

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. E. Kastenbauer

**Untersuchungen zur Tumor-spezifischen Glykosylierung
des Karzinom-assoziierten epithelialen Adhäsionsmoleküls
EpCAM in Kopf-Hals-Karzinomen (SCCHN)**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter Breinl
aus
München
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Wollenberg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. T. Igo-Kemenes

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. O. Gires

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2003

meinen Eltern und meiner Frau Susanne

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (SCCHN).....	1
1.1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2	Einteilung nach Lokalisation, Ausdehnung (TNM-System) und histologischem Differenzierungsgrad (Grading).....	2
1.1.3	Diagnose, Therapie und Nachsorge	3
1.1.4	Prognose der Kopf-Hals-Karzinome	4
1.2	Karzinogenese und Immunevasion	7
1.3	Tumor-assoziierte Antigene (TAA)	8
1.4	Das Tumor-assoziierte Antigen EpCAM	9
1.4.1	Genetische Kodierung	9
1.4.2	Molekulare Struktur	11
1.4.3	Expression von EpCAM in menschlichen Geweben.....	13
1.4.4	Expression von EpCAM in Karzinomen.....	17
1.4.5	Funktion von EpCAM in Epithelzellen und in Karzinomen.....	19
1.4.6	EpCAM-regulierte Gene und Proteine	20
1.4.7	Differentielle Glykosilierung von EpCAM	22
1.4.8	EpCAM in Diagnostik und Immuntherapie.....	23
1.5	Zielsetzung	26
2.	Material und Methoden	28
2.1	Material.....	28
2.1.1	Laborgeräte	28
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.3	Chemikalien.....	29
2.1.4	Antikörper und Reagenzien	29
2.1.5	Puffer	30
2.1.6	Sonstiges.....	30
2.2	Zelllinien	30
2.3	Patienten	31
2.4	Methoden.....	34

2.4.1	Gewebsproben aus Tumorpatienten	34
2.4.2	Aufbereitung der Gewebeproben.....	35
2.4.3	Messung des Proteingehalts	36
2.4.4	Vertikale Gelelektrophorese	36
2.4.5	Immunblotting (Westernblot).....	37
3.	Ergebnisse	39
3.1	EpCAM-Glykosilierung in Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen	39
3.2	N-Glykosilierung von EpCAM in Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen	40
3.3	Differentielle Glykosilierung von EpCAM in Tumorgewebe und gesundem Epithel.....	41
3.3.1	Glykosilierung von EpCAM in Tumorproben.....	43
3.3.2	Glykosilierung von EpCAM in Schilddrüsengewebe	45
3.3.3	Glykosilierung von EpCAM in SCCHN und autologem Schilddrüsengewebe	47
3.4	Glykosilierung von EpCAM in gesunder Kolonschleimhaut und in Kolonkarzinomen.....	50
3.5	Alters- und Geschlechterverteilung der Patienten mit Kopf-Hals- Karzinomen	51
3.6	Verteilung der Tumorstadien	53
3.7	Verteilung der Glykosilierungsgrade in den verschiedenen Tumorstadien und –lokalisationen in Patienten mit Kopf-Hals- Karzinomen	59
4	Diskussion	62
4.1	EpCAM als tumorassoziiertes Antigen	63
4.2	EpCAM und Karzinogenese	64
4.3	Differentielle Hyperglykosilierung von EpCAM in Karzinomen....	66
4.4	Hyperglykosilierung von EpCAM in Karzinomen - Funktionelle Aspekte	69
4.5	Klinische Bedeutung von EpCAM als spezifisches Zielantigen in Karzinomen	71

5	Zusammenfassung.....	77
6	Literatur.....	79
7	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen.....	91
8	Abkürzungsverzeichnis.....	96

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (SCCHN)

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

In der Bundesrepublik Deutschland erkranken derzeit jährlich ca. 350 000 Menschen an Krebs (Lang et al. 2002). Die Plattenepithelkarzinome stellen mit ca. 85 % den überwiegenden Anteil der malignen Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches. Damit treten sie gleichauf mit dem Blasenkarzinom in der Häufigkeit der Karzinome an vierter Stelle (Berrino et al.1995). Inzidenz und Mortalität der letzten Jahrzehnte zeigen steigende Tendenz, zunehmend sind auch jüngere Patienten betroffen. So hat sich die Mortalität in den letzten 20 Jahren verdreifacht, 1998 waren fast 5 % aller krebsbedingten Sterbefälle durch Kopf-Hals-Malignome bedingt, bei der Gruppe der Männer von 40 bis 59 Jahren liegt der Anteil sogar bei 10 %. Gleichzeitig konnten alle Anstrengungen zur Weiterentwicklung der diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten die ungünstige Prognose in den letzten 30 Jahren nicht wesentlich verbessern (Dimery and Hong 1993; Von Hoff 1994). Vor allem gelten chronischer Tabak- und Alkoholabusus als Hauptrisikofaktoren und sind bei dem überwiegenden Anteil der Patienten mit SCCHN anzutreffen. Der zunehmende Gebrauch dieser Genussmittel scheint eine wesentliche Ursache für die epidemiologische Entwicklung darzustellen, das unterschiedliche Verhalten im Umgang mit diesen Noxen wird als Grund angesehen, warum Männer etwa vier mal so häufig erkranken wie Frauen (Tuyns et al. 1988; Rice and Becker 1994).

1.1.2 Einteilung nach Lokalisation, Ausdehnung (TNM-System) und histologischem Differenzierungsgrad (Grading)

Nach Lokalisation des Primärtumors unterscheidet man Karzinome der Mundhöhle, des Rachens (Oro-, Hypo- und Nasopharynx), des Kehlkopfes und der Nasenhaupt- und -nebenhöhlen. Daneben erscheinen Plattenepithelkarzinome im Hals-Kopf-Bereich als Tumoren der Kopfspeicheldrüsen und der Gesichts- und Kopfhaut. Die Klassifikation der Tumorstadien erfolgt nach dem international anerkannten TNM-System der UICC (UICC 1997) und beschreibt die Größe des Primärtumors (zunehmend von T1 bis T4), das Ausmaß der lymphogenen Metastasierung (zunehmend von N0 bis N3) und das Auftreten von Fernmetastasen (M0 oder M1). Zur Übersicht über die Schweregrade der Tumorstadien hat die UICC aus der komplexen TNM-Klassifikation eine vierstufige Stadieneinteilung abgeleitet, die in Tabelle 1 dargestellt ist.

UICC	TNM Klassifikation	Tumorprogression
I	T1 N0 M0	Frühe Tumorstadien
II	T2 N0 M0	
III	T3 N0 M0 <i>oder</i> T1-3 N1 M0	Fortgeschrittene Tumorstadien
IV	T4 <i>oder</i> N2-3 <i>oder</i> M1	

Tabelle 1: Einteilung Schweregrade von TNM-Stadien nach UICC. Stadium I und II gelten als frühe Tumorstadien, die Stadien III und IV als fortgeschrittene Tumorstadien.

Die Stadien III bis IV werden als fortgeschrittene Tumorstadien angesehen und finden sich in der TNM-Klassifikation in T3-4 und N1-3 (N+) wieder. Der TNM-Status bezieht sich auf das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und wird histopathologisch gesichert. Der Differenzierungsgrad gibt Informationen über den Malignitätsgrad des Tumors (Grading) und reicht von G1 (gut oder hochgradig differenziert) über G2 (mäßig oder

mittelgradig differenziert) und G3 (schlecht oder wenig differenziert) bis G4 (un- oder entdifferenziert).

1.1.3 Diagnose, Therapie und Nachsorge

Anamnestisch erhobene Leitsymptome können erste Hinweise auf ein Tumorgeschehen im oberen Aerodigestivtrakt geben. Mit zunehmendem Tumorwachstum kommt es zu Schluckbeschwerden, beim glottischen Larynxkarzinom dominiert die Heiserkeit als Primärsymptom. Aufgrund ihrer Lokalisation sind Kopf-Hals-Tumoren meist der Inspektion zugänglich oder lassen sich unter Anwendung endoskopischer Techniken erfassen. Palpation und bildgebende Verfahren (Sonographie, Computer- und Kernspintomographie, Röntgen) geben Informationen über Lymphknoten- und Fernmetastasierung. Die Diagnosesicherung erfolgt nach Probeentnahme durch Histologie.

An therapeutischen Möglichkeiten stehen neben der operativen Tumoresektion die Radio- und die Chemotherapie oder eine Kombination dieser verschiedenen Verfahren zur Verfügung (vgl. Leitlinie Onkologie des Kopf-Hals-Bereiches, 2000) . Primär wird eine vollständige chirurgische Entfernung von Tumor und vorhandenen Lymphknotenmetastasen im gesunden Gewebe (R0-Resektion) mit kurativer Absicht unter bestmöglichem funktionellen Organerhalt angestrebt.

Als ausschließliche Therapieform kommt die Bestrahlung bei sehr weit fortgeschrittenen, nicht mehr resektablen Tumoren zur Anwendung. In solch fortgeschrittenen Tumorstadien kann die Kombination einer Radiatio und einer Chemotherapie zu einer erheblichen Verbesserung der Überlebensrate führen (Pignon et al. 2000).

Die alleinige Chemotherapie hat bislang lediglich palliativen Charakter und wird bei Patienten mit Fernmetastasierung oder Tumorstadien ohne weitere chirurgische oder strahlentherapeutische Option eingesetzt. So wie bei

anderen soliden Tumoren haben sich Cisplatin, Carboplatin und 5-Fluorouracil auch bei SCCHN in etwa 20 % der Fälle als wirksam erwiesen. Einen Fortschritt in der Entwicklung der Chemotherapeutika scheinen die Taxane darzustellen, deren Einsatz in der Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen derzeit noch geprüft wird (Kim et al. 2001).

Nach erfolgter Therapie mit möglichst vollständiger Elimination allen Tumorgewebes werden regelmäßige, in den ersten Jahren kurzfristige Nachsorgeuntersuchungen durchgeführt. Hierbei steht die endoskopische Diagnostik im Vordergrund. Bildgebende Verfahren vervollständigen die Kontrolluntersuchungen. Daneben können serologisch messbare Tumormarker Hinweise auf erneutes, klinisch noch nicht fassbares Tumorwachstum geben. Alle für SCCHN bislang untersuchten Marker zeigen für sich eine zu geringe Sensitivität und Spezifität für den Routineeinsatz. Eine Kombination verschiedener Marker kann die Aussagekraft erhöhen. Ein interessantes Sensitivitäts-Spezifitäts-Profil bietet hierbei die Kombination von SCC und CEA (Stieber et al. 1996). Das Ziel der Nachsorge besteht in einer möglichst frühen Erkennung von Rezidivtumoren, da allenfalls kleine Rezidive, die noch keine lebenswichtigen Strukturen infiltriert haben, einen Ansatz für kurative Behandlungsmaßnahmen bieten. Allerdings ist die Therapie von Tumorrezidiven meist palliativ und kann die Prognose nur selten verbessern. Das Behandlungsziel beschränkt sich dann auf eine möglichst hohe Lebensqualität für den Tumorpatienten.

1.1.4 Prognose der Kopf-Hals-Karzinome

Obwohl schon kleinere Raumforderungen im Bereich des oberen Aerodigestivtrakts Symptome wie Fremdkörpergefühl und bald eine Beeinträchtigung des Schluckakts erwarten lassen, besteht bei einem Großteil der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium. So liegt bereits bei zwei Drittel aller Patienten mit Erstdiagnose eines SCCHN eine Halslymphknotenme-

tastasierung vor (Remmert et al. 2001). Verglichen mit anderen soliden Tumoren sind lokoregionäre Rezidive häufig: Bei 50 % der Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium kommt es nach erfolgter Therapie zu Rezidiven oder Fernmetastasen, die Prognose der SCCHN ist entsprechend ungünstig (Lang et al. 2002). Bei vielen Tumorpatienten besteht eine verminderte Schleimhautsensibilität der oberen Verdauungs- und Atemwege aufgrund von chronischem Tabak- und Alkoholabusus, die eigene körperliche Wahrnehmung ist oftmals von Indolenz geprägt. So werden nicht unmittelbar sichtbare tumoröse Veränderungen im Kopf-Hals-Bereich erst dann vom Patienten bewusst wahrgenommen, wenn sie durch ihre Ausdehnung deutliche funktionelle Störungen bewirken (Schluckstörung, Verlegung der Atemwege, Heiserkeit bei Larynxinfiltration) oder die Tumordinfiltration zunehmende Schmerzsymptomatik hervorruft. Die insgesamt ungünstige Prognose hängt im Einzelfall von folgenden Faktoren ab:

- Anatomische Lokalisation des Primärtumors
- Tumorstadium insbesondere hinsichtlich Lymphknotenstatus
- Histopathologischer Differenzierungsgrad
- Residualtumor nach erfolgter Therapie (R-Faktor)

Die Larynxkarzinome besitzen unter den Kopf-Hals-Karzinomen noch die beste Prognose, ihre 5-Jahres-Überlebensrate wird mit 60 % angegeben (Lang et al. 2002; Hussey et al. 1991). Insbesondere die glottischen Karzinome machen sich durch frühzeitig einsetzende Symptomatik bemerkbar. Schon kleine Karzinome im T1-Stadium verursachen eine funktionell wirksame Stimmbandläsion mit persistierender Heiserkeit, die den Patienten bald zur Abklärung motiviert und die häufig zur Diagnose des noch frühen Tumorstadiums führt. Der Schildknorpel stellt der Tumorausbreitung zudem eine anatomische Barriere entgegen, der Lymphabfluss ist spärlich mit konsekutiv niedriger Metastasierungstendenz. Ungünstiger stellt sich die Situation bei den supraglottischen Larynxkarzinomen und den im Pharynx

lokalisierten Tumoren dar, die sich durch großzügige Lymphabflussbahnen auszeichnen. So weisen bereits 80 % der Hypopharynxkarzinome bei Diagnosestellung bereits Halslymphknotenmetastasierung auf, die häufig das Erstsymptom darstellt. Aufgrund ihrer Lokalisation werden sie funktionell erst spät symptomatisch, ihre Erkennung bedarf einer sorgfältigen fachspezifischen Untersuchung, die häufig durch starke Abwehrreflexe des Patienten erschwert ist. Dies erklärt die schlechte 5-Jahres-Überlebensrate, die unter 30 % liegt (Lang et al. 2002; Grau et al. 1997; Hussey et al. 1991).

Herausragende prognostische Bedeutung kommt dem Lymphknotenstatus zu. Sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung noch keine regionären Lymphknotenmetastasen vorhanden (N0), so liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 80 %. Liegen bereits Lymphknotenmetastasen vor (N+), so sinkt die Wahrscheinlichkeit auf 5-Jahres-Überleben unter 45 %. Bei regionären Lymphknotenmetastasen sind kapselüberschreitendes Wachstum, Anzahl der betroffenen Knoten und Lokalisation der Lymphknoten für die Prognose maßgeblich entscheidend (Houck and Medina 1995, Leemans et al. 1993). Das Risiko der Lymphknotenmetastasierung steigt mit zunehmender Größe des Primärtumors (N+ bei T2-3 in 50 % und bei T4 in 75 %) und mit Abnahme des histopathologischen Differenzierungsgrades (Remmert et al. 2001). Damit ist die Prognose auf Heilung und Überlebensrate erwartungsgemäß um so schlechter, je fortgeschrittener das Tumorstadium des Patienten ist. Mit zunehmender Größe des Primärtumors steigt das Metastasierungsrisiko bei zunehmend schlechteren Bedingungen für eine vollständige chirurgische Resektion im Gesunden. Die Resektabilität von großen Primärtumoren und ausgedehnten Lymphknotenmetastasen mit Kontakt zu essentiellen anatomischen Strukturen limitiert sich durch das Ausmaß der Verstümmelung und der funktionellen Einbußen, die mit einer vollständigen Tumorsektion zu erwarten sind. Dabei eröffnet eine vollständige chirurgische Resektion des Tumors im Gesunden (R0) dem Patienten noch die größte Wahrscheinlichkeit auf ein rezidivfreies Überleben. Rezidive nehmen ihren Ursprung meist aus den Randbereichen des ehemaligen Primärtumors (Remmert et al. 2001). Entsprechend schlecht ist die

Prognose, wenn nach Therapie mikroskopisch nachgewiesener oder makroskopisch sichtbarer Resttumor (Resektionsstatus R1 bzw. R2) verbleibt.

Unter der aktuellen Standardtherapie überleben nur 30 % der Patienten die Diagnose eines fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumors (UICC III und IV) zwei Jahre oder länger (Vokes et al. 1993), in ca. 50 % kommt es zu lokoregionären Rezidiven. Bei zirka 15 % bis 30 % der Patienten treten Zweitkarzinome aufgrund der Feldkanzerisierung des oberen Aerodigestivtrakts auf. Ein Drittkarzinom ist in 1 % der Fälle (Dhooge and Albers 1994, Grau et al. 1997) zu erwarten. Klinisch nachweisbare Fernmetastasen liegen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in etwa 5 % der Fälle vor.

1.2 Karzinogenese und Immunevasion

Bei der Entstehung von Krebs kommt es in den Epithelzellen des betroffenen Organs zu Veränderungen, die zu einem aggressiven und unkontrollierten Wachstums- und Teilungsverhalten der entarteten Zellen führen. Derartige Veränderungen lassen sich durch chemische oder physikalische Einwirkung provozieren (Kanzerogene Substanzen, ionisierende Strahlen) oder können spontan ohne erkennbare Ursache entstehen. Bei bestimmten Karzinomtypen spielen eine genetische Prädisposition oder Virusinfektionen eine Rolle. Bei einer Vielzahl der Träger von SCCHN allerdings besteht ein Zusammenhang mit chronischem Tabak- und Alkoholabusus, so dass der Erkrankung eine über Jahre kumulierende Exposition mit den in diesen Genussmitteln enthaltenen krebserregenden Noxen vorausgeht.

Ein intaktes Immunsystem im gesunden Organismus ist bis zu gewissem Grad in der Lage, maligne entartete Zellen frühzeitig als solche zu erkennen und rechtzeitig zu zerstören („immune surveillance“). Durch verschiedene Strategien gelingt es Tumorzellen, das Immunsystem zu umgehen („Immune escape“). So exprimieren die meisten Tumoren von vornherein nur wenige

immunogene Peptide auf ihrer Zelloberfläche (MHC-Moleküle der Klasse I) (Hicklin et al. 1996) und keine kostimulatorischen Moleküle (Schwartz 1996), so dass die entarteten Zellen nicht erkannt werden und eine wirksame Immunantwort ausbleibt. Sind immunogene Strukturen auf Tumorzellen vorhanden, so gehen diese aufgrund genetischer Instabilität häufig durch Mutation verloren. In anderen Fällen produzieren Tumorzellen Substanzen, die immunsupprimierende Eigenschaften vermitteln (Prostaglandin E₂, Interleukin 10) oder die das Tumorwachstum fördern (TGF- β) (Gruss et al. 1992; Partridge et al. 1989).

