zur Bestimmung von DTC im Knochenmark vorgeschlagen (Riethdorf et al., 2008). Diese sieht eine immunhistochemische Bestimmung mit dem Pan-Zytokeratin-Antikörper A45-B/B3 vor. Das Vorhandensein von DTC und CTC wird zur Einschätzung der Prognose standardisiert durch das Cell-Search-System bereits bei Brustkrebs-, Prostatakarzinom- sowie Kolorektalkarzinom-Patienten herangezogen (Van de Stolpe et al., 2011).

Wie sinnvoll ist die Bestimmung von DTC/ CTC in der Praxis? Bisher hat sich noch keine Methode zur Bestimmung von DTC in der Klinik etabliert (Pantel et al., 2008). Meist sind die Methoden sehr zeit- und kostenaufwändig. Die Frage ist auch, ob sich aus der Bestimmung von CTC und DTC bestimmte Zieltherapien für die Zukunft ergeben? So können sich z. B. durch eine weitere Analyse der Eigenschaften von isolierten Tumorzellen und deren Antigenstrukturen gezielte sekundäre adjuvante Therapien (targeted therapy) ergeben, die die Prognose der betroffenen Patienten erheblich verbessern könnten. Dies konnte bereits für Patientinnen mit Brustkrebs gezeigt werden. Hier stellt der Her2-Rezeptor eine

Zielstruktur für eine Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab dar, wodurch sich die Prognose für Patientinnen mit Her2-Rezeptor-positivem Mammakarzinom deutlich verbessert hat (Jelovac et al., 2012). Auch für Patienten mit Ösophaguskarzinom konnte bereits gezeigt werden, dass ein Nachweis des Her2-Rezeptors an DTC einen negativen Einfluss auf das Überleben hat (Stöcklein et al., 2008). Ein wichtiges Ziel der Forschung an CTC und DTC ist es also, die Eigenschaften der isolierten Tumorzellen zu untersuchen und sie durch zielgerichtete Substanzen, die mit in ein multimodales Therapiekonzept eingeschlossen werden, zu eliminieren. Bisher werden die Eigenschaften der Tumorzellen häufig an Gewebeproben vom Primärtumor oder Metastasen untersucht. Diese Untersuchung von Primärtumoren auf bestimmte Eigenschaften widerspricht dabei dem eigentlichen Prozess der Krebsentstehung und Metastasierung (Stöcklein et al., 2008), bei dem es erst durch die Ablösung der isolierten Zelle vom Primärtumor zur Entstehung von Metastasen kommen kann (Chambers et al., 2002). Außerdem wäre eine Untersuchung der CTC ein weniger invasiver Eingriff als die Untersuchung des Primärtumors (Van de Stolpe et al. 2011). Es ist zudem bekannt, dass sich die Eigenschaften der isolierten Tumorzellen von denen des Primärtumors unterscheiden können. D. h. sie verändern ihre Eigenschaften nach der Loslösung vom Primärtumor. Das konnte z. B. für Patientinnen mit Brustkrebs in Bezug auf eine Überexpression des Her-2 Rezeptors gezeigt werden. Die Überexpression des Her2-Rezeptors ist in vielen isolierten Tumorzellen vorhanden, obwohl sie im Primärtumor des betroffenen Patienten nicht nachweisbar ist (Braun et al., 2001). Dieses Verändern der Eigenschaften während des Prozesses der Metastasierung wird in der Literatur auch als Epithelial Mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass durch die EMT z. B. auch das Expressionsmuster von Zytokeratinen verändert werden kann und insbesondere die Expression vieler Zytokeratine runterreguliert wird (Joosse et al., 2012). Hierdurch wird die Frage aufgeworfen, ob es bei der Suche nach isolierten Tumorzellen nicht insgesamt zu vielen falsch negativen Ergebnissen kommt und für eine bessere Aussage evtl. viele Zytokeratine auf einmal getestet werden sollten, um die Rate an falsch negativen möglichst gering zu halten? Hier wird es bestimmt in Zukunft weitere Ansätze geben.

Wie bereits oben erwähnt, können nicht alle isolierten Tumorzellen durch die gängigen Chemotherapeutika eliminiert werden. Das liegt wahrscheinlich daran, dass sich viele isolierte Tumorzellen in einem inaktiven Zustand (G0-Phase des Zellzyklus) befinden, in dem sie nicht proliferieren und viele der gängigen Chemotherapeutika wirken nur an proliferie-



renden Zellen (Pantel et al., 1993). Es ist also notwendig, die Eigenschaften von DTC genauer zu untersuchen, um so neue „Targets“ für adjuvante Therapien zu entdecken und so die Therapie zu verbessern (Riethdorf et al., 2008). Es wird erwartet, dass durch den technischen Fortschritt bei der Detektion und Charakterisierung von DTC/ CTC in Zukunft eine Verbesserung in der Therapie und der Prognosebeurteilung von Krebspatienten erreicht werden kann, und dass darüber hinaus mit ihrer Hilfe weitere Medikamente und Biomarker entwickelt werden können (Van de Stolpe et al. 2011).

Beim Ösophaguskarzinom wird immer noch diskutiert, ob eine neoadjuvante Chemotherapie die Prognose verbessert. Es gibt Studien in denen eine Prognoseverbesserung durch die neoadjuvante Chemotherapie erzielt werden konnte (Fiorica et al., 2004; Medical Research Council Oesophageal Cancer Working Group, 2002). In anderen Studien zeigte sich keine Prognoseverbesserung sondern lediglich eine gesteigerte Mortalität (Visser et al., 2003; Kaklamanos et al., 2003). Durch die Detektion von CTC und DTC könnten hier vielleicht Patienten, die von einer neoadjuvanten Therapie profitieren würden, von solchen, bei denen sich durch die Therapie lediglich die Mortalität steigert, unterschieden werden. Weiterhin könnte man auch beim Ösophaguskarzinom speziellere sogenannte target-Therapien einsetzen, um die Prognose zu verbessern. Ein Beispiel für solch eine zielgerichtete Substanz ist Bevacizumab (Avastin), ein monoklonaler Antikörper gegen den VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), der zurzeit in Studien bei fortgeschrittenen Ösophageal- und Magenkarzinomen eingesetzt wird und bereits zu vielversprechenden Ergebnissen geführt hat (Shah et al 2011).

## 5. Zusammenfassung

Trotz verbesserter Prognose in den letzten Jahren ist die Mortalität des Ösophaguskarzinoms mit ca. 90% immer noch sehr hoch. Die Inzidenz des Ösophaguskarzinoms in den westlichen Ländern ist dabei in den letzten Jahren steigend. Auch bei kurativ operierten Patienten kommt es bei ca. 50% der Patienten im Verlauf zur Ausbildung von Fernmetastasen oder Rezidiven. Dem Nachweis von DTC und CTC kommt somit auch beim Ösophaguskarzinom eine immer größere Bedeutung zu. In dieser Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob ein Zusammenhang besteht zwischen dem Vorhandensein von DTC und CTC und dem Überleben bei Patienten mit Ösophaguskarzinom. Dazu wurden bei 77 Patienten mit Ösophaguskarzinom, die zwischen 1996 und 2006 an der Klinik für Allgemeine- und Thoraxchirurgie des UKSH in Kiel mit kurativer Intention (R0-Resektion) operiert worden sind, Knochenmark- und Blutproben mittels nested CK-20 RT-PCR (ein vorher auf Spezifität und Sensitivität getestetes molekularbiologisches Nachweisverfahren) auf das Vorhandensein von isolierten Tumorzellen untersucht. Anschließend wurde deren Einfluss auf das Überleben analysiert. Die Überlebenszeiten wurden in dieser Arbeit mittels Kaplan-Meier Überlebensanalysen und multivariater Cox-Regressionsanalyse berechnet.