1.3 Tumor-assoziierte Antigene (TAA)

Tumorassoziierte Antigene (TAA) sind Proteine, die in Zusammenhang mit der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren auftreten. Sie werden in oder auf Tumorzellen gebildet oder entstehen durch Induktion anderer Zellen. Sie zirkulieren als Makromoleküle im Blut und anderen Körperflüssigkeiten oder werden durch immunhistologische Methoden direkt im Tumorgeewebe nachgewiesen. Jeder Tumor weist als individuelles Resultat seiner malignen Transformation ein spezifisches Antigenmuster auf. Für manche Tumorentitäten lassen sich bestimmte Proteine mit einer gewissen Regelmäßigkeit nachweisen so dass sie als „Tumormarker“ in der posttherapeutischen Verlaufskontrolle eingesetzt werden. Unter den Tumor assoziierten Antigenen lassen sich vier verschiedene Typenklassen unterscheiden (Rosenberg et al. 1999): Sie können zum einen Fremdproteine viraler Herkunft sein (wie die Onkoproteine E6 und E7 aus HPV), oder sie entstehen durch Mutation aus vorhandenen zellulären Proteinen (wie das Zellzyklusprotein cdk 4, Caspase-8 und das Onkogen ras). Daneben gibt es eine Reihe von Proteinen, die in gesunden Zellen regulär nachweisbar sind, aber in vielen Karzinomen überexprimiert sind (EpCAM, c-myc, EGFR, Her-2/neu Rezeptor). Andere Tumoren produzieren differenzierungs- und gewebsspezifische Antigene, die physiologischerweise nur im fetalen Organismus in

erhöhten Konzentrationen vorkommen. Hierzu zählen das Karzinoembryonale Antigen (CEA), eines der ältesten als tumorassoziiert bekannten Antigene, und Alpha-Fetoprotein (AFP).

1.4 Das Tumor-assoziierte Antigen EpCAM

Zelluläre Adhäsionsmoleküle (CAM) sind in der Zellmembran integrierte Moleküle, die als Mediatoren der Zell-Zell Interaktion den Prozess der Adhäsion, Proliferation und Differenzierung regulieren. Das epitheliale Zell-Adhäsionsmolekül EpCAM ist unter verschiedenen Synonymen bekannt: KSA, epitheliales Glykoprotein 40 (EGP 40), GA 733-2, Epithelial surface antigen (ESA) und 17-1A-Antigen (Perez and Walker 1989; Strnad et al. 1989; Simon et al. 1990; Szala et al. 1990; Litvinov et al. 1994). Als homophiles Adhäsionsmolekül vermittelt EpCAM Ca^{2+} -unabhängig eine interzelluläre Adhäsion (Litvinov et al. 1994) und wird von einer Vielzahl epithelialer, vor allem adenomatöser Gewebe exprimiert, wobei eine Neoplasie dieser Gewebe mit einer starken Überexpression dieses Moleküls einhergeht (Balzar et al. 1999). Plattenepithelien (Kutis und Schleimhäute des oberen Aerodigestivtrakts) sind dagegen EpCAM-negativ, wobei es in den daraus hervorgehenden Plattenepithelkarzinomen (SCC) wiederum zu einer de novo Expression von EpCAM kommt (Quak et al. 1990).

1.4.1 Genetische Kodierung

Das GA733-2 Gen, das für EpCAM kodiert (Szala et al. 1990; Linnenbach et al. 1993), ist auf der chromosomalen Region 4q lokalisiert und hat eine geschätzte Größe von mindestens 14kb. Die transkriptionelle Aktivität des Promotors wird durch die Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B negativ reguliert (Gires et al. 2001). Das GA733-2 Gen besteht aus neun Exons und

kodiert für eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine zytoplasmatische Domäne (Linnenbach et al. 1993) (Abbildung 1).

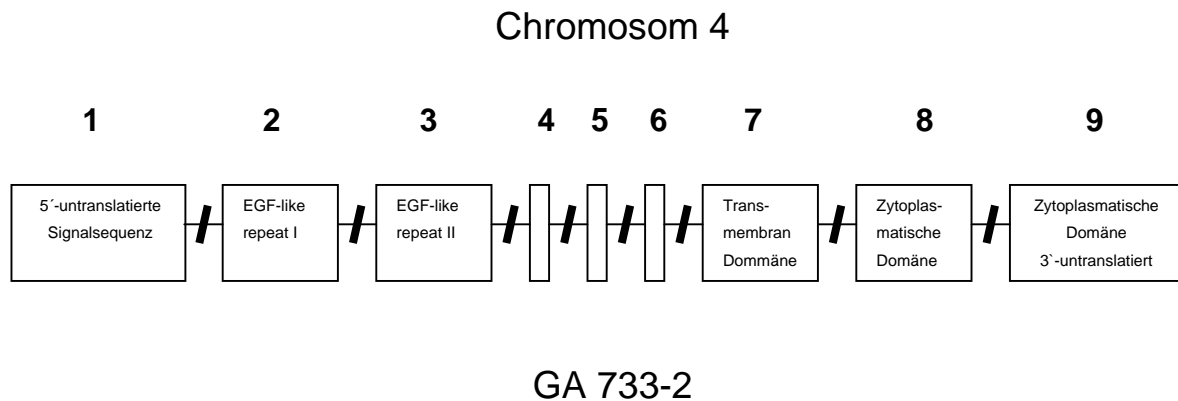


Abbildung 1: Das GA733-2 Gen kodiert für das humane Transmembran-Glykoprotein EpCAM. Es ist auf der chromosomalen Region 4q lokalisiert und besteht aus 9 Exons (nach Linnenbach et al. 1993).

Die Exons 2 bis 6 kodieren für die extrazelluläre Domäne, wobei Exon 2 und Exon 3 EGF-ähnliche Wiederholungen beinhalten. Die Transmembran-Domäne wird durch Exon 7 kodiert, die zytoplasmatische Domäne durch Exon 8 und durch Anteile von Exon 9, das außerdem noch das Stopp-Codon beinhaltet und den 3'-untranslatierten Abschnitt. Dieser Abschnitt weist ein Sequenzmotiv auf, das als ein Signal für die spezifische Degradation von mRNAs von Zytokinen, Lymphokinen und einigen Proto-Onkogenen angesehen wird (Shaw and Kamen 1986) und ein weiteres Motiv, das als Konsensussequenz für Entzündungsmediatoren identifiziert wurde (Caput et al. 1986). Man nimmt daher an, dass die Expression von EpCAM auf der posttranskriptionellen Ebene komplex reguliert ist. Bei einer Untersuchung einer Vielzahl von Karzinomzelllinien konnte kein differentielles Splicing für das Gen nachgewiesen werden, es ist nur eine mRNA für EpCAM bekannt (Balzar et al. 1999). Als einziges homologes Molekül ist beim Menschen bislang das epitheliale Glykoprotein 1 (EGP-1/Trop-2) bekannt, das bei einer Übereinstimmung von 67 % eine Homologie in der Aminosäuresequenz von

49 % mit EpCAM aufweist (Szala et al. 1990). Das Homolog ist wahrscheinlich das Resultat von „Exon Shuffling“ und einer Retroposition von mRNA des GA733-1 Gens in das Chromosom 1 vor 300 Mio. Jahren (Linnenbach et al. 1993). Für das gewebsspezifische Expressionsmuster besteht eine negative Korrelation zwischen den beiden Homologen. So findet sich in Kolon und anderen Geweben, die EGP-1- schwach exprimieren, eine starke Expression von EpCAM und umgekehrt (Stein et al. 1994). Bei zunehmender Dedifferenzierung nimmt die Expression von EGP-1 ab und die von EpCAM zu (Klein et al. 1987). Unter den höheren Wirbeltieren scheint EpCAM hoch konserviert. So konnten in der Maus, in der Ratte und im Menschen Homologe für EpCAM identifiziert werden (Zaloudik et al. 1997; Bergsagel et al. 1992).

1.4.2 Molekulare Struktur

Der offene Leserahmen von EpCAM kodiert für ein 314 Aminosäuren langes Polypeptid, bestehend aus einer 23 Aminosäuren umfassenden Leadersequenz, einer 242 Aminosäuren langen extrazellulären Domäne, die zwei EGF-ähnlichen Wiederholungen innerhalb des zysteinreichen Terminus beinhaltet, einem transmembranen Bereich mit 23 Aminosäuren und einer zytoplasmatischen Domäne, die 26 Aminosäuren enthält (Balzar et al. 1999). Der extrazelluläre Proteinanteil beinhaltet drei potentielle Glykosilierungsstellen. EpCAM wird zunächst als 34 kDa-Protein synthetisiert und dann zu einer 40 kDa-Form glykosiliert (Thampoe et al. 1988). Für Karzinome sind Varianten des Moleküls mit unterschiedlichem Molekulargewicht bekannt, für die Unterschiede in der Glykosilierung vermutet werden. (Litvinov et al. 1994). Abbildung 2 zeigt den Aufbau des Glykoproteins EpCAM.

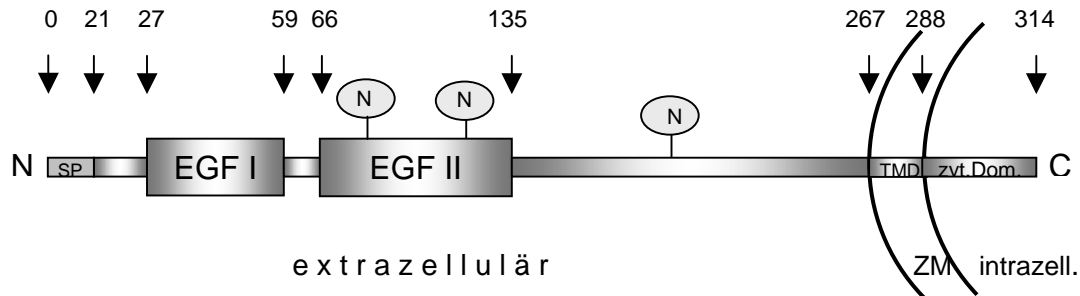


Abbildung 2: Die Struktur des EpCAM Moleküls. Das Polypeptid besteht aus 314 Aminosäuren. Die Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren an, die Kreise zeigen die N-Glykosylierungs-Stellen, die Rechtecke die einzelnen Domänen. (N=N-Terminus, SP=Signalpeptid, EGF=EGF-ähnliche Wiederholung, TMD=Transmembran-Domäne, zyt.Dom.=Zytoplasmatische Domäne, C=C-Terminus, ZM=Zellmembran).

Die extrazelluläre Domäne besteht aus insgesamt 265 Aminosäuren und beginnt am N-Terminus mit einer Signalsequenz aus 23 hydrophoben Aminosäuren. Der Signal-Peptidase Verdau findet wahrscheinlich zwischen Alanin 23 und Glutamin 24 statt (Szala et al. 1990). Es schließen sich ein zysteinreicher und eine zysteinarmer Bereich an. Die zysteinreiche Region zeigt zwei EGF-ähnlichen Wiederholungen, die beide eine homologe Sequenz zu dem lamininbindenden Matrixprotein Nidogen enthalten (Mann et al. 1989; Simon et al. 1990). Die erste EGF-ähnliche Wiederholung dient als Ligand für den Leukozyten-assoziierten Immunglobulin-ähnlichen Rezeptor LAIR1 (Meyaard et al. 2001). Das zweite EGF-ähnliche Motiv zeigt Homologien zu der Thyroglobulin Typ 1 Wiederholung (Lenarcic et al. 1997). EpCAM liegt in vitro als Dimer und als Tetramer vor (Trebak et al. 2001). Die Oligomerisierung wird durch die zweite EGF-ähnliche Wiederholung vermittelt (Balzar et al. 2001).

Den 23 hydrophoben Aminosäuren der Transmembran-Domäne schließt sich die mit 26 Aminosäuren ebenfalls vergleichsweise kurze zytoplasmatische Domäne an, sie beinhaltet ein Internalisierungsmotiv für das Polypeptid (Hopkins 1992) und zwei Konsensussequenzen für die Bindung des Zytoskelett-interagierenden Proteins α -Actinin (Balzar et al. 1998).

In Pulse-Chase Untersuchungen konnte eine posttranslational modifizierte Proteinvariante mit 32 kDa nachgewiesen werden, die durch Proteolyse aus der glykosylierten 40 kDa-Form hervorgeht (Thampoe et al. 1988). Die Position Arginin 80 innerhalb der Aminosäuresequenz von EpCAM ist eine potentielle Spaltposition für Trypsin-verwandte proteolytische Enzyme (Szala et al. 1990; Björk et al. 1993). Unter nativen Bedingungen bleiben die beiden Fragmente nach ihrer Spaltung durch kovalente Disulphidbrücken verbunden, die Reduktion der Verbindung läßt zwei Fragmente von 6 kDa und 32 kDa entstehen. Einige Epithel- und Karzinomzelllinien exprimieren nur die ungespaltene 40 kDa-Proteinform, andere zusätzlich das 32 kDa-Spaltprodukt (Thampoe et al. 1988).

1.4.3 Expression von EpCAM in menschlichen Geweben

EpCAM ist beim gesunden Erwachsenen auf der basolateralen Zellmembran aller einfacher Epithelien (insbesondere Drüsengewebe), Pseudo-Plattenepithelien und Übergangsepithelien nachzuweisen. So wird EpCAM beispielsweise von dem drüsenreichen einschichtigen isoprismatischen Epithel der Lumina des Gastrointestinaltrakts exprimiert, wobei das Ausmaß der Expression innerhalb der verschiedenen Gewebstypen deutlich variiert: In der Magenschleimhaut schwach und im Dünndarm intermediär exprimiert, weist die Mukosa des Dickdarms beim Adulten die wohl stärkste Expression von EpCAM unter allen Epithelzelltypen auf. Im Kontrast hierzu zeigen die geschichteten Plattenepithelien keine Expression von EpCAM (Balzar et al. 1999). Für das Embryonalstadium von zweieinhalb Wochen allerdings wurde eine Expression von EpCAM in allen Epithelien nachgewiesen, einschließlich der Drüsenanlagen von Pankreas und Schilddrüse, während neurales, lymphatisches und muskuläres Gewebe sowie Leberparenchym und Gonaden zu diesem Zeitpunkt EpCAM-negativ sind (Tarmann et al. 1990). Für spätere Phasen der frühen Entwicklung gelang der Nachweis von EpCAM in menschlicher Lunge, Niere, Leber, Pankreas, Haut und Keimzel-

len und im Magen- und im Thymusepithel (Kasper et al. 1995). Auch Thymozyten, T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen zeigen in der frühen Entwicklung zunächst eine hohe Expressionsrate, später kommt es zu einer Herabregulation von EpCAM (Nelson et al. 1996). Die starke EpCAM Expression im primären Lungen- und Bronchialepithel läßt sich hingegen im adulten Gewebe weiter nachweisen (Kasper et al. 1995; Momburg et al. 1987), so wie auch das Nierenepithel, die Inselzellen des Pankreas, das Gallengangsepithel und die endokrinen Drüsen beim Erwachsenen EpCAM weiter exprimieren (Balzar et al. 1999; Cirulli et al. 1995; Momburg et al. 1987). Im EpCAM-negativen Leberparenchym des Adulten kommt es interessanterweise zu einer Wiederaufnahme der EpCAM Expression in regenerierenden Hepatozyten (de Boer et al. 1999). Die nicht-epithelialen Gewebe des Mesenchyms, der Muskulatur und der neuroendokrinen Drüsen sind beim erwachsenen Menschen ausschließlich EpCAM-negativ (Momburg et al. 1987; Bumol et al. 1988; Quak et al. 1990), auch Zellen lymphoiden Ursprungs lassen keine Expression von EpCAM erkennen.

Die nachfolgende Auflistung zeigt eine Liste verschiedener Gewebs- und Zelltypen und deren Expression von EpCAM beim gesunden Erwachsenen.

Expression von EpCAM in menschlichen Geweben und Organen

EpCAM-negative Gewebe sind:

- Bindegewebe
- Nervengewebe (Gehirn)
- Skelettmuskulatur
- Blutgefäße
- Blutbildendes Knochenmark
- Immunzellen und Lymphorgane

Im Verbund von Lymphorganen vorhandene Epithelzellen (Tonsillenkrypten, Markepithel) zeigen geringe EpCAM Expression, ebenso Hassalsche Körperchen.

- Plattenepithelien der Kutis

Mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel.

Neben Plattenepithelzellen sind auch Keratinozyten und Melanozyten EpCAM-negativ.

Vereinzelte EpCAM-positive Zellen im Gewebsverband sind Haarfollikel- und Schweißdrüsenzellen.

- Plattenepithelien des oberen Aerodigestivtrakt (Mundhöhle, Pharynx Ösophagus)

Mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel.

Sekretorische Zellen im Gewebsverband sind EpCAM-positiv.

EpCAM-positive Gewebe sind:

- Respiratorisches Flimmerepithel des unterer Respirationstrakts

Hochprismatische Epithelzellen. Mittelgradige Expression von EpCAM.

Ziliäres Bronchialepithel, Alveolargänge und Alveoli (Pneumozyten) sind geringgradig positiv für EpCAM.

- **Kopfspeicheldrüsen:**
Iso- bis hochprismatisches Epithel mit serösen und mukösen Drüsen.
Azinuszellen, Gangepithelien und basale/suprabasale Zellen sind EpCAM positiv, enthaltene Plattenepithelzellen sind EpCAM-negativ.
- **Pankreas**
exokriner Teil: seröse Drüse mit Gangepithel und Azinuszellen,
endokriner Teil: Langerhanssche Inselzellen.
- **Magen-Darm-Trakt**
Einschichtiges hochprismatisches Epithel mit sekretorischen Zellen.
Schleimhaut des Magens geringgradig EpCAM positiv, im Dünndarm mittelgradige und im Dickdarm hochgradige Expression von EpCAM.
- **Leber und Gallenblase**
Gallengänge und Gallenblase (hochprismatisches Epithel) sind EpCAM -positiv,
Hepatozyten EpCAM negativ.
- **Niere und ableitende Harnwege**
Proximale Tubuli, Henle-Schleife, Bowman` Kapsel und Urothel (mehrröhriges Übergangsepithel) sind geringgradig EpCAM-positiv.
Distale Tubuli und Sammelrohre sind mittelgradig EpCAM-positiv.
EpCAM-negativ sind nur die Glomerula.
- **Genitaltrakt**
Überwiegend EpCAM-positiv.
(Ausnahmen: Drüsenepithel Ektozervix, Myometrium, Follikel-epithel, Testis)
- **Endokrine Drüsen**
Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Nebennierenrinde und -mark.
Überwiegend EpCAM-positiv.
Lediglich chromaffine Zellen des Nebennierenmarks und Pituizyten der Hypophyse sind EpCAM-negativ.

EpCAM-negative Epithelien sind das mehrschichtige, verhornende Plattenepithel der Kutis (einschließlich Keratino- und Melanozyten) und das unverhornte geschichtete Plattenepithel, das die oberen Atem- und Speisewege im Bereich von Mundhöhle, Pharynx, Ösophagus und Anteilen des Larynx auskleidet (Quak et al. 1990; Balzar et al. 1999). EpCAM-positive Zellen in dieser anatomischen Lokalisation sind die schleimbildenden- und die Speicheldrüsenzellen (Balzar et al. 1999) und analog dazu die Schweißdrüsen- und die Haarfollikelzellen der Haut, die ebenfalls EpCAM exprimieren (Momburg et al. 1987; Tsubura 1992). Eine Zwischenstellung hinsichtlich EpCAM-Expression nimmt Zervixschleimhaut des Uterus ein: Während das endozervikale Drüsenepithel stark EpCAM-positiv ist, zeigt das ektozervikale Plattenepithel keine Expression von EpCAM (Litvinov et al. 1996).

1.4.4 Expression von EpCAM in Karzinomen

Proliferation ist in einer Vielzahl von Epithelien mit einer verstärkten oder *de novo* Expression von EpCAM assoziiert (Zorzos et al. 1995; High et al. 1996; Litvinov et al. 1996). Dies zeigt sich insbesondere im Fall der EpCAM-negativen Plattenepithelien, bei denen es während des Übergangs zum Plattenepithelkarzinom zu einer *de novo* Synthese von EpCAM kommt (Quak et al. 1990). So zeigt sich in frühen Stadien von Neoplasien der Zervix eine Neoexpression von EpCAM in atypischen, dedifferenzierten Bereichen des Plattenepithels (Litvinov et al. 1996). In zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) vom Grad I und II sind die basalen und suprabasalen Zellen EpCAM-positiv, während in neoplastischen Läsionen vom Grad III bis zu 100 % EpCAM-positiv Zellen in allen Schichten des Plattenepithels nachweisbar sind. Im Verlauf der Progression von CIN I nach CIN III läßt sich eine deutliche Zunahme der EpCAM-positiven Zellen und der Expressionsstärke von EpCAM beobachten. Gleichzeitig korreliert die zunehmende Expression von EpCAM in den atypischen Zellen mit einem Verlust der Differenzierung (messbar in einer Abnahme der Differenzierungsmarker

CK13 und Involucrin) und mit einer verstärkten Proliferation (gemessen an der Zunahme des Proliferationsmarkers Ki-67) (Litvinov et al. 1996). Dieser Zusammenhang besteht in gleicher Weise für die Epithelzellen der Darmschleimhaut: Auch hier korreliert die Expression von EpCAM mit verstärkter Proliferation und Differenzierungsverlust (Schiechl et al. 1986). In der ohnehin stark EpCAM-positiven Kolonschleimhaut ist die Ausbildung von Polypen mit einer verstärkten Expression von EpCAM assoziiert (Balzar et al. 1999). In dysplastischen Veränderungen des Urothels der Blase wird EpCAM ebenfalls stärker exprimiert als im gesunden Übergangsepithel (Zorzos et al. 1995). Für Lungengewebe konnte ein ansteigender Gradient der EpCAM-Expression von gesunder Bronchialschleimhaut über epitheliale Hyperplasie zu maligne transformiertem Plattenepithel beobachtet werden (Piyathilake et al. 2000). Beim Mamma-Karzinom korreliert der Grad der EpCAM-Expression mit Tumorgröße und Lymphknoteninfiltration (Tandon et al. 1990). Bei den Plattenepithelkarzinomen der Haut kommt es zu keiner Neo-Expression von EpCAM, lediglich in Basalzellkarzinomen konnte gelegentlich eine hohe Expression festgestellt werden (Tellechea et al. 1993, Tsubura et al. 1992). Im Plattenepithel der Mundschleimhaut wiederum wurde in dysplastischen Veränderungen eine hochgradige Expression von EpCAM in den basalen und den suprabasalen Zellen nachgewiesen. EpCAM-positive Zellen ließen sich dabei immunhistologisch eindeutig von normalen, EpCAM-negativen Epithelzellen unterscheiden (High et al. 1996). Während also Tumore nicht-epithelialer Herkunft (wie Melanome, Sarkome, Lymphome und Meningiome) EpCAM-negativ sind (Balzar et al. 1999), zeigen die meisten Karzinome einschließlich der Plattenepithelkarzinome des Hals-Kopf-Bereichs eine hochgradige Expression für das Tumorantigen EpCAM (Quak et al 1990; High et al. 1996; Balzar et al. 1999).

1.4.5 Funktion von EpCAM in Epithelzellen und in Karzinomen

Die Funktion als Kalzium-unabhängiges epitheliales Adhäsionsmolekül hat zur Namensgebung von EpCAM geführt (Litvinov et al. 1994). In L-Zellen (murine Fibroblasten) führte die Expression von EpCAM zur Ausbildung von Zellaggregaten, obwohl diese Zellen üblicherweise nicht zur Zelladhäsion in der Lage sind. (Litvinov et al. 1997; Balzar et al. 1999). Zur Ausbildung einer stabilen interzellulären Adhäsion ist die zytoplasmatische Domäne des Moleküls notwendig, wobei in zytoplasmatischen Deletionsmutanten mit noch vorhandener extrazellulärer Domäne die homophile Spezifität erhalten bleibt und eine instabile Zellaggregation noch möglich ist (Balzar et al. 1998). Verglichen mit den klassischen Adhäsionsmolekülen wie den Cadherinen ist die EpCAM-vermittelte Adhäsion relativ schwach. In Zellverbänden mit Cadherin-vermittelter Zelladhäsion führt eine Überexpression von EpCAM zu einer Reduzierung dieser Form der Zelladhäsion zugunsten der durch EpCAM-vermittelten Adhäsion. EpCAM beeinflusst dabei nicht die Menge an Cadherin sondern dessen Assoziation mit dem Zytoskelett. (Litvinov et al. 1997). Über seine zytoplasmatische Domäne interagiert EpCAM mit dem Actin-Zytoskelett. Das Actin-Depolymerisations-Agenz Cytochalsin D führt zur Zerstörung der EpCAM-vermittelten Adhäsion und zur Internalisierung von EpCAM. EpCAM bindet mit seiner zytoplasmatischen Domäne an α -Actinin und ist so an der Regulation der Cadherin-vermittelten Adhäsion beteiligt (Balzar et al. 1998). Über die Regulation der interzellulären Adhäsion ist EpCAM in die Steuerung der epithelialen Morphogenese und Gewebserhaltung involviert. Die Bedeutung dieser morphoregulatorischen Funktion von EpCAM konnte für die Entwicklung von Langerhans-Inseln nachgewiesen werden (Cirulli et al. 1998). Die bedeutende Rolle von EpCAM für Zellwachstum und -reifung wird in mehreren Arbeiten beschrieben: In epithelialen Hyperplasien, Dysplasien und Neoplasien korreliert das Ausmaß der EpCAM-Expression mit Proliferation und zellulärer Dedifferenzierung (Balzar et al. 1999; Litvinov et al. 1996; Piyathilake et al. 2000). Erst kürzlich gelang es, den direkten Einfluss von EpCAM auf das Wachstum und den

Metabolismus von Zellen nachzuweisen. In Untersuchungen an HEK293, einer Zelllinie aus EpCAM-negativen, epithelialen humanen embryonalen Nierenzellen und an murinen NIH3T3 Fibroblasten führte die Expression von EpCAM zu verstärktem Zellwachstum, reduzierter Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und zu einer Zunahme des Zellmetabolismus (Münz 2003). Der Leukozyten-assoziierte Immunglobulin-ähnliche Rezeptor LAIR1, der erst kürzlich als Bindungspartner von EpCAM identifiziert wurde (Meyaard et al. 2001), deutet auf einen weiteren bedeutenden funktionellen Aspekt des Proteins. LAIR1 wird auf vielen Zellen des Immunsystems exprimiert und übermittelt inhibitorische Signale. Der LAIR1 Ligand könnte somit zu einer Toleranz von Immunzellen gegenüber EpCAM-positiven Karzinomzellen beitragen.

1.4.6 EpCAM-regulierte Gene und Proteine

Im Rahmen der funktionellen Entschlüsselung auf molekularer Ebene konnten verschiedene EpCAM-regulierte Gene identifiziert und ein Einblick in die komplexe Signaltransduktion des Moleküls gewonnen werden. So ließ sich nachweisen, dass das Onkogen c-myc ein frühes Zielgen von EpCAM ist (Münz 2003). Ebenso erfahren die beiden Cycline A und E eine rasche Induktion durch EpCAM und sind zudem als c-myc-regulierte Gene beschrieben (Jansen-Durr et al. 1993). Die Induktion von c-myc und der beiden Cycline könnte einen zentralen Aspekt der EpCAM-vermittelten Effekte in neoplastischen Epithelzellen darzustellen.

In Proteomanalysen konnte gezeigt werden, dass EpCAM die Expression des Fettsäuren-bindende Protein E-FABP induziert. Das Protein spielt eine wichtige Rolle im Transport und Metabolismus langkettiger Fettsäuren (LCFA) und in der Bereitstellung signaltransduzierender Zellmetaboliten, wie Eicanosioide und Prostaglandine (Glatz et al. 1993; Siegenthaler et al. 1993; Siegenthaler et al. 1994). Eine Überexpression von E-FABP wurde in chemoresistenten Pankreaskarzinomen nachgewiesen (Sinha et al. 1999)

sowie in hyperproliferativen Keratinozyten bei Psoriasis (Siegenthaler et al. 1993; Siegenthaler et al. 1994). Die erhöhte Funktion des Moleküls deckt dabei einen erhöhten zellulären Bedarf an LCFA, außerdem bindet E-FABP Selen, das zum Gleichgewicht des zellulären Redoxpotentials beiträgt und für schnell proliferierende Zellen essentiell ist. Da E-FABP als Zielgen von c-myc nachgewiesen ist (Coller et al. 2000) und die Expression von E-FABP und EpCAM in Karzinomzelllinien, Primärtumoren und in Tumorangrenzendem Gewebe korreliert, ist anzunehmen, dass diese Proteine Bestandteil einer Signalkaskade sind (Münz 2003).

Als weiteres EpCAM-reguliertes Protein konnte die Glyoxalase I (Glox I) nachgewiesen (Münz 2003) werden. Das Enzym metabolisiert in der Glykolyse anfallendes Methylglyoxal, dessen Anhäufung in der Zelle die DNA-, RNA- und Proteinsynthese inhibiert und dadurch einen Wachstumsstopp bewirken kann. Eine Aktivitätssteigerung von Glx I kann somit ein erhöhtes Zellwachstum unterstützen. Die Regulation des Enzyms wiederum erfolgt indirekt durch EpCAM über die Kalzium-abhängige Calmodulin 1 Kinase (Deswal and Sopory 1999), die über die Regulation verschiedener Enzyme Zellzyklus und Wachstum beeinflusst (Means and Dedman 1980; Means et al. 1991).

Die regulatorische Untereinheit der Cyclin-abhängigen Kinase (CKS 1)/cdc28 Kinase, das Ras-Homolog Rho B und der Replikationsfaktor RFC 37 sind drei weitere an der Zellzyklusregulation beteiligte Gene, die kürzlich als EpCAM-regulierte Gene nachgewiesen wurden (Münz 2003), wobei auch RFC 37 bereits als Zielgen von c-myc bekannt ist (Schuhmacher et al. 2001). Als EpCAM-reprimierte Gene konnten 14-3-3-sigma (ein Gegenspieler zu CKS 1 in der Zellzyklusregulation), EGR-1 und die Dnase X (die in die Vorgänge der Apoptose involviert sind) und die Adhäsionsmoleküle CD36 und Zyxin identifiziert werden. Während CD36 eine Rolle in der Zelldifferenzierung zugeschrieben wird (Beckerle 1997), könnte die Reprimierung von Zyxin die Metastasierung EpCAM-exprimierender Tumorzellen fördern (Tsuchida et al. 1999; Rofstad and Graff 2001).

Zusammenfassend besitzt EpCAM in Karzinomen eine bedeutende funktionelle Rolle, indem es Zellproliferation und Metabolismus verstärkt und eine abschwächende Wirkung auf interagierende Immunzellen ausübt.

1.4.7 Differentielle Glykosylierung von EpCAM

Aufgrund der Aminosäuresequenz des EpCAM-Proteins geht man von drei potentiellen Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne aus, von denen die ersten beiden in der zysteinreichen Region innerhalb der zweiten EGF-ähnlichen Wiederholung lokalisiert wurden, die dritte Glykosylierungsposition wird der zysteinarmen Region zugeordnet (Perez and Walker 1989; Simon et al. 1990; Strnad et al. 1989; Szala et al. 1990). Es wird angenommen, dass alle drei Positionen mit Mannose-Oligosachariden glykosyliert werden (Durbin et al. 1990; Schön et al. 1993). Pulse-Chase Untersuchungen konnten zeigen, dass EpCAM zunächst als 34 kDa-Protein synthetisiert und anschließend zur 40 kDa-Form glykosyliert wird. Die glykosylierte Proteinform kann durch Proteolyse in zwei Fragmente von 6 kDa und 32 kDa gespalten werden (Thampoe et al. 1988). Untersuchungen mit Inhibitoren der N- und O-Glykosylierung an EpCAM exprimierenden Zellen trugen zur weiteren Aufklärung der Glykosylierung von EpCAM indem sie eine O-Glykosylierung ausschließen konnten und davon ausgehen lassen, dass das Glykoprotein in einer N-glykosylierten Form vorliegt.

In Karzinomzelllinien konnten unterschiedliche Varianten von EpCAM mit Molekulargewichten von 37, 40 und 42 kDa nachgewiesen werden (Litvinov et al. 1994), wobei es Hinweise gibt, dass es sich hierbei um unterschiedliche Glykosylierungsformen handelt. Ob eine Spezifität bestimmter Glykosylierungsformen für bestimmte Gewebe oder gar Neoplasien besteht, ist bis jetzt nicht bekannt. Auch über die Funktion der Glykosylierung von EpCAM existieren noch keine Daten. Für verschiedene andere Moleküle wie beispielsweise dem Fc γ -Rezeptor, Immunglobulinen und weiteren Proteinen wurde nachgewiesen, dass eine Modifikation durch Glykosylierung eine

wesentliche Rolle in der Erkennung von Rezeptoren und Liganden spielt (Rudzky and Jothy 1997; Kato et al. 1999).

1.4.8 EpCAM in Diagnostik und Immuntherapie

Bemühungen um verbesserte diagnostische Möglichkeiten bei Krebserkrankungen führten zur Entwicklung von monoklonalen Antikörpern (mAbs), die spezifisch an Tumor-assoziierte Antigene binden (Koprowski et al. 1979; Oosterwijk et al. 1986). Viele dieser Antikörper zeigten sich dabei als spezifisch für Membranantigene von Tumorzellen. Die Herstellung von Antikörpern in Mäusen durch Immunisierung mit Karzinomzellen ließ in EpCAM ein Protein von herausragender Immunogenität erkennen, was zur Entwicklung einer größeren Zahl von mAbs führte, die mit der extrazellulären Region des Proteins reagieren (Balzar et al. 1999) (Tabelle 2).

1. EGF-ähnliche Wiederholung	2. EGF-ähnliche Wiederholung	zysteinarne Region
17-1A	2G8	311-K1
323/A3		MM104
KS1/4		
GA733		
MOC31		
VU1D9		
K931		
C 215		

Tabelle 2: Monoklonale Antikörper (mAbs) und deren Bindungsregionen in der extrazellulären Domäne des EpCAM Proteins. Ein Großteil der mAbs reagiert mit einem der teilweise überlappenden Epitope in der ersten EGF-ähnlichen Wiederholung (1. EGF-like repeat).

Da das Transmembranprotein EpCAM von den meisten Karzinomen überexprimiert wird, wurde es bald als attraktives Zielmolekül für Immuntherapie erkannt. Die ersten Therapieversuche von Karzinomen mit EpCAM wurden mit unkonjugierten monoklonalen Antikörpern durchgeführt und ließen eine gewisse therapeutische Wirkung erzielen (Ragnhammar et al. 1993; Mellstedt et al. 1991; Weiner et al. 1993). Nach Therapieerfahrungen über ein Jahrzehnt hinweg musste jedoch festgestellt werden, dass mAbs nicht in der Lage sind, größere solide Tumormassen zu eliminieren (LoBuglio and Saleh 1992). Als Ursache wird vermutet, dass in größeren Tumoren keine ausreichenden Konzentrationen von mAbs erreicht werden, um einen wirksamen therapeutischen Effekt zu erzielen. Dennoch scheinen mAbs in der Lage zu sein, einzelne Tumorzellen zu eliminieren und damit die Ausbildung von Metastasen zu verhindern, ein Umstand, der entscheidend für das Überleben von Patienten mit minimal residual disease sein kann. Da die Affinität des mAbs 17-1A zu EpCAM relativ niedrig ist, erhoffte man, durch Antikörper höherer Affinität bessere Resultate zu erreichen (Velders et al. 1995), was in der Entwicklung von GA733 und 323/A3 resultierte. Diese mAbs erreichten eine hohe Affinität zu EpCAM, was aber wiederum zu toxischen Nebenwirkungen in gesunden, EpCAM-positiven Geweben führte (Herlyn et al. 1991). Eine Wirkungsverstärkung von mAbs in vitro konnte unter zusätzlicher Anwendung von Interferon Gamma beobachtet werden (Takamuku et al. 1996). Neuere Techniken ermöglichten schließlich die Herstellung rekombinanter single-chain Antikörper mit hoher Affinität zu EpCAM (Roovers et al. 1998).

Eine Weiterentwicklung weg von der passiven zu einer aktiven Form der Immuntherapie mit EpCAM stellt der Einsatz von bispezifischen Antikörpern (bsAb) dar, die einerseits an das Tumorantigen und andererseits an Immunzellen, namentlich T-Zellen binden. So gelang zunächst die Entwicklung eines einkettigen bsAb, der neben seiner Spezifität für EpCAM den CD3/T-Zell-Rezeptorkomplex spezifisch bindet und der in vitro eine ca. um den Faktor 10^3 verbesserte Toxizität gegenüber Tumorzellen erreichen ließ (Kufer et al. 1997; Helfrich et al. 1998). Die Immuntherapie mit bispezifischen

Antikörpern zielt darauf ab, ein spezifisches Tumor-assoziiertes Antigen zu identifizieren und aktivierte T-Zellen wirksam gegen Karzinomzellen zu mobilisieren. In der Behandlung der minimal residual disease kann die Anwendung von bsAb die Prognose verbessern (Kufer et al. 1997). Eine weitere Steigerung der Wirksamkeit soll die Kombination von mAbs oder bsAb mit Chemotherapeutika und Zytokinen bewirken (Mellstedt et al. 2000; Flieger et al. 2000).

Eine neue Klasse unter den gegen EpCAM gerichteten Antikörpern repräsentiert der komplett bispezifische Antikörper BiUII (aEpCAM/aCD3), der in der Lage ist, Tri-Zell-Komplexe aus Tumorzellen, T-Zellen und akzessorischen Immunzellen auszubilden. Der Antikörper generiert nicht nur eine T-Zell-Reaktion sondern aktiviert über eine Fc-Region zusätzlich akzessorischen Immunzellen, die über einen Fc γ -Rezeptor verfügen und die Tumorzellen direkt phagozytieren (Zeidler et al. 2000) und zur Produktion von Interleukinen und anderen Zytokinen angeregt werden (Zeidler et al. 1999; Zeidler et al. 2001). In vitro führte die durch BiUII angestoßene Immunreaktion zu einer effizienten Tumorzellelimination.

Weitere Ansätze in der aktiven Immuntherapie basieren auf Vakzinierung mit rekombinanten Proteinen, die immunogene Epitope des karzinomassoziierten Antigens präsentieren und eine Immunantwort auf humoraler und zellulärer Ebene bewirken sollen (Zaloudik et al. 2002). Bei Patienten mit Kolonkarzinom konnte nach Vakzinierung mit dem EpCAM Protein und zusätzlicher Zytokiningabe eine deutliche T-Zell-Antwort beobachtet werden (Mellstedt et al. 2000).