Von 74 untersuchten Blutproben waren 27 (36,5%) positiv für CK-20. Von 61 untersuchten Knochenmarkproben waren 19 (31,1%) positiv für CK-20. Es zeigte sich für unser Patientenkollektiv, dass Patienten, bei denen CK-20 im Knochenmark nachgewiesen wurde, ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben ( $p=0,029$ ) und tumorspezifisches Überleben ( $p=0,048$ ) haben als Patienten, bei denen im Knochenmark kein CK-20 Nachweis erfolgt war. Es konnte darüber hinaus in der multivariaten Analyse auch gezeigt werden, dass der Nachweis von CK-20 im Knochenmark für das untersuchte Kollektiv einen unabhängigen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben ( $p=0,006$ ) und das tumorspezifische Überleben ( $p=0,013$ ) darstellt. Der Nachweis von CK-20 im Blut zeigt für das Patientenkollektiv dagegen keinen Zusammenhang mit dem Überleben.

Ähnliche Ergebnisse konnte auch von zahlreichen anderen Studien, bei denen der Einfluss von DTC und CTC auf das Überleben bei unterschiedlichen Tumorentitäten untersucht wurde, erzielt werden. Die Vermutung liegt also nahe, dass CTC im Blut eine geringere Bedeutung für die Prognose haben als DTC im Knochenmark. Das könnte daran liegen, dass die Überlebensbedingungen für CTC im Blut nicht so gut sind wie für DTC im Knochenmark. CTC können nur kurze Zeit im Blut überdauern, so dass der Nachweis von CTC im Blut nur eine Momentaufnahme darstellt, die jedoch keine Bedeutung für die Prognose des Patienten hat.

## 6. Anhang

Das Gesamtkollektiv R0 bis R2 besteht aus 94 Patienten mit einem Altersmedian von 61 Jahren (38- 84 Jahre), von denen 79 (84%) männlich sind und 15 (16%) weiblich. Bei 86 Patienten (91,5%) ist eine R0-Resektion erfolgt, bei 6 Patienten (6,4%) erfolgte eine R1-Resektion und bei 2 Patienten (2,1%) eine R2-Resektion.

Die histologischen Tumorarten verteilen sich für das Gesamtkollektiv R0 bis R2 wie in Tabelle 24 dargestellt.

*Tabelle 24: Verteilung der histologischen Tumorart beim Gesamtkollektiv R0-R2 (n=94)*

Tumorart	Häufigkeit absolut (in %)
Plattenepithelkarzinom	43 (45,7)
Adenokarzinom	43 (45,7)
Neuroendokriner Tumor	1 (1,1)
Unbekannt	7 (7,5)

Die Verteilung der TNM-Klassifizierung stellt sich wie folgt dar:

*Tabelle 25: Verteilung der TNM-Klassifikation beim Patientenkollektiv R0-R2 (n=94) (Prozentangaben jeweils für die Kategorie T, N und M)*

Kategorie	T	N	M
0		42 (44,7%)	79 (84%)
1	23 (24,5%)	52 (55,3%)	14 (14,9%)
2	28 (29,8%)		

<b>3</b>	38 (40,4%)		
<b>4</b>	2 (2,1%)		
<b>X</b>	3 (3,2%)		1 (1,1%)

Daraus ergeben sich für das Gesamtkollektiv R0 bis R2 die folgenden UICC-Stadien (nach UICC 2005):

*Tabelle 26: Verteilung der UICC-Stadien beim Patientenkollektiv R0- R2 (n=94)*

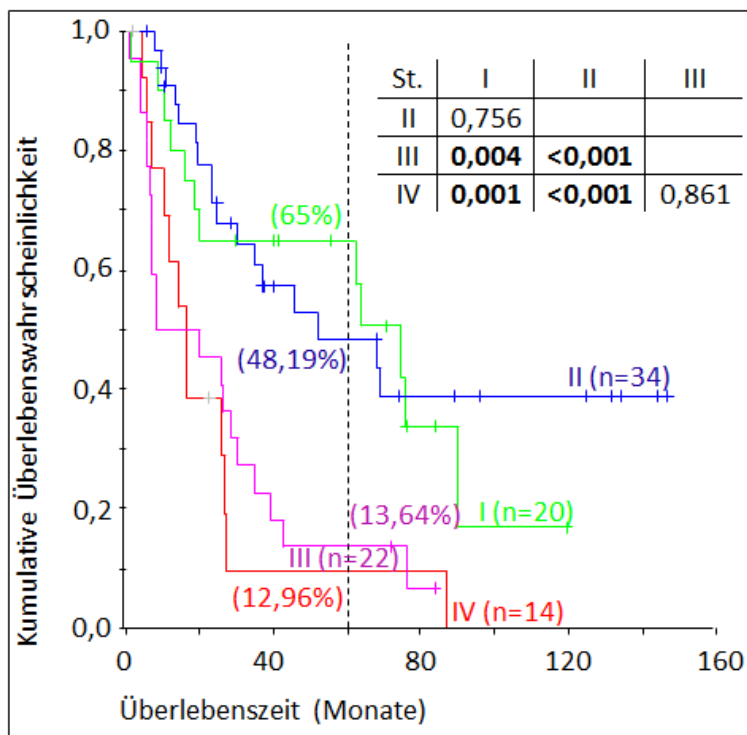
<b>Stadium</b>	<b>Häufigkeit absolut (in %)</b>
<b>I</b>	20 (21,3)
<b>II</b>	34 (36,2)
<b>III</b>	22 (23,4)
<b>IV</b>	14 (14,9)
<b>Unbekannt</b>	4 (4,2)

Der Differenzierungsgrad der Tumoren (Grade) ist folgendermaßen verteilt:

*Tabelle 27: Verteilung des Differenzierungsgrades beim Patientenkollektiv R0-R2 (n=94)*

<b>Grade</b>	<b>Häufigkeit absolut (in %)</b>
<b>1</b>	6 (6,4)
<b>2</b>	44 (46,8)
<b>3</b>	39 (41,5)
<b>Unbekannt</b>	5 (5,3)

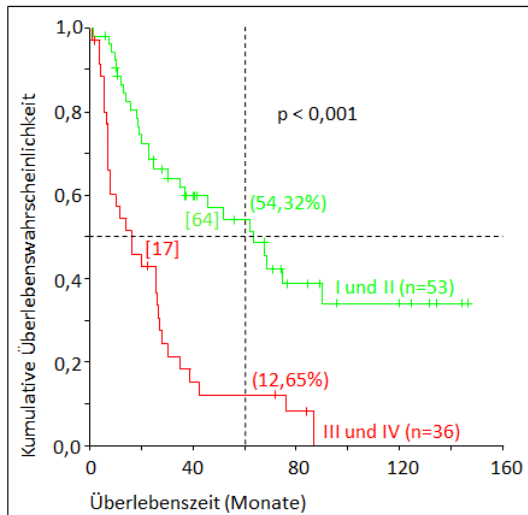
Als neoadjuvante Therapie hatten 34 (36,2%) der Patienten zuvor eine Chemotherapie erhalten, 49 (52,1%) der Patienten hatten keine Chemotherapie erhalten, bei 11 Patienten (11,7%) war unbekannt, ob eine Vortherapie durchgeführt worden war. Die beobachtete Rezidivhäufigkeit im vorliegenden Patientenkollektiv beträgt 41,49% im Beobachtungszeitraum. Das mediane Überleben im Patientenkollektiv R0-R2 beträgt 27 Monate. Die 5-JÜR für das Patientenkollektiv R0-R2 beträgt 37,29%.