Als Tumormarker konnte beim Pankreaskarzinom für EpCAM eine vergleichbare Sensitivität und Sensibilität wie für etablierte Markersubstanzen nachgewiesen werden (Gansauge et al. 1996). In einer Untersuchung von 205 Mammakarzinomen wurde in über einem Drittel der Fälle eine Überexpression von EpCAM immunhistologisch nachgewiesen und war mit einer schlechten Prognose assoziiert (Gastl et al. 2000). Für Patienten mit

SCCHN konnte gezeigt werden, dass EpCAM ein effizientes Zielgen zur Detektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und peripheren Blut ist und damit zur Erkennung einer minimal residual disease beitragen kann (Chaubal et al. 1999; Wirtschafter et al. 2002). EpCAM bietet also interessante Ansatzpunkte für weitere Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie von Karzinomen.

1.5 Zielsetzung

EpCAM spielt eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese und bietet einen interessanten diagnostischen und therapeutischen Angriffspunkt. Bislang ist nicht bekannt, welchen Einfluss das Ausmaß der Glykosylierung auf das Molekül in funktioneller Hinsicht hat und ob die unterschiedlichen Glykosylierungsformen Gewebsspezifität besitzen. Auf diagnostischer Ebene konnte EpCAM als Marker zur Detektion disseminierter Epithelzellen in Blut und Knochenmark eingesetzt werden (Chaubal et al. 1999). Von therapeutischer Seite her gibt es Ansätze, in denen EpCAM als Zielmolekül in der passiven und aktiven Immuntherapie fungiert (Riethmüller et al. 1998; Zeidler et al. 1999; Zeidler et al. 2000; Mellstedt et al. 2000). Da EpCAM allerdings auch in gesunden Geweben wie Schilddrüse und Schleimhaut des Kolons exprimiert wird, kommt es gerade in diesen Organen zu zytostatisch induzierten Nebenwirkungen in der Immuntherapie (Herlyn et al. 1991). Der Nachweis einer tumorspezifischen Variante von EpCAM wäre dahingehend eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung neuer Formen von Immuntherapien mit größerer Effizienz und geringeren Nebenwirkungen.

Ziel der Arbeit war es daher herauszufinden, ob für EpCAM unterschiedliche Glykosylierungsformen existieren, die Gewebsspezifität, insbesondere für gesunde Epithelien und für Plattenepithelkarzinome besitzen. Zur Darstellung differenter Glykosylierungsformen sollte EpCAM zunächst in vitro anhand von Zelllinien maligne entarteter Plattenepithelien untersucht werden. Anschließend sollte die gewebsspezifische Expression und Glykosylierung in

Primärtumoren und gesundem Gewebe von Tumorpatienten untersucht werden. Hierfür wurde gesundes, physiologisch EpCAM-exprimierendes Epithelgewebe mit autologem Tumorgewebe aus Karzinompatienten verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Elektrophoresesystem	Hoefler, Amersham Biosciences, Freiburg
Netzgerät	Bio-Rad, Richmond (USA)
Filmentwicklungsmaschine	Agfa Deutschland, Frankfurt
Filmkassetten	Amersham Biosciences, Freiburg
Westernblot System	Bio Rad, Richmond (USA)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme	Amersham Biosciences, Freiburg
Thermomixer	Eppendorf Hamburg
Ultrazentrifuge	Heraeus Instruments, Hanau
Universal Microplate Reader	Bio Tek-Instruments Inc.
Zentrifugen	Eppendorf, Hettich, Sorvall

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen 5/ 10/ 20 ml	Braun, Melsungen
Immobilon-P Membran	Millipore, Bedford (USA)
Kunststoffröhrchen steril, 15/ 50 ml	Falcon/BD Le Pont de Claix (F)
3 MM Whatman-Papier	Bender & Hobein, München
Petri-Schalen	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle	Feather/PFM, Köln
96-well-Platten	Falcon/BD Le Pont de Claix (F)

Zellsiebe 100 µm	Falcon/BD Le Pont de Claix (F)
Zentrifugengefäße 1,5/ 2 ml	Eppendorf, Hamburg

2.1.3 Chemikalien

Acrylamid	Schröder Diagnostics, Stuttgart
APS (Ammoniumpersulfat)	Bio-Rad, Richmond (USA)
Isopropanol 99,8 %	Merck, Darmstadt
Methanol 99,8 %	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Serva, Heidelberg
PBS-Tabletten	Gibco BRL, Karlsruhe
SDS (Dodecylsulfate Na-salt)	Serva, Heidelberg
TEMED (N,N,N,N-Tetramethyl- Ethylendiamin)	Amersham Biosciences, Freiburg
TWEEN	Serva, Heidelberg

2.1.4 Antikörper und Reagenzien

HRP –Maus Ig (P0260) Kaninchen/IgG	Dako, Glostrup (DK)
C 215, Dr. Horst Lindhofer,	GSF Forschungsinstitut München
Tunicamycin,	Sigma, Heidelberg
N-acetyl Galactosaminid,	Sigma, Heidelberg

2.1.5 Puffer

Lysispuffer	PBS1 1 % Triton X-100, Protease-Inhibitoren
PBS Puffer	PBS-Tabletten zur Herstellung von Phosphatpuffer (GIBCO BRL, Karlsruhe)
10 x Blotting buffer	250 mM tris, 1,26 M Glycin
10 x Running buffer	250 mM Tris, 1,26 M Glycin, 1 % SDS
Waschpuffer	TWEEN 0,05 % in PBS
Milchlösung	3-5 % Milchpulver (SERVA) in Waschpuffer

2.1.6 Sonstiges

BCA™ Proteinassay	Pierce, Rockford (USA)
ECL™ Westernblotting System	Amersham Biosciences, Freiburg
Proteingrößenstandard	‘Benchmark’ Invitrogen, Karlsruhe (prestained)

2.2 Zelllinien

Zunächst wurde die unterschiedliche Glykosilierung von EpCAM untersucht. Zur Untersuchung gelangten Karzinomzelllinien vorwiegend aus Plattenepithelkarzinomen, die aus Tumoren unterschiedlicher Herkunft stammen:

- FaDu, PCI-1, PCI-13, HLAC-78 und Tu179 aus SCCHN
- HCT-8 aus Kolonkarzinom
- MCF-7 und SkBr3 aus Mammakarzinom
- HeLa aus Zervixkarzinom

Zur weiteren Differenzierung der Glykosilierung wurden Messungen unter der Anwesenheit von Tunicamycin und N-acetyl Galactosaminid durchgeführt, zweier Inhibitoren der N- und O-Glykosilierung. Tunicamycin ist ein N-Inhibitor, der den ersten Glykosilierungsschritt an der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums hemmt, N-acetyl Galactosaminid hingegen ist ein Inhibitor der O-Glykosilierung.

2.3 Patienten

Zur Beurteilung der Glykosilierung von EpCAM in vivo konnten 60 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen aus dem Hals-Kopf-Bereich untersucht werden. Darüber hinaus wurden außerdem Gewebeproben von vier Patienten mit Magen-Darm-Karzinomen untersucht. In Tabelle 3 sind die Patienten- und Tumor-bezogenen Daten der 60 untersuchten Patienten mit SCCHN dargestellt.

Pat. Nr.	Tumor-lokalisierung	Alter (Jahre)	Diff. Grad	TNM-Kategorie			UICC
01	Larynx	54	G2	pT4	pN0	M0	IV
02	Hypopharynx	57	G3	pT4	pN2c	M0	IV
03	Oropharynx	49	G3	pT3	pN2c	M0	IV
04	Larynx	72	G3	pT3	pN0	M0	III
05	Hypopharynx	50	G3	pT4	pN1	M0	IV
06	Larynx	54	G3	pT4	pN2b	M0	IV
07	Oropharynx	55	G2-3	cT3	N2b	M0	IV
08	Mundboden	55	G3	pT2	cN0	M0	II
09	Oropharynx	54	G2	pT1	pN2a	M0	IV
10	Oropharynx	61	G3	pT4	pN2c	M0	IV

Pat. Nr.	Tumor-lokalisierung	Alter (Jahre)	Diff. Grad	TNM-Kategorie			UICC
11	Larynx	81	G3	cT3	cN0	M0	III
12	Hypopharynx	60	G2	pT3	pN1	M0	III
13	Larynx	61	G1	pT3	pN0	M0	III
14	Hypopharynx	58	G3	pT4	pN2c	M0	IV
15	Larynx	60	G3	pT1a	pN0	M0	I
16	Hypopharynx	54	G3	pT4	pN2c	M0	IV
17	Oropharynx	44	G3	pT3	pN2c	M0	IV
18	Hypopharynx	67	G3	pT4	pN2b	M0	IV
19	Hypopharynx	55	G3	pT2	pN2c	M0	IV
20	Larynx	54	G2	pT3	pN2b	M0	IV
21	Hypopharynx	51	G3	pT4	pN0	M0	IV
22	Mundboden	54	G2	pT3	pN2b	M1	IV
23	Larynx	60	G3	pT4	pN2c	M0	IV
24	CUP	47	G3	Tx	pN3	M0	IV
25	Hypopharynx	52	G3	pT4	pN2c	M0	IV
26	CUP	50	G3	Tx	pN3	M0	IV
27	Larynx	60	G3	pT3	pN0	M1	IV
28	Larynx	52	G3	cT4	cN3	M0	IV
29	Oropharynx	70	G3	pT1	pN3	M0	IV
30	Oropharynx	63	G3	pT4	pN0	M1	IV
31	Larynx (Rez.)	53	G3	pT1a	cN0	M0	I
32	Oropharynx	78	G2	pT2	pN0	M0	II
33	Hypopharynx	50	G2-3	pT2	pNo	M0	II
34	Oropharynx	56	G3	pT3	pN2b	M0	IV
35	Hypopharynx	56	G3	pT3	pN2b	M0	IV
36	Oropharynx	46	G3	pT2	pN0	M0	II
37	Hypopharynx	54	G3	pT3	pN3	M0	IV
38	Oropharynx	52	G3	pT2	pN2b	M0	IV
39	Larynx	54	G3	pT2	pN1	M0	III
40	Oropharynx	56	G3	PT3	N2b	M0	IV
41	Hypopharynx	41	G3	pT2	pN1	M0	III
42	Hypopharynx	56	G2	pT2	pN2b	M0	IV
43	Larynx (LK)	67	G1-2	pT2	pN2b	M0	IV
44	Larynx	57	G2	pT3	pN0	M0	III
45	Larynx	65	G3	pT4	pN2b	M0	IV

Pat. Nr.	Tumor-lokalisierung	Alter (Jahre)	Diff. Grad	TNM-Kategorie			UICC
46	Larynx	61	G3	pT4	pN0	M0	IV
47	Larynx	61	G3	pT4	cN2c	M0	IV
48	Larynx	63	G3	pT2	pN1	M0	III
49	Hypopharynx	65	G3	pT4	pN2b	M0	IV
50	Oropharynx	58	G3	pT2	pN2a	M0	III
51	Larynx	67	G2-3	pT4	pN0	M0	IV
52	Oropharynx	61	G1-2	pT4	pN0	M0	IV
53	Larynx	71	G3	pT2	pN0	M0	II
54	Hypopharynx	66	G1	pT4	pN1	M0	IV
55	Larynx	43	G2-3	pT4	pN2c	M0	IV
56	Hypopharynx	51	G3	pT4	pN2b	M0	IV
57	Larynx	54	G3	pT4	pN0	M0	IV
58	Hypopharynx	53	G3	cT4	cN3	M0	IV
59	Larynx	59	G2	pT3	pN2c	M0	IV
60	Larynx	69	G1-2	pT4	pN0	M0	IV

Tabelle 3: Patienten- und Tumor-bezogene Daten der 60 untersuchten Patienten mit SCCHN. Aufgeführt sind Tumorlokalisierung und Patientenalter und das Tumorstadium nach TNM -Klassifikation und UICC. In der TNM-Kategorie ist angegeben, ob die Klassifizierung in T- und N-Stadien aufgrund histopathologischer Untersuchung oder klinisch („c“) vorgenommen wurde, „M0“ bezeichnet das Fehlen, „M1“ das Vorhandensein von Fernmetastasierung. (Rez.=Rezidiv, LK=Biopsie aus Halslymphknotenmetastase).

2.4 Methoden

2.4.1 Gewebeproben aus Tumorpatienten

Karzinompatienten wurden intraoperativ Gewebeproben aus Tumor und gesunder EpCAM-positiver Schleimhaut entnommen und im Westernblot auf die Expression von EpCAM und dessen Glykosilierung untersucht:

- 60 Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen
 - Proben aus Tumorgewebe (TU)
 - Proben aus Schilddrüsengewebe (SD)
 - autologe Probenpaare aus Tumor und Schilddrüse (TU/SD)

- 4 Patienten mit Karzinomen aus dem Gastrointestinaltrakt (Kolon, Magen)
 - Autologe Probenpaare aus gesundem und Karzinomgewebe
 - Proben aus gesunder Kolonschleimhaut

Allen 60 Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen wurden Proben aus dem Tumorgewebe entnommen. Da die gesunden Plattenepithelien der oberen Atem- und Speisewege im Gegensatz zu den daraus hervorgehenden SCCHN kein EpCAM exprimieren, wurde unter der Zielsetzung, die Glykosilierung von EpCAM in gesundem und in Tumorgewebe zu vergleichen, EpCAM-positives Epithel aus einem weiteren Organ als Referenz herangezogen. Hierfür wurde die Schilddrüse ausgewählt, da dieses Organ regulär EpCAM exprimiert und seine unmittelbar benachbarte anatomische Lokalisation eine wenig aufwendige Probenentnahme im Rahmen der tumorchirurgischen Maßnahmen erlaubte. So wurde bei 44/60 Patienten intraoperativ neben den Tumorbiopsaten zusätzlich autologes Schilddrüsen-

gewebe für gesundes EpCAM positives Gewebe gewonnen. Da die Mukosa im Gastrointestinaltrakt im Gegensatz zur Schleimhaut des oberen Aerodigestivtrakts EpCAM exprimiert, konnten bei den 4 Patienten mit Karzinomen aus dem Magen-Darm-Trakt Biopsate aus benachbarter gesunder Mukosa als Referenz entnommen werden. Die Glykosilierung von EpCAM wurde dann in gesundem und in autologem Karzinomgewebe untersucht und miteinander verglichen.

2.4.2 Aufbereitung der Gewebeproben

Die untersuchten Zelllinien standen in unserem Labor bereits als Lysate zur Verfügung, bei Patienten mit SCCHN wurden Gewebeproben intraoperativ aus den Primärtumoren (bzw. in einem Fall aus einer Halslymphknotenmetastase) und aus autologem gesunden Schilddrüsengewebe entnommen. Aus den Gewebeproben und den Zelllinien wurden Zelllysate mit angeglichenen Proteinmengen hergestellt, die enthaltenen Proteine durch vertikale Gelelektrophorese nach Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend EpCAM mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert und auf dessen Glykosilierung untersucht. Über die Lage der Banden im Westernblot konnte das Molekulargewicht der gemessenen Proteine mit Hilfe eines Proteingrößenstandards erfasst werden, anhand die Intensität der Banden wurde der Grad der Glykosilierung optisch evaluiert.

Die entnommenen Gewebeproben wurden dazu in sterile Phosphatpufferlösung übertragen, mechanisch zerkleinert und durch Zellfilter mit 100 µm Porengröße zu Einzelzellsuspensionen homogenisiert. Nach Zentrifugation (10 min bei 3000 U/min) wurde der Überstand dekantiert und die Zellpellets in Eppendorf Gefäße übertragen und mit jeweils 500 µl Lysispuffer (PBS1 1 % Triton X-100, Protease-Inhibitoren) bei Raumtemperatur über 4 Stunden inkubiert. Der hypotone Lysispuffer bewirkt die Lyse der Zellmembranen und setzt die zellulären Proteine frei, die Zellkerne bleiben dabei intakt. Die Zelllysate wurden anschließend 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert und in

frische Eppendorf Gefäße überführt. Die Gewebeproben von Tumorpatienten aus dem Gastrointestinaltrakt wurden uns von der Chirurgischen Klinik der LMU in eingefrorenem Zustand überlassen. Aus ihnen wurden ebenfalls Zellysate im gleichen Verfahren hergestellt. Alle Lysate wurden anschließend zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

2.4.3 Messung des Proteingehalts

Um die Expression und Glykosilierung von EpCAM in den verschiedenen Gewebeproben vergleichen zu können, wurde der Proteingehalt der Zellysate bestimmt und gleiche Proteinmengen aufgetrennt.

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCATM Protein Assay Kit (PIERCE). Der Assay beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu. Vorhandenes Protein wird dabei durch Lilafärbung sichtbar. Die Farbintensität entspricht der Proteinkonzentration und wird durch Extinktionsmessung erfasst. Mit Hilfe eines in bekannter Konzentration aufzutragendem Referenzproteins wird der Proteingehalt der Lysate dann rechnerisch ermittelt. Um in der Gelelektrophorese äquivalente Proteinmengen messen zu können, wurden die Lysate dann mit Lysispuffer auf eine einheitliche Konzentration verdünnt.

2.4.4 Vertikale Gelelektrophorese

Die in den Lysaten enthaltenen Proteine wurden zunächst durch vertikale Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Das Grundprinzip der Elektrophorese besteht in der Migration elektrisch geladener Teilchen in einem Medium durch ein elektrisches Feld. Unter Verwendung eines Polyacrylamidgels als Medium nützt man einen molekularen Siebeffekt und erreicht Auftrennung der Proteine nach

Molekulargewicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle wird nicht nur durch ihre Ladung, sondern auch durch ihre Größe bestimmt. Durch Zugabe anionischer Detergentien wie Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die Ladung der zu trennenden Proteinmoleküle annähernd egalisiert. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird somit ausschließlich durch die Molekülgröße bestimmt. Das Trenngel wurde aus 15 ml Acrylamid 12,5 %, 100 µl APS und 30 µl TEMED hergestellt davon und je 6,5 ml in Hoefer-Elektrophoresekammern gegossen. Zum Glätten der Geloberkanten wurde Isopropanol überschichtet, das nach fünfzehnminütigem Aushärten wieder abgegossen und mit aqua dest. ausgewaschen wurde. 8 ml Stacking-Gel wurden unter Zugabe von 50 µl APS und 30 µl TEMED hergestellt und hiervon je 4 ml in die Gelkammern gegossen. Durch Einstecken eines Platzhalters (Gelkamm) in die Stacking-Gelschicht wurden in jeder Gelkammer zehn Taschen zur Aufnahme der Proben gebildet. Die in ihrer Proteinkonzentration mit Lämmli-Puffer angeglichenen Lysate wurden für 2 Minuten in den Heizblock (95°C) gegeben und kurz bei 14000 U/min zentrifugiert und in die präformierten Geltaschen aufgetragen. Neben den Proben wurde in jede Gelkammer ein Markerprotein als Proteingrößenstandard aufgetragen. Das Molekulargewicht der gemessenen Proteine konnte dann nach Darstellung im Westernblot anhand der Lage der dargestellten Banden abgelesen werden. Die Gele wurden mit je 30 mA aufgetrennt.