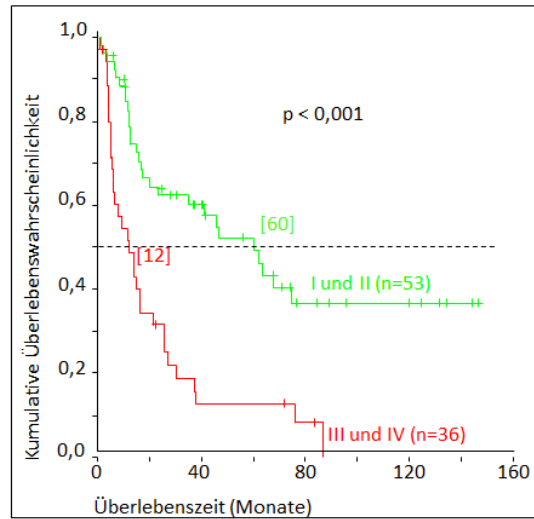
**Abb. 22:** Zusammenhang zwischen UICC-Stadium und Überleben für das Gesamtkollektiv R0 bis R2

An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5-JÜR in Klammern dargestellt. Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeiten bei den verschiedenen UICC-Stadien wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet und sind jeweils paarweise (Spalte: Zeile) für die verschiedenen Stadien in der Tabelle rechts oben angegeben. St.: UICC-Stadium.

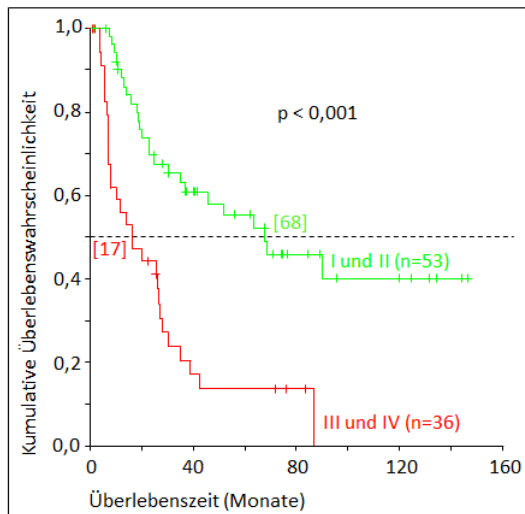
## a) Gesamtüberleben



## b) Rezidivfreies Überleben



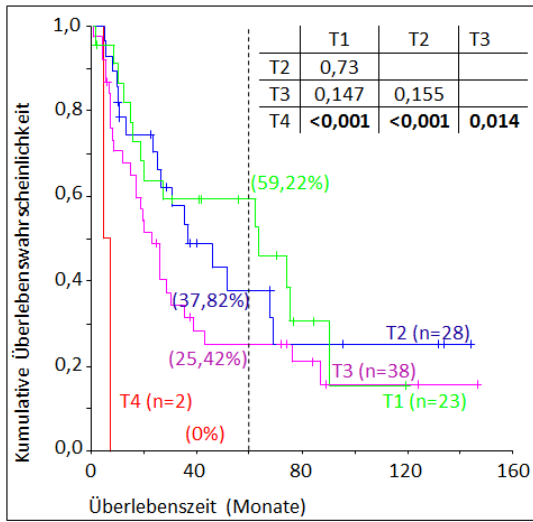
## c) Tumorspezifisches Überleben



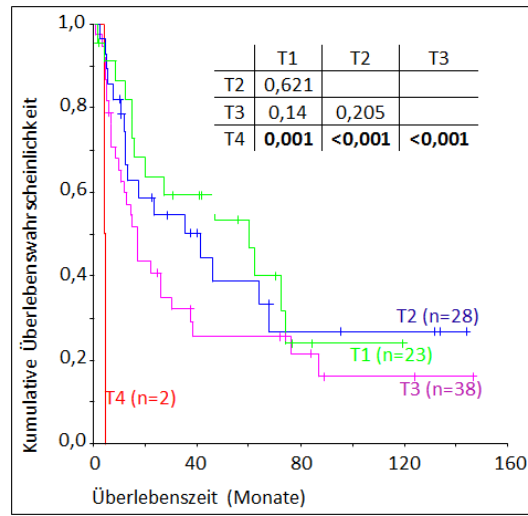
**Abb. 23:** Zusammenhang zwischen Stadiengruppe und Überleben für das Patientenkollektiv R0 bis R2

a) Gesamtüberleben b) rezidivfreies und c) tumorspezifisches Überleben. Die  $p$ -Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebendwahrscheinlichkeiten der beiden Gruppen wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5-JÜR in Klammern dargestellt (23a). An der horizontalen gestrichelten Linie bei der kumulativen Überlebendwahrscheinlichkeit von 0,5 ergibt sich das mediane Überleben und ist in Monaten in eckigen Klammern angegeben. I und II: UICC-Stadien I und II, III und IV: UICC-Stadien III und IV.