2.4.5 Immunblotting (Westernblot)

Nach Auftrennung in der vertikalen Gelelektrophorese wurden die Proteine vom Gel auf eine Immobilon-P Transfermembran (Millipore) übertragen (Westernblot; 100 V; 500 mA, 45 min). Die negativ geladenen Proteine wandern dabei unter der angelegten Spannung in Richtung Anode vom Gel auf die Millipore-Membran. Durch 15-minütige Inkubation der Membranen in Blockpuffer (Milchlösung 5 % in Waschpuffer) wurde die unspezifische Bindung von Antikörpern unterbunden. Zur Detektion von EpCAM wurde

dann der spezifische Primärantikörpers C 215 (5 ml/ 0,1 µg/ml pro Membran) aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur und leichter Bewegung in einem sterilen Kunststoffröhrchen (Falcon, 50 ml) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen in Waschpuffer wurden auf jede Membran 5 ml des Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers (Rabbit-anti-mouse, DAKO, 1:5000) aufgetragen und 30 Minuten bei Raumtemperatur und leichter Bewegung in einem sterilen Kunststoffröhrchen inkubiert, anschließend erneut 30 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Die an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase setzt das ECL-Substrat (ECLTM Westernblotting System) um. Die resultierende Lumineszenz wurde mittels Röntgenfilm visualisiert, wobei sich das mit Hilfe des spezifischen Antikörpers C 215 markierte EpCAM in bandenförmiger Struktur zur Darstellung kam. Die Molekulargewichte konnten sodann anhand des aufgetragenen Proteingrößenstandards abgelesen werden, der Grad der Glykosilierung wurde aus der Intensität der EpCAM-repräsentierenden Banden optisch evaluiert.

3. Ergebnisse

3.1 EpCAM-Glykosilierung in Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen

Die Glykosilierung von EpCAM wurde zunächst an verschiedenen Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen untersucht, die aus Tumoren unterschiedlicher Lokalisation stammen. FaDu, PCI-1, PCI-13, HLAC-78 und Tu179 sind Zelllinien aus SCCHN; SkBr3 und MCF-7 aus Mammakarzinom; HCT-8 aus Kolonkarzinom und HeLa aus Zervixkarzinom. Anhand der Bandenstruktur ließen sich die verschiedenen Formen von EpCAM, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden, identifizieren. Alle untersuchten Zelllinien, ausgenommen HeLa, welche EpCAM-negativ ist, exprimierten verschiedene Varianten von EpCAM mit Molekulargewichten zwischen 35 und 42 kDa (Abbildung 3).

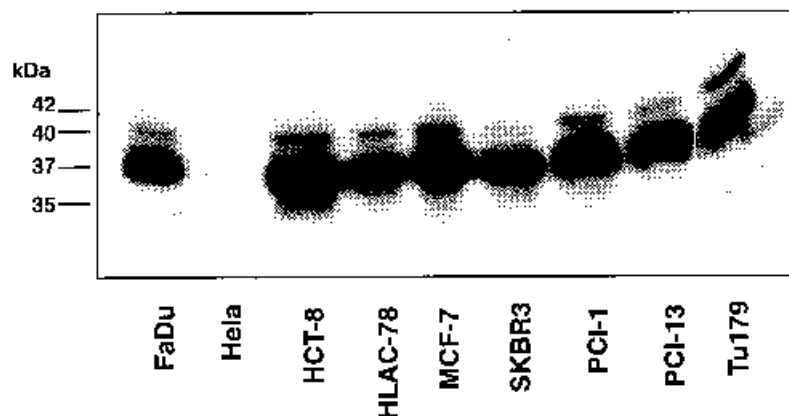


Abbildung 3: Untersuchung von EpCAM in verschiedenen Plattenepithelkarzinomen (Zelllinien) im Westernblot. Lysate aus den verschiedenen Zelllinien wurden in Konzentration und Proteinmenge angeglichen, die Proben durch vertikale Gelelektrophorese aufgetrennt und dann EpCAM mit Hilfe spezifischer Antikörper dargestellt. Wie an den Banden abzulesen, exprimierten alle Karzinome außer HeLa, die EpCAM-negativ ist, das Tumorantigen in Varianten mit unterschiedlichen Molekulargewichten zwischen 35 kDa und 42 kDa. (FaDu, PCI-1, PCI-13, HLAC-78 und Tu179 aus SCCHN; HCT-8 aus Kolonkarzinom; MCF-7 und SKBR3 aus Mammakarzinom; HeLa aus Zervixkarzinom)

3.2 N-Glykosilierung von EpCAM in Zelllinien aus Plattenepithelkarzinomen

Unter der Annahme dass die unterschiedlichen Molekulargewichte in Zusammenhang mit der differentiellen Glykosilierung des Proteins stehen, wurden weitere Experimente zur Untersuchung der N- bzw. O-Glykosilierung durchgeführt. FaDu Zellen wurden unter Anwesenheit des N-Inhibitors Tunicamycin kultiviert und anschließend Zelllysate hergestellt. Mit zunehmender Menge des N-Inhibitors verringerte sich die glykosilierte Form von EpCAM (40 und 42 kDa), es dominierte die unglykosilierte Form (37 kDa). Der O-Glykosilierungs-Inhibitor N-acetyl Galactosaminid hingegen hatte keinen Einfluss auf das Laufverhalten von EpCAM. Dies zeigt, dass EpCAM in Plattenepithelkarzinomen N-glykosiliert ist (Abbildung 4) und dass die Variationen des EpCAM-Proteins mit unterschiedlichen Molekulargewichten differentielle Glykosilierungsformen von EpCAM darstellen.

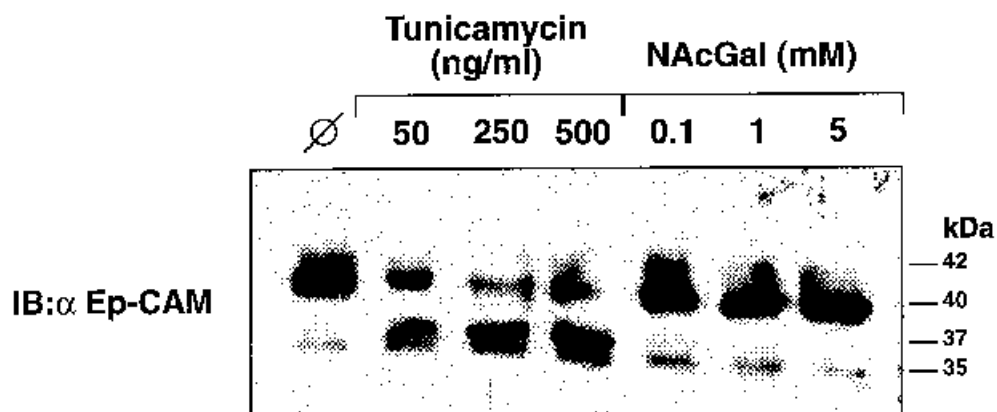


Abbildung 4: Untersuchung von EpCAM auf Karzinomzellen aus N- bzw. O-Glykosilierung. Lysate aus der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie FaDu. FaDu-Zellen wurden mit Tunicamycin bzw. N-Galactosaminid (NaGal) inkubiert, anschließend lysiert und die Lysate in einheitlicher Proteinmenge und -konzentration in vertikaler Gelelektrophorese aufgetrennt, EpCAM mit Hilfe des spezifischen Antikörpers C215 im Westernblot zur Darstellung gebracht. Mit steigender Konzentration des N-Inhibitors dominierte die 37 kDa-Form von EpCAM, während die Inhibition der O-Glykosilierung keinen Einfluss auf das Molekulargewicht von EpCAM hatte.

3.3 Differentielle Glykosilierung von EpCAM in Tumorgewebe und gesundem Epithel

EpCAM wurde in Biopsien von 60 Patienten, die an einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches litten, untersucht. Als Referenzgewebe für gesundes, EpCAM-positives Epithel wurde bei 44 der 60 Patienten mit SCCHN gesundes Schilddrüsengewebe entnommen und auf die Expression und Glykosilierung von EpCAM überprüft. Der Nachweis von EpCAM im Westernblot gelang innerhalb der Tumorproben in 44/60 Fällen (73 %) und innerhalb der Schilddrüsenproben in 30/44 Fällen (68 %). Eine Referenzprobe aus gesunder Schleimhaut des oberen Aerodigestivtrakts bestätigt die negative Expression für EpCAM in gesundem Plattenepithel (Patient 1, „MUC“, in Abbildung 5). An der Probe des Patienten 1 mit Larynxkarzinom („TU“) ist hingegen zu erkennen, dass der Tumor die glykosilierte 42 kDa-Variante von EpCAM exprimiert. In dem autologen Probenpaar aus Schilddrüsen- („TH“) und Tumorgewebe („TU“) des Patienten 2 mit Hypopharynxkarzinom zeigt die Tumorprobe ebenfalls die glykosilierte 42 kDa-Variante von EpCAM, während die Schilddrüsenprobe nur die unglykosilierte 37 kDa-Form mit dem 35 kDa-Abbauprodukt exprimiert (Abbildung 5). In Tumoren ließ sich die Expression aller verschiedener Varianten von EpCAM mit Molekulargewichten zwischen 35 kDa und 42 kDa beobachten, wobei die 40 oder 42 kDa-Formen immer exprimiert wurden. Schilddrüsengewebe hingegen exprimiert in den meisten Fällen die unglykosilierte Form und das Abbauprodukt (Abbildung 5 Patienten 5, 6, 7, 8).

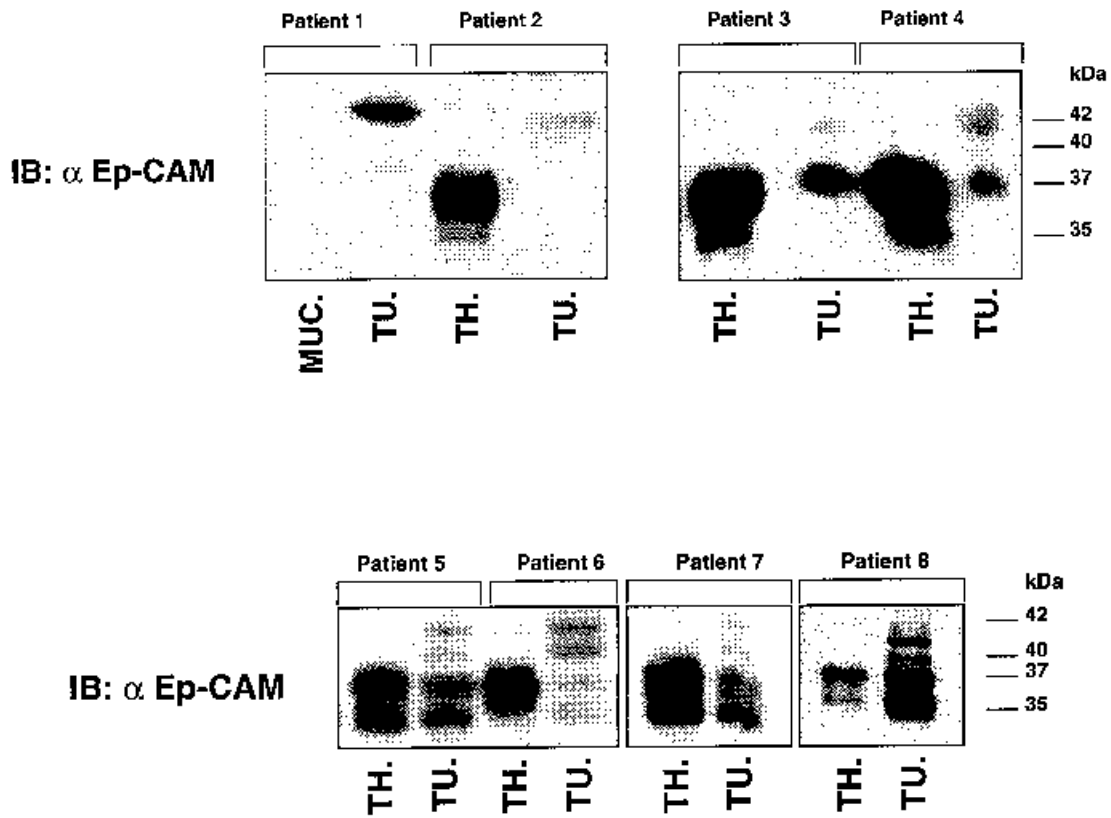


Abbildung 5: Repräsentative Proben aus Schilddrüse und Tumorgewebe und gesundem Plattenepithel. Lysate der Proben wurden in Proteinmenge und -konzentration angeglichen, durch vertikale Gelelektrophorese aufgetrennt, EpCAM mit Hilfe spezifischer Antikörper im Westernblot dargestellt. In der Tumorable 1 aus Larynxkarzinom exprimiert der Tumor nur die glykosilierte 42 kDa-Variante von EpCAM, während die gesunde Schleimhaut kein EpCAM exprimiert. Die hier dargestellten Tumorablen präsentieren unterschiedliche Glykosilierungsvarianten von EpCAM, die gezeigten Schilddrüsenproben dagegen zeigen unglykosilierte Proteinformen. (MUC = gesunde Schleimhaut aus oberem Aerodigestivtrakt; TU = Tumor; TH = Schilddrüsenngewebe).

3.3.1 Glykosylierung von EpCAM in Tumorproben

Aus den 60 Tumorgewebsproben der Patienten mit SCCHN gelang in 44 Fällen die Darstellung von EpCAM im Westernblot. Die Analyse des Glykosylierungsmusters von EpCAM in diesen 44 Karzinomproben zeigte ein heterogenes Bild mit Tumoren, die alle Varianten von EpCAM exprimierten, und anderen, die Kombinationen der verschiedenen Glykosylierungsformen exprimierten (Abbildung 6). Alle dargestellten Proben weisen eine oder mehrere Glykosylierungsformen mit Molekulargewichten von 35-, 37-, 40- bzw. 42 kDa auf, wobei die glykosylierte 40 und 42 kDa-Form dominierte. So sind in der 2. und 4. Probe alle der genannten Varianten vertreten, während die 3. Probe das 35 kDa-Abbauprodukt und die 40 kDa-Form zeigt und die 5. Probe die Varianten mit 37-, 40 und 42 kDa präsentiert.

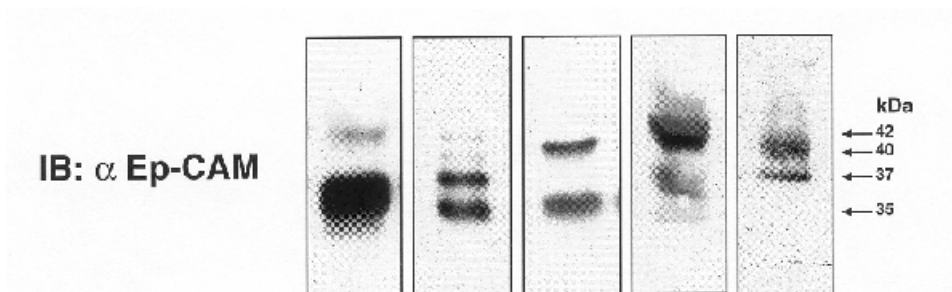


Abbildung 6: EpCAM wurde in Tumorproben aus SCCHN mit Hilfe spezifischer Antikörper markiert und im Immunblot dargestellt. Gezeigt sind unterschiedliche Varianten der Glykosylierungsmuster und verschiedene Formen unterschiedlich stark ausgeprägter Glykosylierung.

Anhand der Intensität der im Westernblot dargestellten Banden wurde der Glykosylierungsgrad der Proben optisch evaluiert und eine Einteilung in geringgradige (mäßige), mittel- und hochgradige (/ausgeprägte, „starke“) Glykosylierung vorgenommen. Alle in der Abbildung 6 dargestellten Proben beinhalten unter anderem stark glykosylierte Varianten von EpCAM. Die in der 2. Probe bei 40- und 42 kDa markierten Proteinformen sind Beispiele für eine geringgradige Glykosylierung, in der 3. Probe stellt sich die ausgeprägte Glykosylierungsform bei 40 kDa neben dem ebenfalls stark markierten 35 kDa-Abbauprodukt des EpCAM-Proteins dar.

In allen EpCAM positiven Tumorproben (44/44; 100 %) war EpCAM glykosiliert. In der Hälfte der auswertbaren Fälle lag die hochgradige Glykosilierungsform vor (22/44; 50 %) und in ca. je einem Viertel der Fälle die mittelgradige (12/44; 27 %) und geringgradige (10/44; 23 %) Form (Abbildung 7).

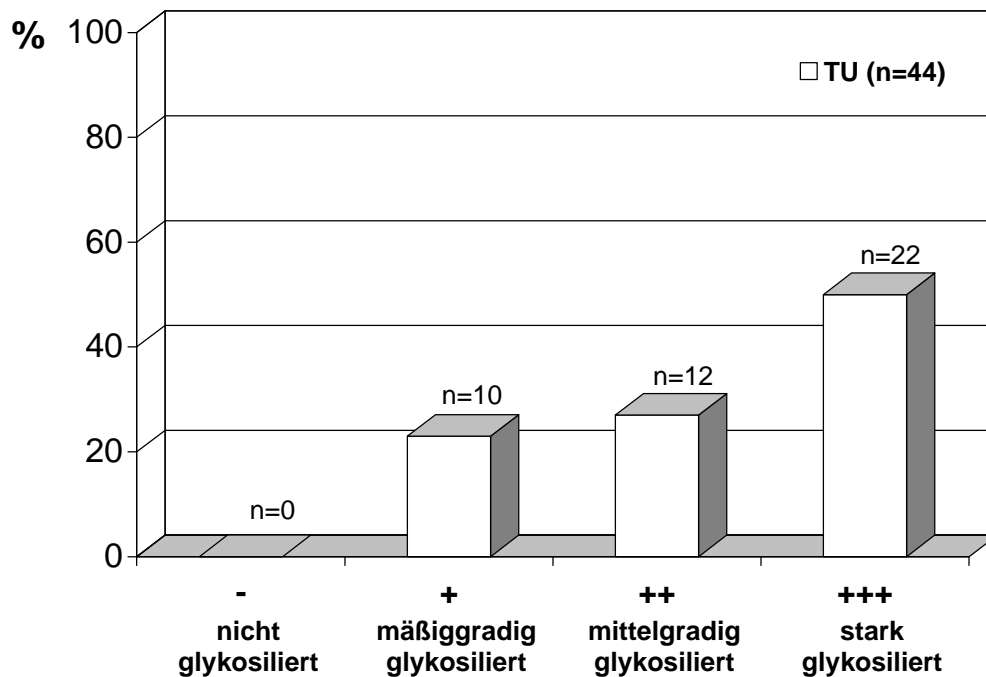


Abbildung 7: Verteilung der EpCAM Glykosilierung innerhalb von 44 Tumorproben aus SCCHN. In der Hälfte der Proben lag die ausgeprägte Glykosilierungsform von EpCAM vor, es dominierten die 40 bzw. 42 kDa-Form von EpCAM. In annähernd einem Viertel der Fälle ließ sich die mittelgradig und schwach glykosilierte Form nachweisen.