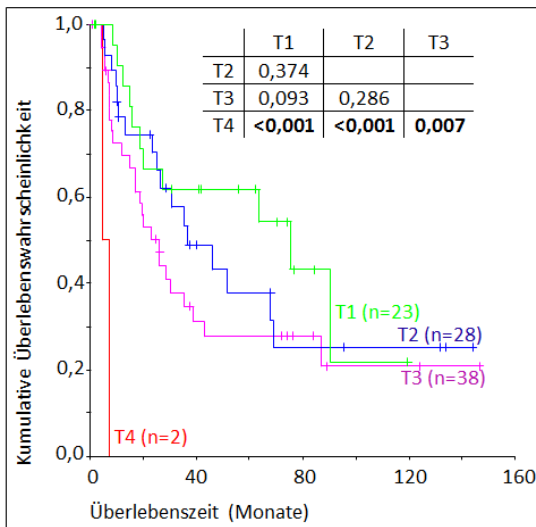
a) Gesamtüberleben



b) Rezidivfreies Überleben



c) Tumorspezifisches Überleben

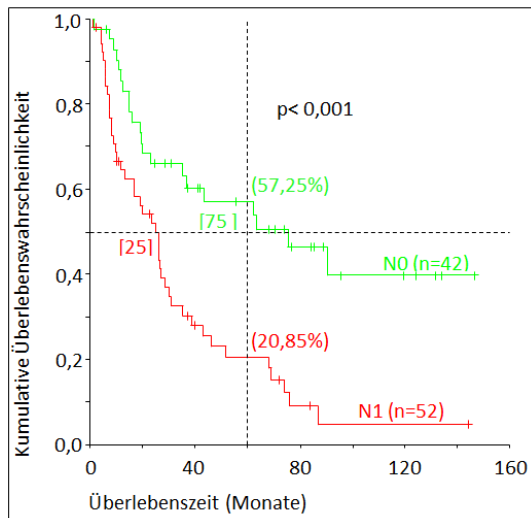


**Abb. 24:** Zusammenhang zwischen T-Kategorie und Überleben für das Gesamtkollektiv R0 bis R2

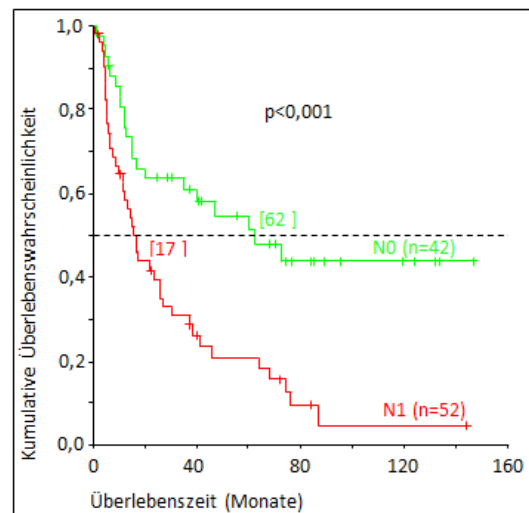
a) Gesamtüberleben b) rezidivfreies und c) tumorspezifisches Überleben. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5-JÜR in Klammern dargestellt (24a). Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeiten bei den verschiedenen T-Kategorien wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet und sind jeweils paarweise (Spalte: Zeile) für die verschiedenen T-Kategorien in der Tabelle rechts oben angegeben.



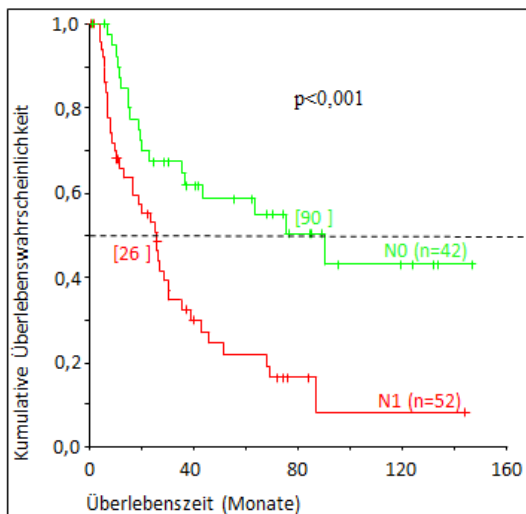
## a) Gesamtüberleben



## b) Rezidivfreies Überleben



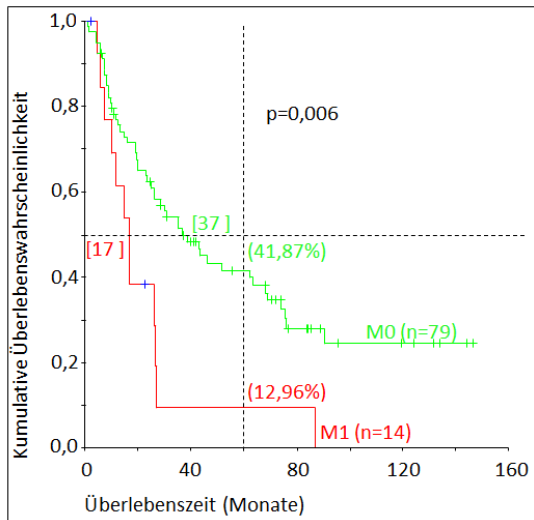
## c) Tumorspezifisches Überleben



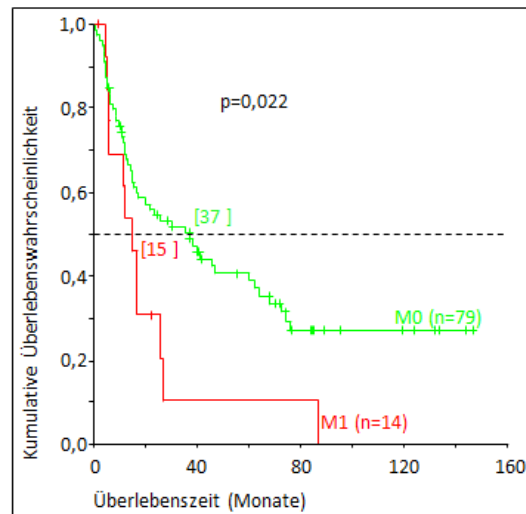
**Abb. 25:** Zusammenhang zwischen N-Kategorie und Überleben für das Gesamtkollektiv R0 bis R2

a) Gesamtüberleben, b) rezidivfreies Überleben und c) tumorspezifisches Überleben. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5- JÜR in Klammern dargestellt (25a). Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeiten der beiden N-Kategorien wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet. An der horizontalen gestrichelten Linie bei der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeit von 0,5 ergibt sich das mediane Überleben und ist in Monaten in eckigen Klammern angegeben.

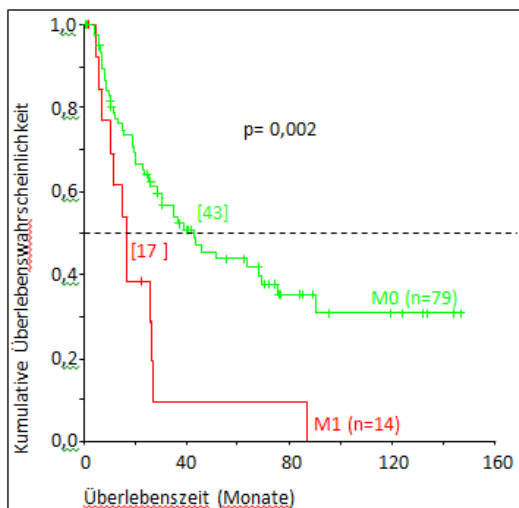
a) Gesamtüberleben



b) Rezidivfreies Überleben



c) Tumorspezifisches Überleben



**Abb.26:** Zusammenhang zwischen M-Kategorie und Überleben für das Gesamtkollektiv R0- R2

a) Gesamtüberleben b) rezidivfreies Überleben und c) tumorspezifisches Überleben. An der senkrechten gestrichelten Linie bei 60 Monaten sind die prozentualen 5- JÜR in Klammern dargestellt (26a). Die p-Werte für den Vergleich der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeiten der beiden M-Kategorien wurden mit dem Log-Rank-Test errechnet. An der horizontalen gestrichelten Linie bei der kumulativen Überlebenswahrscheinlichkeit von 0,5 ergibt sich das mediane Überleben und ist in Monaten in eckigen Klammern angegeben.