EpCAM ließ sich also in den Tumorproben in einem heterogenen Expressionsmuster nachweisen und zeigte dabei überwiegend hyperglykosilierte Formen des Membranproteins. Die Verteilung der Glykosilierungsgrade war unabhängig von Primärtumorlokalisierung, Tumor- und Lymphknotenstatus (siehe Abbildung 21 und 22).

3.3.2 Glykosilierung von EpCAM in Schilddrüsengewebe

30 der 44 entnommenen Schilddrüsenproben ließen im Westernblot eine Expression von EpCAM nachweisen. Die Untersuchung auf Glykosilierung zeigte, dass EpCAM in 20 von 30 der auswertbaren Schilddrüsenproben (67 %) nicht glykosiliert war und in acht Fällen (27 %) eine mäßiggradige Glykosilierung bestand. Nur zwei Schilddrüsenproben (7 %) zeigten eine mittelgradige Glykosilierung von EpCAM, die ausgeprägte Glykosilierungsform lag in keinem Fall vor. Abbildung 8 zeigt die Verteilung der Glykosilierungsgrade innerhalb der Schilddrüsenproben.

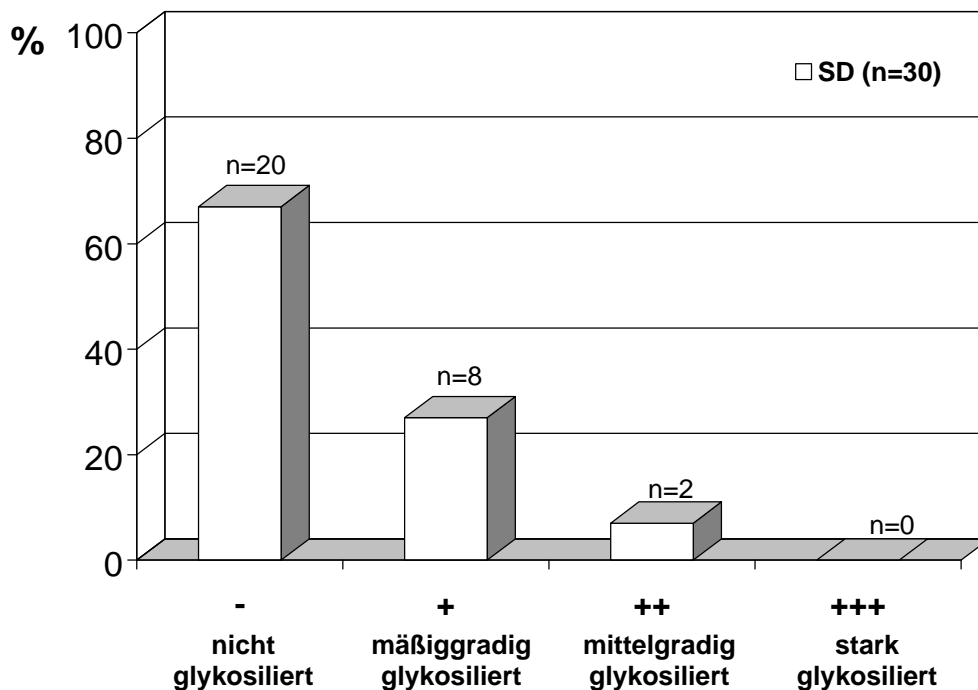


Abbildung 8: Verteilung der EpCAM-Glykosilierung innerhalb von 30 Schilddrüsenproben aus SCCHN. In 2/3 der Proben war EpCAM unglykosiliert (-), in etwa 1/4 der Fälle lag die geringgradige Glykosilierungsform von EpCAM vor (+) und in nur 2/30 Proben die Variante mit mittelgradiger Glykosilierung (+). In keiner Schilddrüsenprobe war die stark glykosilierte Form von EpCAM (+++) anzutreffen.

Vergleicht man die EpCAM-Glykosylierung in den Karzinomproben und in den Schilddrüsenproben und fasst hierzu die nicht- und geringgradig glykosylierten Proben zusammen und stellt sie den mittel- und hochgradigen Glykosylierungsgraden gegenüber, so zeigen die Schilddrüsenproben ein inverses Muster verglichen mit den Tumorproben: Während EpCAM in der überwiegenden Mehrheit der Schilddrüsenproben nicht oder geringgradig glykosyliert war (28/30; 93 %), zeigten die Tumorproben vor allem die hoch- oder mittelgradig ausgeprägte Variante der Glykosylierung (34/44; 77 %) und nur in knapp ¼ der Fälle geringgradig glykosyliertes EpCAM. Innerhalb der Tumorproben war unglykosyliertes EpCAM in keinem Fall anzutreffen und in den Schilddrüsenproben niemals die ausgeprägte Glykosylierungsform vorhanden (Abbildung 9).

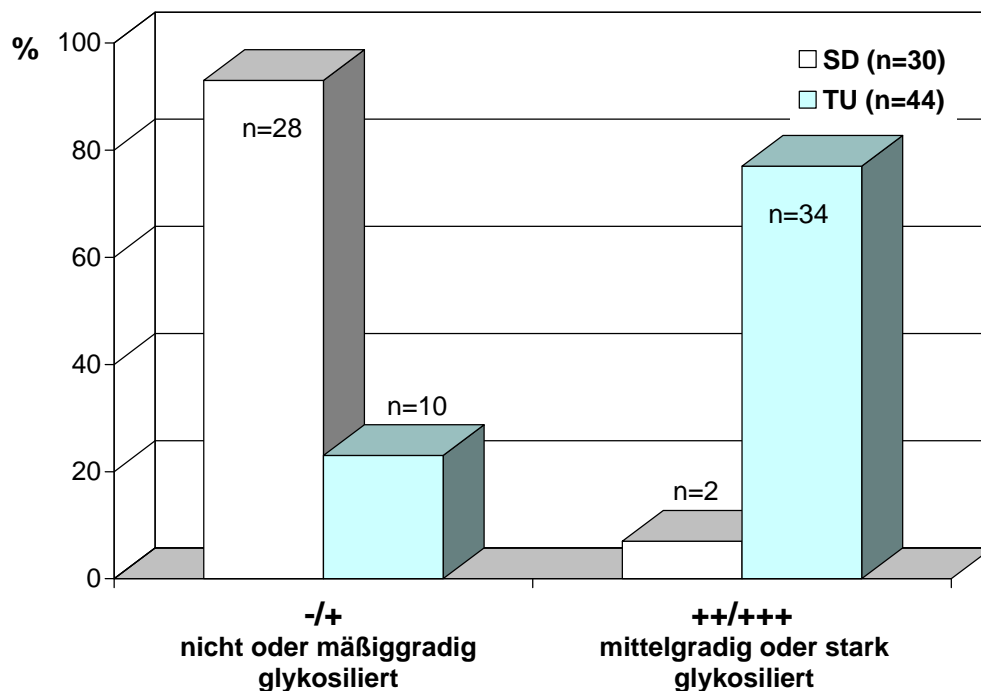


Abbildung 9: Verteilung geringgradiger (-/+) und höhergradiger (++/+++) Glykosylierungsvarianten in Schilddrüsen- und Tumorproben. Schilddrüsenepithel zeigte vor allem die nicht- oder nur mäßiggradig glykosylierte Variante und in keinem Fall hochgradig glykosyliertes EpCAM. Die Tumorproben boten ein umgekehrtes Muster mit vorwiegend stark und auch mittelgradig glykosyliertem EpCAM, in keiner Tumorprobe war EpCAM unglykosyliert.

3.3.3 Glykosilierung von EpCAM in SCCHN und autologem Schilddrüsengewebe

Bei 27 der 44 Patienten mit SCCHN, bei denen autologen Probenpaare aus Karzinom- und Schilddrüsengewebe gewonnen wurden, gelang der Nachweis von EpCAM im Westernblot sowohl in den Tumor- als auch in Schilddrüsenproben. Bei 14 der 44 untersuchten autologen Probenpaare war EpCAM entweder in der Tumor- oder in der Schilddrüsenprobe oder in beiden Proben nicht darstellbar und somit die Glykosilierung nicht beurteilbar.

Die Verteilung der Glykosilierung zeigte analog zur Gesamtheit der untersuchten Patienten dasselbe differente Muster innerhalb der Tumorproben einerseits und der Schilddrüsenproben andererseits: In den Schilddrüsenproben war EpCAM überwiegend nicht glykosiliert (16/27; 59 %) oder schwach glykosiliert (9/27; 33 %). Nur in 2/27 (7 %) Fällen lag eine mittelgradige Glykosilierung vor. Die starke Glykosilierungsform war unter den Schilddrüsenproben in keinem Fall nachzuweisen, während EpCAM im Tumorgewebe durchgehend glykosiliert war. In der überwiegenden Zahl der Tumorproben bestand eine starke Glykosilierung (15/27; 56 %) oder eine mittelgradig Glykosilierung (5/27; 19 %) und nur 7/27 Fälle (26 %) waren schwach glykosiliert. Abbildung 10 zeigt eine Gegenüberstellung von Tumor- und Schilddrüsenproben aus den 27 autologen Probenpaaren mit inversem Muster innerhalb der unterschiedlichen Glykosilierungsgrade.

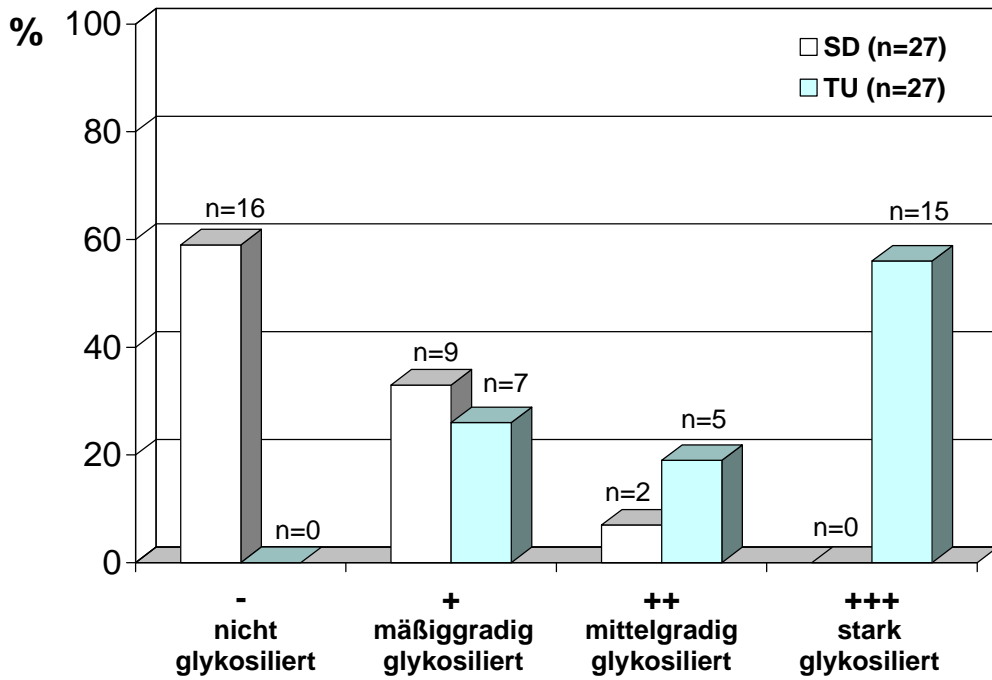


Abbildung 10: EpCAM-Glykosilierung in Gegenüberstellung von Tumorproben vs. Schilddrüsenproben aus 27 autologen Probenpaaren aus Patienten mit SCCHN. Es zeigt sich ein inverses Glykosilierungsmuster mit vorwiegend fehlender und geringgradiger Glykosilierung im Schilddrüsenengewebe und Überwiegen der höheren Glykosilierungsgrade im Tumorgewebe.

Untersucht man die 27 auswertbaren autologen Probenpaare einzeln und vergleicht jeweils die Glykosilierung zwischen Tumor- und Schilddrüsenprobe aus den einzelnen Patienten, so war die Glykosilierung von EpCAM in der Tumorprobe in 22/27 Fällen (81,5 %) stärker als im Schilddrüsenengewebe, in 4/27 Fällen (14,8 %) waren Schilddrüsen- und Tumorgewebe gleichermaßen glykosiliert. Nur ein Fall (1/27; 3,7 %) zeigte ein umgekehrtes Glykosilierungsmuster, in dem das aus Schilddrüse stammende EpCAM stärker glykosiliert war als in der autologen Tumorprobe. Allerdings kann ohne gleichzeitige histologische Untersuchung eine Probenverwechslung innerhalb dieses autologen Probenpaares nicht ausgeschlossen werden. Abbildung 11 zeigt die Glykosilierung innerhalb der autologen Probenpaare im Vergleich.

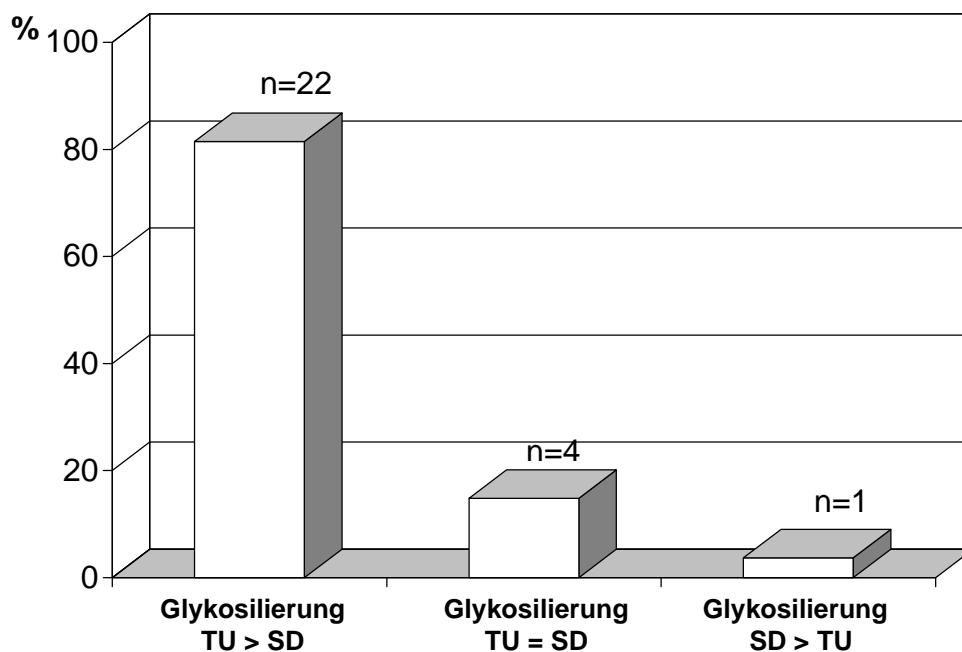
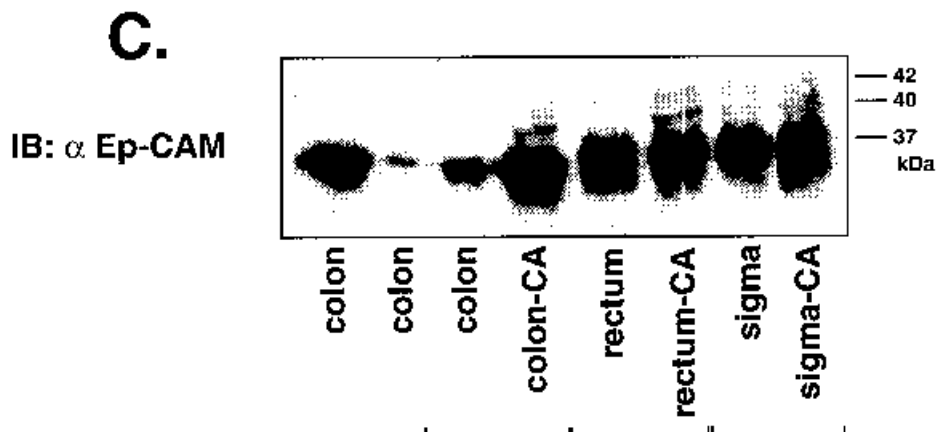


Abbildung 11: EpCAM-Glykosilierung - Vergleich Tumorproben vs. Schilddrüsenproben innerhalb der einzelnen autologen Paare TU/SD aus SCCHN (n = 27). In über 80 % der autologen Paare zeigt das Tumorgewebe eine höhere Glykosilierungsform als die Schilddrüsenprobe.

3.4 Glykosilierung von EpCAM in gesunder Kolonschleimhaut und in Kolonkarzinomen

Zusätzlich wurden Gewebeproben aus gesunder Kolonschleimhaut und aus Kolonkarzinomen auf die Expression und Glykosilierung von EpCAM untersucht. In allen Proben ließ sich eine starke Expression von EpCAM sowohl im Tumorgewebe als auch in der gesunden Mukosa nachweisen (Abbildung 12). In der gesunden Kolonschleimhaut war EpCAM in allen Proben mit Ausnahme von Probe Nr. 7 nicht glykosiliert. Im Vergleich autologer Paare aus Tumorgewebe und autologer gesunder Schleimhaut aus benachbarter Mukosa zeigte sich EpCAM aus Kolonkarzinom in zwei der drei untersuchten Proben (Nr. 4 und 6) glykosiliert. Abbildung 12 zeigt das dritte Probenpaar mit schwacher Glykosilierung von EpCAM in beiden Proben. Daneben war eine starke Glykosilierungsform von EpCAM in einem untersuchten Magenkarzinom zu beobachten, während die gesunde Magenschleimhaut die unglykosilierte Form von EpCAM exprimierte (nicht gezeigt).

Abbildung 12: Gewebeproben aus gesunder Kolonschleimhaut (Proben 1 und 2) und



autologe Probenpaare aus Kolonkarzinom und benachbarter gesunder Kolonschleimhaut (Proben 3-8). Nach Lysierung wurden Proteinmengen und -konzentrationen angeglichen und EpCAM mit Hilfe spezifischer Antikörper im Westernblot dargestellt. Die gezeigten Proben aus gesunder Mukosa exprimieren unglykosilierte Formen von EpCAM (Proben Nr. 1, 2, 3 und 5), in den Gewebeproben aus Karzinomen dagegen ist EpCAM hyperglykosiliert (Proben Nr. 6 und 8).

3.5 Alters- und Geschlechterverteilung der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen

Die 60 Proben aus SCCHN wurden an 2 Frauen und 58 Männern entnommen (Abbildung 13). Das Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug im Durchschnitt 57,7 Jahre (Median 56; Min 41; Max 86). Abbildung 14 zeigt eine Übersicht der Altersverteilung.

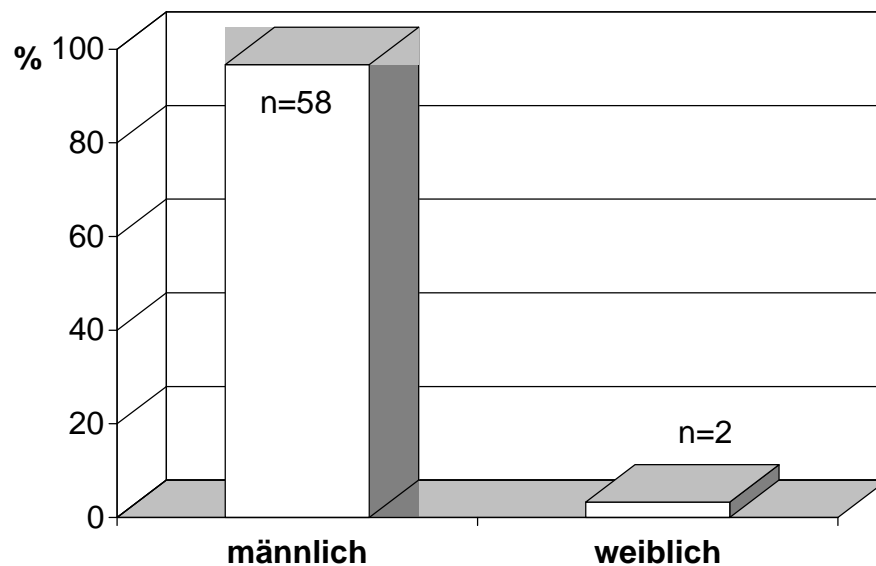


Abbildung 13: Geschlechterverteilung der 60 Patienten mit SCCHN. Der überwiegende Anteil der Patienten waren Männer (97 %), nur zwei Untersuchte (3 %) waren Patientinnen.

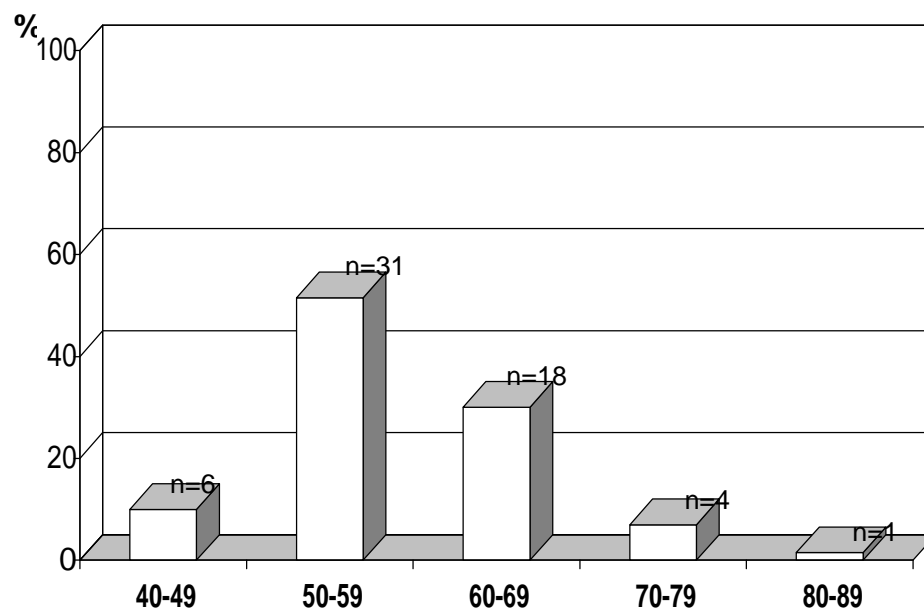


Abbildung 14: Altersverteilung der 60 Patienten mit SCCHN. Über die Hälfte der Patienten erkrankte im sechsten Dezennium (52 %), dreißig Prozent im siebten Lebensjahrzehnt.

3.6 Verteilung der Tumorstadien

Bei den 60 SCCHN-Patienten war im Zeitraum November 2000 bis April 2002 die Diagnose eines primären Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich gestellt worden, wobei es sich in einem Fall um eine Rezidivkrankung handelte. Bei 24 Patienten (40 %) war das Karzinom im Larynx, bei 18 Patienten (30 %) im Hypopharynx, bei wiederum 14 (23 %) im Oropharynx, bei 2 Patienten (3 %) im Bereich der Mundhöhle, bei zwei weiteren Patienten (3 %), deren Tumorerkrankung sich durch Halslymphknotenmetastasierung gezeigt hatte, war der Primärtumor nicht feststellbar (Carcinoma of unknown primary, CUP) (Abbildung 15).

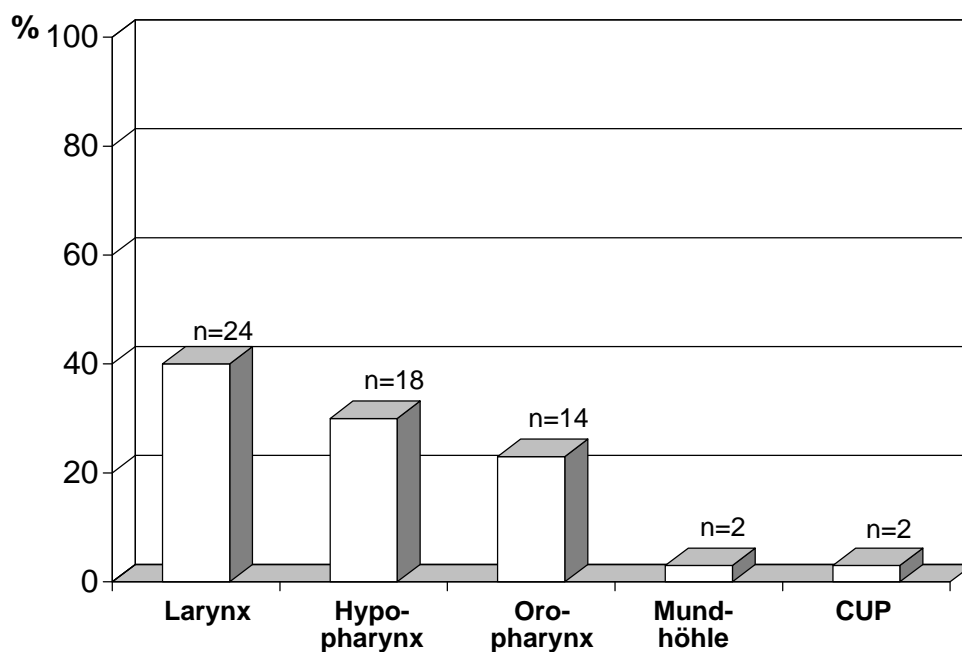


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung der Tumorlokalisation der 60 Patienten mit SCCHN. Die häufigste Primärtumorlokalisation war mit 40 % der Larynx, gefolgt von Hypopharynx (30 %) und Oropharynx (23 %).

Die Verteilung der Tumorstadien nach der TNM-Klassifizierung zeigte in 4 Fällen (7 %) ein T1-Stadium, in 13 Fällen (22 %) ein T2-Stadium, bei 16 weiteren Fällen (27 %) lag ein T3-Stadium vor und bei den übrigen 25 Patienten (42 %) bereits das Stadium T4 (Abbildung 16). Regionale Lymphknotenmetastasen waren bereits bei 40 Patienten (67 %) vorhanden (Abbildung 17). Tabelle 4 zeigt die Verteilung der T- und N-Stadien in gegenseitiger Abhängigkeit. Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung waren bei drei Patienten (5 %) nachgewiesen (Abbildung 18). In allen drei Fällen handelte es sich um Lungenmetastasen.

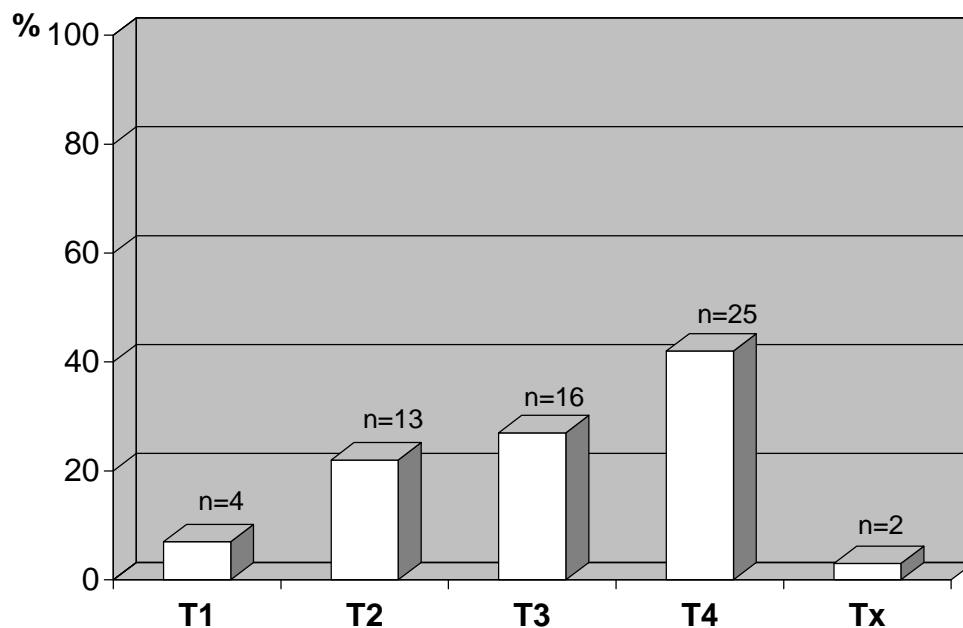


Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung der T-Kategorie der 60 Patienten mit SCCHN. Bei 72 % der Patienten lag bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium (T3, T4 oder Tx) vor.

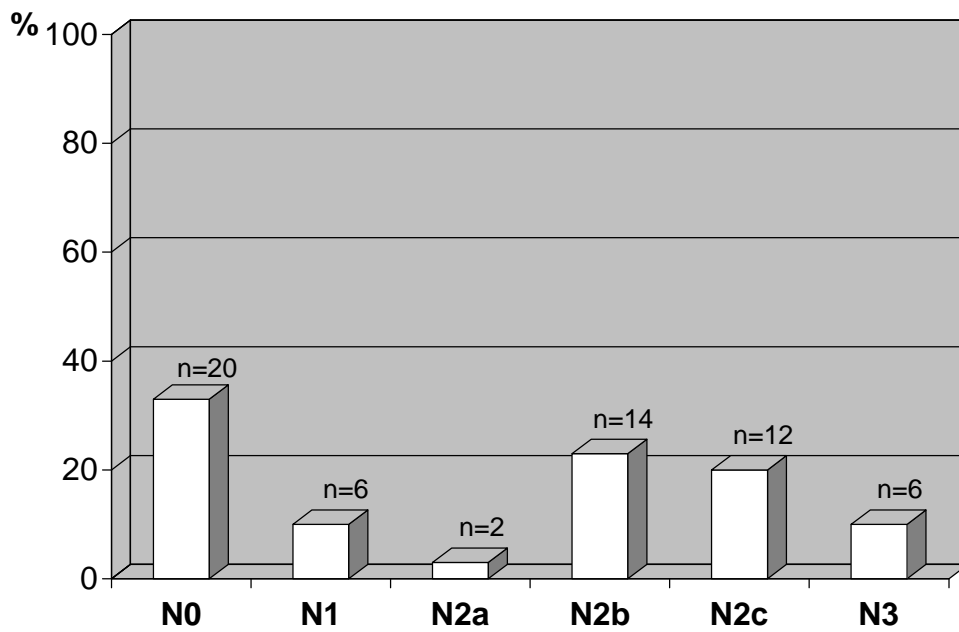


Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung der N-Kategorie der 60 Patienten mit SCCHN. In zwei Drittel der Fälle hatte bereits Halslymphknotenmetastasierung stattgefunden.

	N 0	N 1	N2a	N2b	N2c	N 3	gesamt n	%
T 1	2	0	1	0	0	1	4	7
T 2	5	3	1	3	1	0	13	22
T 3	5	1	0	6	3	1	16	27
T 4	8	2	0	5	8	2	25	42
Tx	0	0	0	0	0	2	2	3
gesamt n	20	6	2	14	12	6	n=60	
%	33	10	3	23	20	10		100 %

Tabelle 4: 60 Patienten mit SCCHN: Übersicht über die Verteilung der T- und N-Stadien in gegenseitiger Abhängigkeit. Große Primärtumoren (T3-4) waren meist mit fortgeschrittener Lymphknotenmetastasierung (N2b – N3) assoziiert.

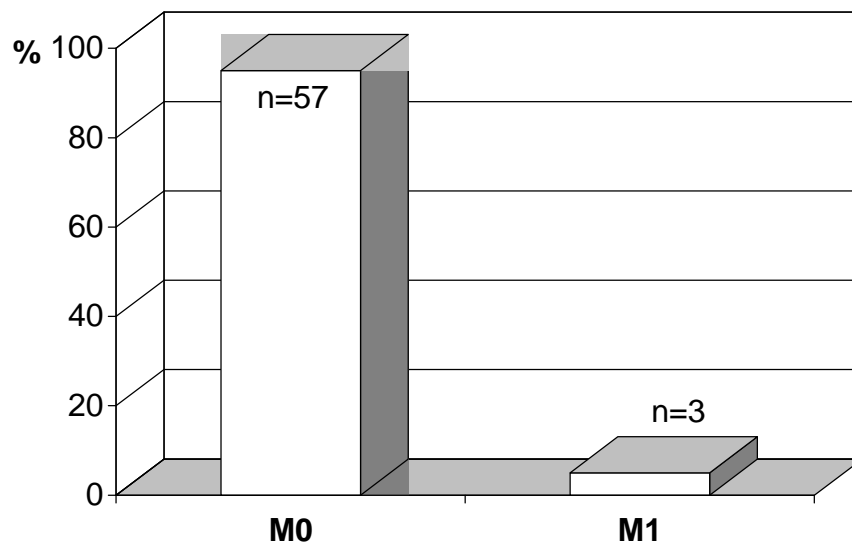


Abbildung 18: Häufigkeitsverteilung der M-Kategorie der 60 Patienten mit SCCHN. Bei drei Patienten bestand Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose.

Nach der UICC Klassifikation lag bei den meisten der untersuchten Patienten (n = 53/60; 88 %) bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit ausgedehntem Primärtumor und/oder Lymphknotenmetastasierung vor (UICC III-IV) vor (Abbildung 19). Fortgeschrittenen Tumorstadien, gemessen am Lymphknotenstatus, zeigten sich vor allem für die Hypopharynxkarzinome (89 %) und die Oropharynxkarzinome (71 %). Bei den Patienten mit Larynxkarzinom hingegen lag in über der Hälfte der Fälle (54 %) noch keine Halslymphknotenmetastasierung vor.

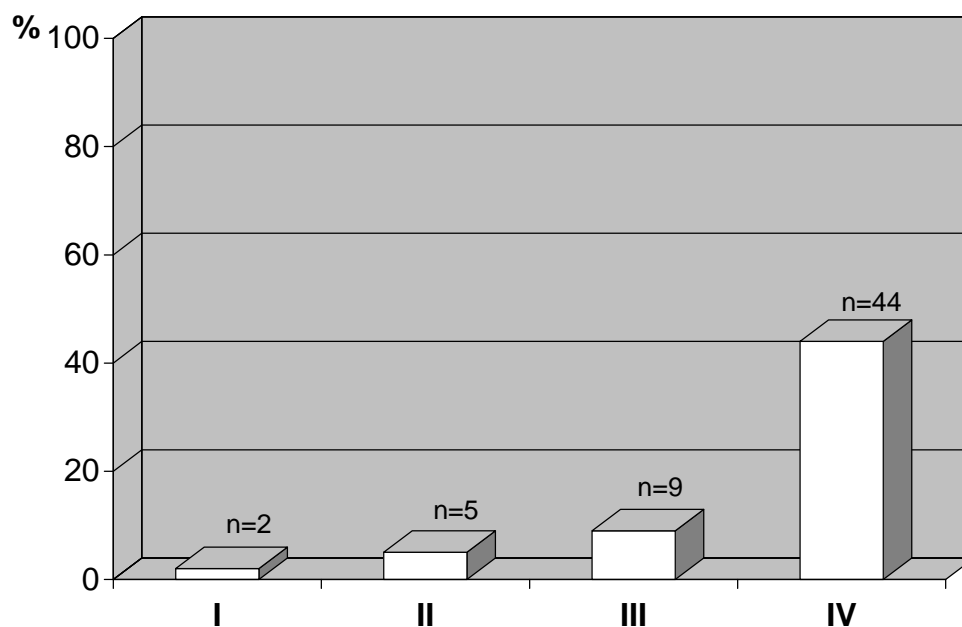


Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung der UICC-Stadien der 60 Patienten mit SCCHN: In 88 % der Fälle bestand ein fortgeschrittenes Tumorstadium (UICC III-IV).

Die histopathologische Untersuchung ergab in allen Fällen ein Plattenepithelkarzinom. Hinsichtlich des histologischen Differenzierungsgrades waren 42 der 60 Karzinome (70 %) nur geringgradig differenziert (G3), 4 (7 %) gering bis mittelgradig differenziert (G2-3), 12 (20 %) waren mittelgradig differenziert (G2), 3 (5 %) wurden als gut bis mittelgradig differenziert (G1-2) eingestuft und nur 2 Karzinome (3 %) waren gut differenziert (G1). Keines der Karzinome war undifferenziert (G4) (Abbildung 20). Der hoch repräsentierte niedrige Differenzierungsgrad G3 zeigte sich unter allen Primärtumorlokalisationen homogen verteilt.

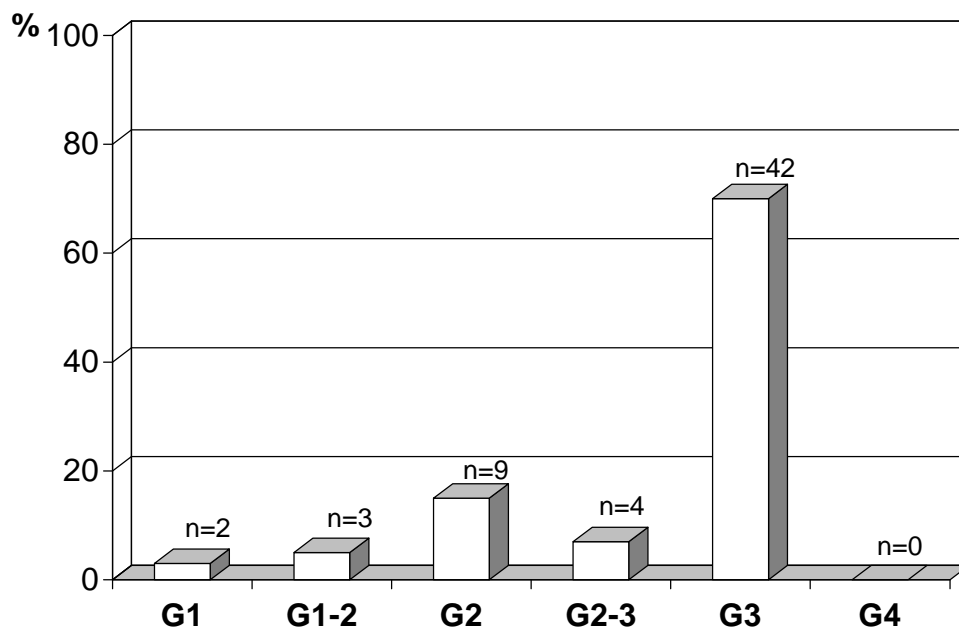


Abbildung 20: Verteilung des histologischen Differenzierungsgrad der 60 Patienten mit SCCHN. Mit 70 % wies der überwiegende Anteil der untersuchten Plattenepithelkarzinome eine geringgradige Differenzierung (G3) auf.