## Literaturverzeichnis

- Altaras MM, Klein A, Zemer R, Zimlichman S, Bernheim J, Fishman A. Detection of tumor circulating cells by cytokeratin-20 in the blood of patients with granulosa cell tumors. *Gynecol Oncol.* 2002 Sep;86(3):330-6.
- van Baal JW, Bozikas A, Pronk R, Ten Kate FJ, Milano F, Rygiel AM, Rosmolen WD, Peppelenbosch MP, Bergman JJ, Krishnadath KK. Cytokeratin and CDX-2 expression in Barrett's esophagus. *Scand J Gastroenterol.* 2008; 43 (2):132-40.
- Benoy IH, Elst H, Philips M, Wuyts H, Van Dam P, Scharpé S, Van Marck E, Vermeulen PB, Dirix LY. Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer.* 2006 Mar 13;94(5):672-80.
- Bertz, Kraywinkel, Husmann, Kaatsch, Katalinic. *Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 7. Ausgabe 2010*
- Bidard FC, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Diéras V, Mathiot C, Mignot L, Thiery JP, Sastre-Garau X, Pierga JY. Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells. *Ann Oncol.* 2008 Mar;19(3):496-500.
- Bidard FC, Ferrand FR, Huguet F, Hammel P, Louvet C, Malka D, Boige V, Ducreux M, Andre T, de Gramont A, Mariani P, Pierga JY. Disseminated and circulating tumor cells in gastrointestinal oncology. *Crit Rev Oncol./ Hematol.* 2012 May; 82(2):103-15
- Birkmeyer JD, Stukel TA, Siewers AE, Goodney PP, Wennberg DE, Lucas FL. Surgeon Volume and Operative Mortality in the United States. *N Engl J Med.* 2003 Nov 27;349(22):2117-27.
- Bonavina L, Soligo D, Quirici N, Bossolasco P, Cesana B, Lemberghini Deliliers G, Peracchia A. Bone marrow-disseminated tumor cells in patients with carcinoma of the esophagus or cardia. *Surgery.* 2001 Jan;129(1):15-22.
- Borgen E, Naume B, Nesland JM, Nowels KW, Pavlak N, Ravkin I, Goldbard S. Use of automated microscopy for the detection of disseminated tumor cells in bone marrow samples. *Cytometry.* 2001 Aug 15;46(4):215-21.
- Brakenhof RH, Stroomer JG, ten Brink C, de Bree R, Weima SM, Snow GB, van Dongen GA. Sensitive detection of squamous cells in bone marrow and blood of head and neck cancer patients by E48 reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res.* 1999 Apr;5(4):725-32.

Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2000 Jan;18(1):80-6.

Braun S, Schlimok G, Heumos I, Schaller G, Riethdorf L, Riethmüller G, Pantel K. ErbB2 overexpression on occult metastatic cells in bone marrow predicts poor clinical outcome of stage I-III breast cancer patients. *Cancer Res.* 2001 Mar 1;61(5):1890-5.

Bruzzi JF, Munden RF, Truong MT, Marom EM, Sabloff BS, Gladish GW, Iyer RB, Pan TS, Macapinlac HA, Erasmus JJ. PET/CT of esophageal cancer: its role in clinical management. *Radiographics.* 2007 Nov-Dec;27(6):1635-52. Review.

Burkhard H., von Rahden and H J Stein. Staging and treatment of advanced esophageal cancer. *Curr Opin Gastroenterology.* 2005 Jul;21(4):472-7

Cao M, Yie SM, Wu SM, Chen S, Lou B, He X, Ye SR, Xie K, Rao L, Gao E, Ye NY. Detection of survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of patients with esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Clin Exp Metastasis.* 2009;26(7):751-8.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002 Aug;2(8):563-72.

Chen G, Wang Z, Liu XY, Liu FY. Recurrence pattern of squamous cell carcinoma in the middle thoracic esophagus after modified Ivor-Lewis esophagectomy. *World J Surg.* 2007 May;31(5):1107-14

Chu Peiguo, MD, Ph.D, Wu Emerald, BS, Weiss Lawrence M, MD. Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 Expression in Epithelial Neoplasms: A Survey of 435 Cases. *Mod Pathol.* 2000 Sep;13(9):962-72.

Cote RJ, Beattie EJ, Chaiwun B, Shi SR, Harvey J, Chen SC, Sherrod AE, Groshen S, Taylor CR. Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. *Ann Surg.* 1995 Oct;222(4):415-23; discussion 423-5.

Cox D. Regression models and life tables. *J R Stat Soc B.* 1972, 34: 187-20.

Dardaei L, Shahsavani R, Ghavamzadeh A, Behmanesh M, Aslankoohi E, Alimoghaddam K, Ghafari SH. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow and peripheral blood of gastric cancer patients by multimarker (CEA, CK20, TFF1 and MUC2) quantitative real-time PCR. *Clin Biochem.* 2011 Mar;44(4):325-30.

- Dresner SM, Griffin SM. Pattern of recurrence following radical oesophagectomy with two-field lymphadenectomy. *Br J Surg*. 2000 Oct;87(10):1426-33
- Driessen A, Nafteux P, Lerut T, Van Raemdonck D, De Leyn P, Filez L, Penninckx F, Geboes K and Ectors N. Identical cytokeratin expression pattern CK7 +/CK20- in esophageal and cardiac cancer: Etiopathological and clinical implications. *Mod Pathol*. 2004 Jan;17(1):49-55.
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2009. p.103–15.
- Fiorica F, Di Bona D, Schepis F, Licata A, Shahied L, Venturi A, Falchi AM, Craxì A, Cammà C. Preoperative chemoradiotherapy for oesophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut*. 2004 Jul;53(7):925-30
- Fujita Y, Terashima M, Hoshino Y, Ohtani S, Kashimura S, Kanzaki N, Osuka F, Kogure M, Gotoh M. Detection of cancer cells disseminated in bone marrow using real-time quantitative RT-PCR of CEA, CK19, and CK20 mRNA in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2006;9(4):308-14.
- Funaki NO, Tanaka J, Ohshio G, Onodera H, Maetani S, Imamura M. Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer*. 1998 Apr;77(8):1327-32.
- Gershenwald JE, Soong SJ, Balch CM; American Joint Committee on Cancer (AJCC) Melanoma Staging Committee. 2010 TNM staging system for cutaneous melanoma...and beyond. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jun;17(6):1475-7.
- Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al., editors. *AJCC cancer staging manual*, 6th edition. New York: Springer, 2002 .p. 5
- Hagen JA, DeMeester SR, Peters JH, Chandrasoma P, DeMeester TR. Curative resection for esophageal adenocarcinoma: analysis of 100 en bloc esophagectomies. *Ann Surg*. 2001 Oct;234(4):520-30; discussion 530-1.
- Hardingham JE, Hewett PJ, Sage RE, Finch JL, Nuttall JD, Kotasek D, Dobrovic A. Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. *Int J Cancer*. 2000 Jan 20;89(1):8-13.
- Hashibe M, Boffetta P, Janout V, Zaridze D, Shangina O, Mates D, Szeszenia-Dabrowska N, Bencko V, Brennan P. Esophageal cancer in Central and Eastern Europe: tobacco and alcohol. *Int J Cancer*. 2007 Apr 1;120(7):1518-22.

- Hashimoto T, Kajiyama Y, Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I, Tsurumaru M. Circulating micrometastases of esophageal cancer detected by carcinoembryonic antigen mRNA reverse transcriptase-polymerase chain reaction: clinical implications. *Dis Esophagus*. 2008; 21(8):690-6.
- Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C. Classification of Isolated Tumor Cells and Micrometastasis. *Cancer*. 1999 Dec 15;86(12):2668-73.
- Hinz S, Bockhorst J, Röder C, Egberts JH, Schafmayer C, Küchler T, Becker T, Kalthoff H. Disseminated tumor cells in the bone marrow negatively influence survival after resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol*. 2012 Aug; 19(8):2539-46
- Hoffmann AC, Vallböhmer D, Grimminger P, Metzger R, Prenzel KL, Hoelscher AH, Brabender J. Preoperative survivin mRNA detection in peripheral blood is an independent predictor of outcome in esophageal carcinoma. *Pharmacogenomics*. 2010 Mar;11(3):341-7.
- Huang P, Wang J, Guo Y, Xie W. Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood in patients with gastrointestinal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 Mar;129(3):192-8.
- Hüttl TP, Wichmann MW, Geiger TK, Schildberg FW, Fürst H. Techniques and results of esophageal cancer surgery in Germany. *Langenbecks Arch Surg*. 2002 Jul;387(3-4):125-9.
- Hvid-Jensen F, Pedersen L, Drewes AM, Sørensen HT, Funch-Jensen P. Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. *N Engl J Med*. 2011 Oct 13;365(15):1375-83.
- Hwang SB, Bae JW, Lee HY, Kim HY. Circulating Tumor Cells Detected by RT-PCR for CK-20 before Surgery Indicate Worse Prognostic Impact in Triple-Negative and HER2 Subtype Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2012 Mar; 15(1):34-42
- Ikeguchi M, Kaibara N. Detection of circulating cancer cells after a gastrectomy for gastric cancer. *Surg Today*. 2005;35(6):436-41.
- Inoue, H, Kajiyama Y, Tsurumaru M. Clinical significance of bone marrow micrometastases in esophageal cancer. *Dis Esophagus*. 2004;17(4):328-32.
- Ito H, Kanda T, Nishimaki T, Sato H, Nakagawa S, Hatakeyama K. Detection and quantification of circulating tumor cells in patients with esophageal cancer by real-time polymerase chain reaction. *J Exp Clin Cancer Res*. 2004 Sep;23(3):455-64.
- Jelovac D, Wolff AC. The Adjuvant Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2012 Jun; 13(2):230-9.

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. *Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin.* 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
- Joosse SA, Hannemann J, Spötter J, Bauche A, Andreas A, Müller V, Pantel K. *Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. Clin Cancer Res.* 2012 Feb 15; 18(4):993-1003.
- Jung R, Petersen K, Krüger W, Wolf M, Wagener C, Zander D, Neumaier M. *Detection of micro-metastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. Br J Cancer.* 1999 November; 81(5): 870–873.
- Kaganoi J, Shimada Y, Kano M, Okumura T, Watanabe G, Imamura M. *Detection of circulating oesophageal squamous cancer cells in peripheral blood and its impact on prognosis. Br J Surg.* 2004 Aug;91(8):1055-60.
- Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, Obonyo D, Wachowiak R, Busch P, Heinecke A, Pantel K, Izbicki JR. *Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. J Natl Cancer Inst.* 2005 Dec 21;97(24):1840-7.
- Kaklamanos IG, Walker GR, Ferry K, Franceschi D, Livingstone AS. *Neoadjuvant treatment for resectable cancer of the esophagus and the gastroesophageal junction: a meta-analysis of randomized clinical trials. Ann Surg Oncol.* 2003 Aug;10(7):754-61.
- Kalthoff H, Ammerpohl O, Röder C, Schniewind B. *Mokeluare Onkologische Forschung in der Chirurgie. Chirurgische Forschung, Hrsg.: Krukemeyer, M. G., Spiegel, H.-U., Thieme-Verlag, Stuttgart, New York.* 2005, p. 69-79.
- Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. *Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. J Clin Oncol.* 2006 May 10;24(14):2137-50.
- Kaplan, E. L. und Meier, P. *Nonparametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Assoc.* 1958, 53:457–481.
- Kato H, Tachimori Y, Watanabe H, Iizuka T. *Evaluation of the new (1987) TNM classification for thoracic esophageal tumors. Int J Cancer.* 1993 Jan 21;53(2):220-3.
- Koch M, Kienle P, Hinz U, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M, Weitz J. *Detection of hematogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases. Ann Surg.* 2005 Feb;241(2):199-205.

- Koike M, Hibi K, Kasai Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A. Molecular detection of circulating esophageal squamous cell cancer cells in the peripheral blood. *Clin Cancer Res.* 2002 Sep;8(9):2879-82.
- Kong CY, Nattinger KJ, Hayeck TJ, Omer ZB, Wang YC, Spechler SJ, McMahon PM, Gazelle GS, Hur C. The impact of obesity on the rise in esophageal adenocarcinoma incidence: estimates from a disease simulation model. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011 Nov;20(11):2450-6.
- Lagarde SM, ten Kate FJ, Reitsma JB, Busch OR, van Lanschot JJ. Prognostic factors in adenocarcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction. *J Clin Oncol.* 2006 Sep 10;24(26):4347-55.
- Lee PC, Mirza FM, Port JL, Stiles BM, Paul S, Christos P, Altorki NK. Predictors of recurrence and disease-free survival in patients with completely resected esophageal carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 May;141(5):1196-206.
- Leinung S, Wurl P, Weiss CL, Roder I, Schonfelder M. Cytokeratin-positive cells in bone marrow in comparison with other prognostic factors in colon carcinoma. *Langenbeck's Arch Surg.* 2000 Aug;385(5):337-43.
- Lepage C, Bouvier AM, Manfredi S, Coatmeur O, Cheynel N, Faivre J. Trends in incidence and management of esophageal adenocarcinoma in a well-defined population. *Gastroenterol Clin Biol.* 2005;29:1258-1263.
- Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmüller G. Prognostic significance of micro-metastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet.* 1992 Sep 19;340(8821):685-9.
- Liu Z, Jiang M, Zhao J, Ju H. Circulating tumor cells in perioperative esophageal cancer patients: quantitative assay system and potential clinical utility. *Clin Cancer Res.* 2007 May 15;13(10):2992-7.
- Mandard AM, Chasle J, Marnay J, Villedieu B, Bianco C, Roussel A, Elie H, Vernhes JC. Autopsy findings in 111 cases of esophageal cancer. *Cancer.* 1981 Jul 15;48(2):329-35.
- Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother. Rep.* 1966 Mar;50(3):163-70.
- Mariette C, Balon JM, Piessen G, Fabre S, Van Seuningem I, Triboulet JP. Pattern of recurrence following complete resection of esophageal carcinoma and factors predictive of recurrent disease. *Cancer.* 2003 Apr 1;97(7):1616-23.



- Medical Research Council Oesophageal Cancer Working Party. Surgical resection with or without preoperativ chemotherapy in oesophageal cancer: a randomised controlled trial. Lancet. 2002; 359: 1727-33.*
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D, Haley B, Morrison L, Fleming TP, Herlyn D, Terstappen LW, Fehm T, Tucker TF, Lane N, Wang J, Uhr JW. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. Clin Cancer Res. 2004 Dec 15;10(24):8152-62.*
- Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeration 20 in human carcinomas: A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. Am J Pathol. 1992 Feb;140(2):427-47.*
- Morita M, Kumashiro R, Kubo N, Nakashima Y, Yoshida R, Yoshinaga K, Saeki H, Emi Y, Kakeji Y, Sakaguchi Y, Toh Y, Maehara Y. Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: epidemiology, clinical findings, and prevention. Int J Clin Oncol. 2010 Apr; 15(2):126-34.*
- Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Jänicke F, Pantel K. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. Clin Cancer Res. 2005 May 15;11(10):3678-85.*
- Nakashima S, Natsugoe S, Matsumoto M, Miyazono F, Nakajo A, Uchikura K, Tokuda K, Ishigami S, Baba M, Takao S, Aikou T. Clinical significance of circulating tumor cells in blood by molecular detection and tumor markers in esophageal cancer. Surgery. 2003 Feb;133(2):162-9.*
- Noguchi T, Shibata T, Fumoto S, Sato T, Uchida Y, Daa T, Yokoyama S, Gabbert HE, Mueller W, Takeno S. Detection of disseminated cancer cells in rib marrow of patients with esophageal cancer. Oncol Rep. 2003 May-Jun;10(3):623-7.*
- Oezcelik A, Kaiser GM, Niebel W, Sleyman C, Treckmann JW, Sotiropoulos GC, Reinhardt R, Traubach T, Malamutmann E, Paul A. Ten-year survival of esophageal cancer after an en-bloc esophagectomy. J Surg Oncol. 2012 Mar; 105(3):284-7*
- Oki E, Kakeji Y, Baba H, Nishida K, Koga T, Tokunaga E, Egashira A, Ikeda K, Yoshida R, Yamamoto M, Morita M, Maehara Y. Clinical significance of cytokeratin positive cells in bone marrow of gastric cancer patients. J Cancer Res Clin Oncol. 2007 Dec;133(12):995-1000.*
- Paget S The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. Cancer Metastasis Rev. 1989 Aug;8(2):98-101.*

- Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmüller G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85(17):1419-1424.
- Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(6):448-456.
- Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 2008 May;8(5):329-40.
- Pantel K, Alix-Panabières C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009 Jun; 6(6): 339-51.
- Peto R, Peto J. Asymptotically Efficient Rank Invariant Test Procedures. *J R Stat Soc A.* 1972; 135 (2): 185-207.
- Ponce MR, Micol JL. PCR amplification of long DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* 1992 Feb 11;20(3):623.
- Retz M, Lehmann J, Röder C, Weichert-Jacobsen K, Loch T, Romahn E, Lühl C, Kalthoff H, Stöckle M. Cytokeratin-20 Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction as a New Tool for the Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood and Bone Marrow of Bladder Cancer Patients. *Eur Urol.* 2001 May; 39(5): 507-15.
- Reynolds JV, Donohoe CL, McGillicuddy E, Ravi N, O'Toole D, O'Byrne K, Hollywood D. Evolving progress in oncologic and operative outcomes for esophageal and junctional cancer: Lessons from the experience of a high-volume center. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012 May;143(5):1130-1137.
- Rice TW, Blackstone EH, Rusch VW. 7th edition of the AJCC Cancer Staging Manual: esophagus and esophagogastric junction. *Ann Surg Oncol.* 2010 Jul;17(7):1721-4.
- Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer.* 2008 Nov 1;123(9):1991-2006.
- Riethmüller G, Schneider-Gädicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Höffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmayr R, et al. Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet.* 1994 May 14;343(8907):1177-83.
- Roder JD, Thorban S, Pantel K, Siewert JR. Micrometastases in bone marrow: prognostic indicators for pancreatic cancer. *World J Surg.* 1999 Sep;23(9):888-91.

- Ryan P, McCarthy S, Kelly J, Collins JK, Dunne C, Grogan L, Breathnach O, Shanahan F, Carey PD, Walsh TN, O'Sullivan GC. Prevalence of bone marrow micrometastases in esophagogastric cancer patients with and without neoadjuvant chemoradiotherapy. *J Surg Res.* 2004 Mar;117(1):121-6.
- Schlimok, G, Funke I, Holzmann, B, Gottlinger G, Schmidt G, Hauser H, Swierkot S, Warnecke H, Schneider B and Koprowski H. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(23):8672-6.
- Setoyama T, Natsugoe S, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Ishigami S, Owaki T, Takao S, Aikou T. Carcinoembryonic antigen messenger RNA expression in blood predicts recurrence in esophageal cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Oct 15;12(20 Pt 1):5972-7.
- Shah MA, Jhawer M, Ilson DH, Lefkowitz RA, Robinson E, Capanu M, Kelsen DP. Phase II Study of Modified Docetaxel, Cisplatin, and Fluorouracil With Bevacizumab in Patients With Metastatic Gastroesophageal Adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2011 Mar 1;29(7):868-74.
- Siewert JR, Stein HJ, Feith M, Bruecher BL, Bartels H, Fink U. Histologic tumor type is an independent prognostic parameter in esophageal cancer: lessons from more than 1,000 consecutive resections at a single center in the Western world. *Ann Surg.* 2001 Sep;234(3):360-7.
- Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002 Sep 1;20(17):3628-36.
- Singletary SE, Greene FL, Sobin LH. Classification of isolated tumor cells: clarification of the 6th edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual. *Cancer.* 2003 Dec 15;98(12):2740-1
- Soeth E, Röder C, Juhl H, Krüger U, Kremer B, Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer.* 1996 Aug 22;69(4):278-82.
- Soeth E, Vogel I, Röder C, Juhl H, Marxsen, Krüger, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H. Comparative Analysis of bone Marrow and Venous Blood Isolates from Gastrointestinal Cancer Patients for the Detection of Disseminated Tumor Cells using Reverse Transcription PCR. *Cancer Res.* 1997; 57,3106-3110.
- Soeth E, Grigoleit U, Moellmann B, Röder C, Schniewind B, Kremer B, Kalthoff H, Vogel I. Detection of tumor cell dissemination in pancreatic ductal carcinoma patients by CK 20 RT-PCR indicates poor survival. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005 Oct;131(10):669-76.

Stahl M, Budach W, Meyer HJ, Cervantes A; ESMO Guidelines Working Group. Esophageal cancer: Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010 May;21 Suppl 5:v 46-9.

Stein HJ, Feith M, Siewert JR. Cancer of the esophagogastric junction. *Surg Oncol.* 2000 Jul;9(1):35-41.

Stoecklein NH, Hosch SB, Bezler M, Stern F, Hartmann CH, Vay C, Siegmund A, Scheunemann P, Schurr P, Knoefel WT, Verde PE, Reichelt U, Erbersdobler A, Grau R, Ullrich A, Izbicki JR, Klein CA. Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell.* 2008 May;13(5):441-53.

Tachezy M, Effenberger K, Zander H, Minner S, Gebauer F, Vashist YK, Sauter G, Pantel K, Izbicki JR, Bockhorn M. ALCAM (CD166) expression and serum levels are markers for poor survival of esophageal cancer patients. *Int J Cancer.* 2012 Jul 15; 131(2):396-405.

Taniere P, Borghi-Scoazec G, Saurin JC, Lombard-Bohas C, Boulez J, Berger F, Hainaut P, Scoazec JY. Cytokeratin expression in adenocarcinomas of the esophagogastric junction: a comparative study of adenocarcinomas of the distal esophagus and of the proximal stomach. *Am J Surg Pathol.* 2002 Sep;26(9):1213-21.

Thorban S, Roder JD, Nekarda H, Funk A, Siewert JR, Pantel K. Immunocytochemical detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with esophageal carcinoma. *J Nat Cancer Inst.* 1996a Sep 4; 88(17):1222-7.

Thorban S, Roder JD, Pantel K, Siewert JR. Epithelial tumour cells in bone marrow of patients with pancreatic carcinoma detected by immunocytochemical staining. *Eur J Cancer.* 1996b Feb;32A(2):363-5.

Toyoshima T, Vairaktaris E, Nkenke E, Schlegel KA, Neukam FW, Ries J. Hematogenous cytokeratin 20 mRNA detection has prognostic impact in oral squamous cell carcinoma: preliminary results. *Anticancer Res.* 2009 Jan;29(1):291-7.

Viklund P, Lindblad M, Lu M, Ye W, Johansson J, Lagergren J. Risk factors for complications after esophageal cancer resection: a prospective population-based study in Sweden. *Ann Surg.* 2006 Feb;243(2):204-11.

Van de Stolpe A, Pantel K, Sleijfer S, Terstappen LW, den Toonder JM. Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *Cancer Res.* 2011 Sep 15;71(18):5955-60.

- Visser BC, Venook AP, Patti MG. Adjuvant and neoadjuvant therapy for esophageal cancer: a critical reappraisal. *Surg Oncol*. 2003 Jul;12(1):1-7.
- Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 15;21(18):3469-78.
- Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer*. 2006 Apr 15;118(8):2013-9.
- Wittekind C, Meyer HJ. *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. 7.Aufl. 2010. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Wolfrum F, Vogel I, Fändrich F, Kalthoff H. Detection and clinical implications of minimal residual disease in gastro-intestinal cancer. *Langenbecks Arch Surg*. 2005 Sep;390(5):430-41.
- Wu CH, Lin SR, Hsieh JS, Chen FM, Lu CY, Yu FJ, Cheng TL, Huang TJ, Huang SY, Wang JY. Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood of patients with gastric cancer: evaluation of their prognostic significance. *Dis Markers*. 2006;22(3):103-9.
- Wyld DK, Selby P, Perren TJ, Jonas SK, Allen-Mersh TG, Wheeldon J, Burchill SA. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. *Int J Cancer*. 1998 Jun 19;79(3):288-93.
- Yamaguchi K, Takagi Y, Aoki S, Futamura M, Saji S. Significant detection of circulating cancer cells in the blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction during colorectal cancer resection. *Ann Surg*. 2000 Jul;232(1):58-65.
- Zacherl J, Neumayer C, Langer F. *Esophageal Cancer: International guidelines in interdisciplinary diagnosis and treatment*. *Eur Surg*. 2006 38/2: 79-88.
- Zhang JQ, Hooker CM, Brock MV, Shin J, Lee S, How R, Franco N, Prevas H, Hulbert A, Yang SC. Neoadjuvant chemoradiation therapy is beneficial for clinical stage T2 N0 esophageal cancer patients due to inaccurate preoperative staging. *Ann Thorac Surg*. 2012 Feb;93(2):429-37.

## **Danksagung**

*Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff, Leiter der Sektion für Molekulare Onkologie des Instituts für Experimentelle Tumorforschung des UKSH Campus Kiel, für die Überlassung des Themas sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen und seine Geduld.*

*Besonders danken möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Christian Röder für die sehr engagierte Betreuung sowie die Anleitung und Motivation in allen Phasen der Fertigstellung der Arbeit.*

*Bei Frau Bianca Zinke, Frau Alexandra Sieger und Frau Bianca Körtge bedanke ich mich für die Hilfe und Anleitung im Labor sowie bei der Durchführung der PCR und immunhistochemischen Färbungen.*

*Ich bedanke mich weiterhin bei Herrn Dr. Christian Krauss, Klinisches Krebsregister Schleswig-Holstein e.V., für die Hilfe bei Fragen zur klinikinternen Forschungsdatenbank.*

*Weiterhin möchte ich mich hiermit herzlich bei meinen Eltern, Tamara und Helmrich Folkers, bedanken, ohne die mein Werdegang in dieser Form wahrscheinlich nicht möglich gewesen wäre und die mich beim Fertigstellen dieser Arbeit stets moralisch unterstützt haben.*

*Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann, Olivier Baratay, für seine unendliche Geduld und die fachmännische Anleitung bei EDV-Fragen. Außerdem danke ich meinen Schwestern Lisa und Lena Folkers für ihre Unterstützung.*

## Lebenslauf Annette Baratay geb. Folkers

### *Persönliche Daten*

---

**Geburtsdatum:** 05.01.1982

**Geburtsort:** Bremen

**Familienstand:** Verheiratet, 1 Kind

**Staatsangehörigkeit:** Deutsch

**Eltern:** Tamara Folkers und Helmrich Folkers

### *Berufserfahrung*

---

11/2008-8/2009 Erste Medizinische Klinik im Diakoniekrankenhaus Rotenburg, Wümme  
 Seit 8/2009 Klinik für Dermatologie und Venerologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

### *Praktisches Jahr*

---

2/2007-6/2007 Klinik für Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus, Kiel  
 6/2007-10/2007 Chirurgie, CHU de la Tronche, Grenoble, Frankreich  
 10/2007-1/2008 Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der CAU Kiel

### *Famulaturen*

---

3/2004 Geriatrie im Krankenhaus Agatharied  
 3/2004 Innere Medizin in den SLK Kliniken Heilbronn  
 2/2005-3/2005 Gynäkologie im Hospital Insular, Las Palmas  
 8/2005 Rheumatologie im Hospital Insular, Las Palmas  
 3/2006 Hämatologie und Onkologie im Klinikum Oldenburg  
 9/2006-10/2006 Praxisfamulatur in der Dermatologie, Achim bei Bremen

### *Ausbildung*

---

1994-2001 Cato Bontjes van Beek Gymnasium in Achim Schulabschluss Abitur mit Abschlussnote 1,9  
 1998-1999 Colegio Sinaloa in Culiacan, Mexiko, Teilnahme am Schüleraustauschprogramm von Rotary International in der 11. Klasse  
 2001-2008 **Christian Albrechts Universität zu Kiel, Studium der Humanmedizin mit Erhalt des Examens am 17.06.2008**  
 2/2005-9/2005 Universidad de Las Palmas De Gran Canaria, Auslandssemester mit dem Programm Sokrates Erasmus

### *Sonstige Qualifikationen*

---

**Sprachkenntnisse:** Französisch sehr gut, spanisch sehr gut, englisch gut, Latein

**Hobbies:** Pilates, Reisen, Joggen, Musik (Klarinette)