3.7 Verteilung der Glykosilierungsgrade in den verschiedenen Tumorstadien und –lokalisationen in Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen

Die Glykosilierung von EpCAM wurde in unterschiedlichen Tumorstadien verglichen. Es gab keine Korrelation zwischen Tumorstadium oder -lokalisation und der Glykosilierung von EpCAM. Abbildung 21 zeigt, dass die ausgeprägte Glykosilierung von EpCAM in jeweils 50 % in Tumorproben sowohl bei fehlender als auch bei vorhandener Halslymphknotenmetastasierung anzutreffen war.

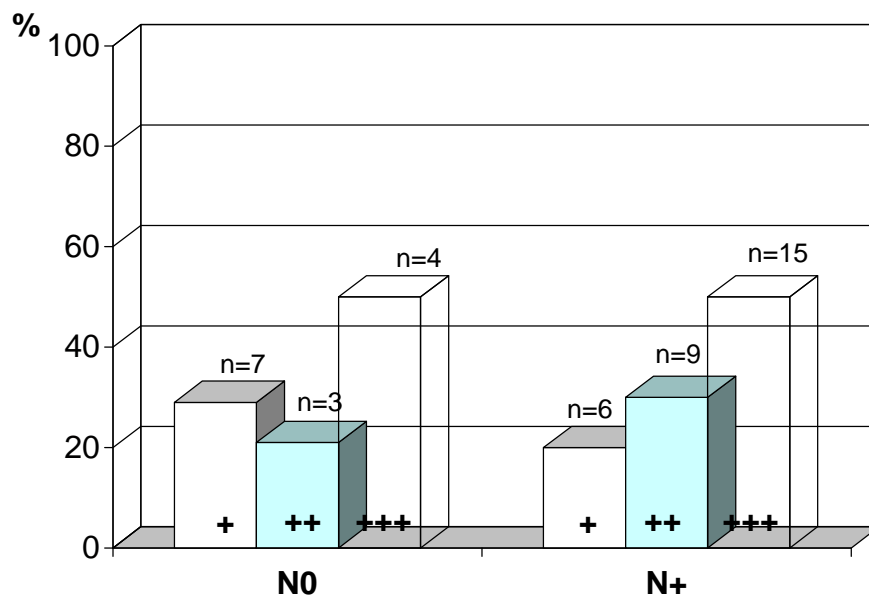


Abbildung 21: Verteilung der Glykosilierungsgrade: Fehlende Lymphknotenmetastasierung (N0) vs. vorhandene Lymphknotenmetastasierung (N+). Es besteht eine gleichmäßige Verteilung der verschiedenen Glykosilierungsstufen innerhalb der verschiedenen Lymphknotenstadien.

Für die T-Stadien zeigte sich eine annähernd gleichmäßige Verteilung der ausgeprägten Glykosilierungsform von EpCAM zwischen den frühen und fortgeschrittenen Tumorstadien (Abbildung 22).

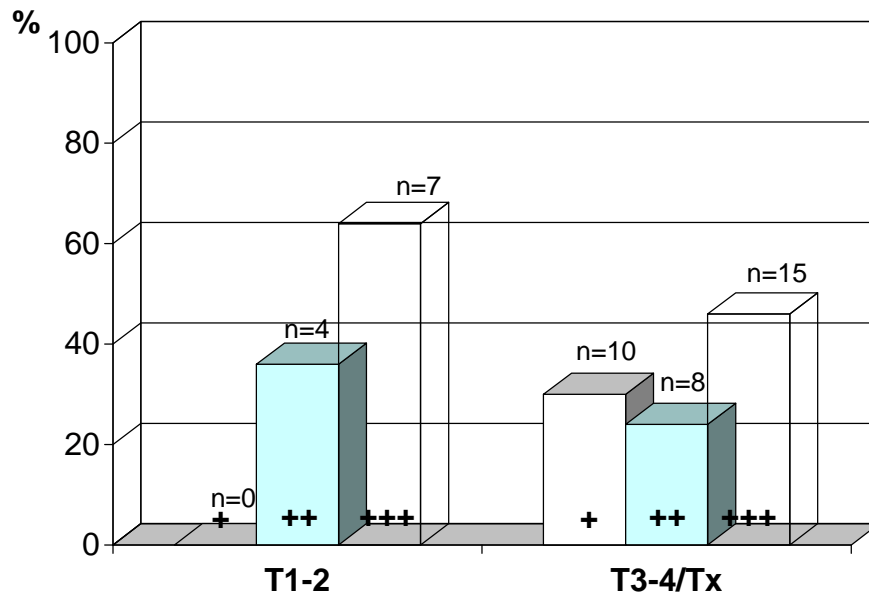


Abbildung 22: Verteilung der Glykosilierungsstärke: Frühe Tumorstadien (T1-2) vs. fortgeschrittene Tumorstadien (T3-4/Tx). Es besteht eine insgesamt ausgeglichene Verteilung der unterschiedlichen Glykosilierungsstärken in Früh- und Spätstadien.

In der Stadieneinteilung nach UICC ließ sich innerhalb der Tumorproben in 4 der 7 Frühstadien I-II EpCAM nachweisen (57 %), in den Spätstadien III-IV in 40 von 53 Fällen (76 %). In drei der vier Frühstadien war EpCAM stark glykosiliert (3/4; 75 %) und im vierten Fall mittelgradig glykosiliert, in den Spätstadien zeigte sich EpCAM in etwa der Hälfte der Tumorproben hochgradig und in 13 % mittelgradig glykosiliert. Es bestand also keine Bevorzugung der ausgeprägten Glykosilierungsformen für Tumorfrüh- oder Spätstadien.

Zusammenfassend war EpCAM im Großteil der untersuchten Epithelien nachweisbar. In den untersuchten Karzinomen waren dabei die hyperglykosilierten Varianten deutlich überrepräsentiert und heterogen verteilt, in den gesunden Plattenepithelien hingegen nicht nachweisbar. Eine Korrelation zwischen Tumorstadien und Glykosilierungsformen bestand nicht.

4 Diskussion

Beinahe 40 % der Menschen erkranken im Laufe ihres Lebens an einem Karzinom, etwa 24 % versterben an dieser Erkrankung (Lang et al. 2002). Krebserkrankungen generell und insbesondere die Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region zeigen zunehmende Inzidenzraten, trotz aller Weiterentwicklungen und Anstrengungen in Therapie und Diagnostik konnte die ungünstige Prognose in den vergangenen Jahrzehnten insgesamt nicht verbessert werden. Ein Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass bei zwei Drittel der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit Halslymphknotenmetastasierung vorliegt (Remmert et al. 2001). Für diese Patienten lässt sich unter Standardtherapie einschließlich chirurgischer Maßnahmen, Radiatio und Chemotherapie eine Zwei-Jahres-Überlebensrate von nur 30 % erreichen (Cook et al. 1993). Auch wenn nach histologischen Kriterien eine vollständige Tumorentfernung erfolgt ist, kommt es bei etwa einem Drittel dieser Patienten schon bald zu Lokalrezidiven. Ursachen für diese ungünstigen Zahlen wurden unter anderem in dem Phänomen der Feldkanzerisierung gesucht (Cooper et al. 1989), große Bedeutung wird inzwischen dem Status der „minimal residual disease“ (mrd) beigemessen. Dieser subklinische Zustand bezeichnet den unerkannten Verbleib einzelner residualer Tumorzellen im Karzinompatienten nach erfolgter Therapie (van Dongen et al. 1996; Balzar et al. 1999; Wollenberg et al. 1994) und ist insofern von großer Bedeutung, als dass disseminierte Tumorzellen als Grundlage für die Ausbildung für Metastasen angesehen werden. (Wollenberg et al. 1999). Angesichts der unbefriedigenden epidemiologischen Daten stellt sich die Frage nach neuen Konzepten zur Erkennung und Behandlung von Kopf-Hals-Karzinomen, die eine bessere Wirksamkeit und weniger Nebenwirkungen zeigen.

4.1 EpCAM als tumorassoziertes Antigen

Auf der Suche nach Instrumenten zur Detektion von Tumorzellen kam es in den Achtziger Jahren zur Entwicklung von Monoklonalen Antikörpern (mAbs) gegen tumorassozierte Antigene (TAA), die neue Wege in der Diagnostik und Therapie von Krebserkrankungen aufzuzeigen schienen (Koprowski et al. 1979; Oosterwijk et al. 1986). Allerdings sind die Möglichkeiten von mAbs häufig aufgrund von unzureichender Spezifität eingeschränkt, eine wesentliche Limitierung besteht außerdem durch die Tatsache, dass Tumorzellen häufig ihr Antigenprofil durch Mutation verändern. Manche TAA lassen sich jedoch mit ausreichender Regelmäßigkeit in bestimmten Tumorentitäten nachweisen, so dass sie als Tumormarker einen festen Platz in der Diagnostik im Rahmen der Tumornachsorge erlangt haben. So gilt beispielsweise das Karzinoembryonale Antigen als tumorassoziert beim Kolonkarzinom, Alpha-Fetoprotein (AFP) hingegen wird als Marker beim Primären Leberzellkarzinom und bei Keimzelltumoren verwendet (Lamerz 1998). Für SCCHN konnten bisher keine tumorassozierte Substanz identifiziert werden, die ausreichende Spezifität und Sensitivität besitzen würde, um einen routinemäßigen klinischen Einsatz in Diagnostik oder Therapie zu rechtfertigen.

Zu Beginn der 90er Jahre konnte jedoch in verschiedenen Forschungsgruppen nachgewiesen werden, dass das Epitheliale Adhäsionsmolekül EpCAM nicht nur in einer Vielzahl gesunder humaner Epithelien anzutreffen ist, sondern gerade in den meisten Karzinomen und insbesondere in Kopf-Hals-Karzinomen überexprimiert wird (Szala et al. 1990; de Boer et al. 1999; Quak et al. 1990). Diese Überexpression hat zur Bezeichnung von EpCAM als „Pankarzinom-Antigen“ geführt. Unter den regulären epithelialen Geweben ist EpCAM vor allem in Adenoepithelien anzutreffen, während die gesunden mukösen Plattenepithelien der Kopf-Hals-Region EpCAM-negativ sind. In den daraus hervorgehenden SCCHN kommt es hingegen zu einer de novo Expression von EpCAM (Momburg et al. 1987; Quak et al. 1990), wobei die Zahl der EpCAM-positiven Zellen und die Expression von EpCAM mit dem

Grad der Dysplasie zunehmen. In atypischen Zellen korreliert die zunehmende Expression von EpCAM mit Entdifferenzierung und verstärkter Proliferation (Litvinov et al. 1996; Piyathilake et al. 2000). Darüber hinaus gibt es Untersuchungen an SCCHN aus der Mundschleimhaut, die von einer fehlenden Expression von EpCAM in gut differenzierten Karzinomen berichten, gleichzeitig wird EpCAM in einigen undifferenzierten Karzinomen exprimiert (High et al. 1996). In anderen Fällen von undifferenzierten SCCHN, in denen die Expression für EpCAM negativ war, könnte die fehlende Expression des Membranproteins mit einem ausgeprägten Differenzierungsverlust in den Karzinomzellen in Zusammenhang stehen. Allerdings scheint die Neoexpression von EpCAM in SCCHN ein bedeutsames Unterscheidungsmerkmal gegenüber den gesunden Plattenepithelien der Schleimhäute im Kopf-Hals-Bereich darzustellen. So konnte unter anderem für SCCHN aus Mundhöhle, des Larynx und dem Ösophagus die Expression von EpCAM nachgewiesen werden (Balzar et al. 1999). Diese Daten belegen, dass das Membranprotein EpCAM eng mit transformierten Epithelien assoziiert ist und insbesondere für die Karzinome der Kopf-Hals Region eine vorrangige Rolle als tumorassoziiertes Antigen einnimmt.

4.2 EpCAM und Karzinogenese

Für gesunde, EpCAM-positive Epithelien wurde gezeigt, dass EpCAM Kalzium-unabhängig homophile Adhäsionsprozesse vermittelt (Litvinov et al. 1994). Weiterhin lassen Strukturanalysen außerdem eine Rolle von EpCAM in der Signaltransduktion, ähnlich den Wachstumsfaktor-Rezeptoren vermuten (Simon et al. 1990), wie sie in gleicher Weise für andere Transmembranproteine (darunter die Integrine und weitere CAM) beschrieben wird, die ebenfalls EGF-ähnliche Wiederholungen aufweisen (Davis 1990). An den zwei EGF-ähnlichen Wiederholungen in der zysteinreichen Domäne ist bemerkenswert, dass sie analog zu EpCAM in den beiden Transmembranproteinen EGF-R und Her2/neu anzutreffen sind. Die beiden

Proteine werden ebenso wie EpCAM als tumorassoziierte Antigene und darüber hinaus als Onkogene beschrieben. Die zysteinreiche Region gilt als typisch für Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTK), hat ihre Bedeutung für die strukturelle Ausbildung der extrazellulären Domäne und ist dort außerdem an der Rezeptor-Dimerisierung beteiligt (Burke and Stern 1998). Diese Ligand-vermittelte Dimerisierung führt zur Rezeptor-Aktivierung und ist unter normalen Umständen stringent reguliert. In diesem Zusammenhang erscheint bemerkenswert, dass für Met-R, EGF-R und den Her2/neu Rezeptor eine onkogene Aktivierung aufgrund von Mutationen beschrieben ist, die zur konstitutiven Dimerisierung und damit zu einer permanenten Aktivierung der zytoplasmatischen, katalytischen Domäne führt (Rodrigues and Park 1994; Robertson et al. 2000). In vitro-Untersuchungen konnten außerdem zeigen, dass EpCAM in gesunder Kolonschleimhaut vorwiegend als Tetramer vorliegt, in Karzinomzellen dagegen als Dimer (Trebak et al. 2001).

Es ist also gut vorstellbar, dass EpCAM in Analogie zu den genannten Transmembranproteinen strukturelle Modifikationen in transformierten Epithelien erfährt, die funktionell einer onkogenen Aktivierung des Glykoproteins entsprechen und so zur Karzinogenese beitragen.

Bezüglich der Funktion von EpCAM in Karzinomen konnten in jüngster Zeit Zusammenhänge auf molekularbiologischer Ebene entschlüsselt werden, die eine wesentliche Rolle von EpCAM in der Entwicklung von epithelialen Neoplasien erkennen lassen (Münz 2003). In Karzinomzelllinien wurde eine Schlüsselrolle des Glykoproteins für die Induktion von Signalkaskaden nachgewiesen, die auf zellulärer Ebene eine Zunahme der Prozesse von Metabolismus und Wachstum bedeuten. Es wurde gezeigt, dass EpCAM verschiedene Gene und Proteine reguliert, deren wesentliche Bedeutung für die Karzinogenese bereits bekannt ist. Hier ist vor allem das Onkogen c-myc zu nennen, das über die Regulation weiterer Gene und Proteine eine wichtige Rolle in Karzinomen spielt (Münz 2003; Jansen-Durr et al. 1993).

Außerdem geben neuere strukturelle Daten Hinweise, dass EpCAM auch immunmodulatorische Eigenschaften besitzt, die zur Immunevasion von Karzinomen beitragen könnten (Meyaard et al. 2001). In diesem Zusammenhang sind der kürzlich als Ligand von EpCAM identifizierte Leukozyten-assoziierten Immunglobulin-ähnlichen Rezeptor LAIR1 zu nennen und der CD59 Rezeptor. Dieser Rezeptor wird durch EpCAM induziert und ist in der Lage, Tumorzellen einen gewissen Schutz vor Komplementsystem vermittelter Lyse zu verleihen (Maio et al. 1998).

Aufgrund dieser deskriptiven und funktionellen Daten muss dem tumorassoziierten Antigen EpCAM wesentliche Bedeutung für die Karzinogenese von SCCHN und anderen Karzinomen beigemessen werden.

4.3 Differentielle Hyperglykosilierung von EpCAM in Karzinomen

Obwohl EpCAM in einer Reihe von gesunden Epithelien nachweisbar ist und in den meisten Karzinomen überexprimiert wird, ist bisher nicht geklärt, ob sich das Membranprotein in den verschiedenen Geweben durch strukturelle Modifikationen unterscheidet und insbesondere ob es tumorspezifische Varianten gibt, die in Karzinomzellen eine andere Funktion ausüben als in gesunden Epithelzellen.

Für EpCAM sind verschiedene Molekülvarianten bekannt, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden und für die anzunehmen ist, dass sie unterschiedlichen Glykosilierungsvarianten entsprechen. Da für EpCAM nur eine mRNA bekannt ist und kein differentielles Splicen für das kodierende Gen nachgewiesen werden konnte (Balzar et al. 1999), geht man davon aus, dass es sich bei den verschiedenen Erscheinungsformen von EpCAM um posttranslationale Modifikationen des Proteins handelt. So wird EpCAM zunächst als 34 kDa-Protein synthetisiert und anschließend durch Bindung von Mannose-Oligosacchariden an drei potentielle Glykosilierungsstellen im

extrazellulären Proteinanteil N-glykosiliert, wodurch verschiedene Glykosilierungsvarianten des Membranproteins entstehen (Thampoe et al. 1988).

In der vorliegenden Arbeit wurden Karzinome auf die Expression und Glykosilierung von EpCAM untersucht. Karzinomzelllinien, Gewebeproben aus Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region von 60 Patienten und Tumorgewebeproben aus vier Patienten mit Kolonkarzinom ließen dabei im Westernblot die Expression verschiedener EpCAM-Varianten nachweisen, die sich in ihrem Molekulargewicht unterschieden (Abbildung 3, 5, 6 und 12). Die durchgeführten Messungen mit Inhibitoren der N- und der O-Glykosilierung in der Zelllinie FaDu (aus SCCHN) bestätigen die N-Glykosilierung von EpCAM und zeigen, dass die unterschiedlichen Molekulargewichte verschiedenen Glykosilierungsformen des Moleküls entsprechen (Abbildung 4).

Neben den Molekülvarianten mit 35- und 37 kDa Molekulargewicht exprimierten alle auswertbaren Tumorproben die glykosilierten 40- und 42 kDa- Formen von EpCAM in unterschiedlicher Kombination (Abbildung 3, 5, 6 und 12). Vergleicht man die Gesamtheit der Tumorproben aus Hals-Kopf-Karzinomen mit den Schilddrüsenproben, die als Referenz für gesundes Epithel untersucht wurden, so fällt ein deutlich differentes Glykosilierungsmuster auf: Während in allen EpCAM-positiven Tumorproben glykosilierte Proteinformen vorlagen, war EpCAM in Schilddrüsenengewebe in über 90 % der Fälle nicht oder geringgradig glykosiliert, in zwei Drittel der Fälle war nur die unglykosilierte Form (37 kDa) oder das Abbauprodukt (35 kDa) von EpCAM nachzuweisen (Abbildung 13), die ausgeprägte Glykosilierungsform war in keiner der Schilddrüsenproben anzutreffen. Die Karzinome dagegen exprimierten ein heterogenes Bild mit unterschiedlichen Kombinationen der verschiedenen Glykosilierungsvarianten und zeigten in über drei Viertel der Fälle mittelgradig oder stark ausgeprägte Glykosilierungsformen (Abbildung 14 und Abbildung 15). Auch in den autologen Probenpaaren aus dem Magen-Darm-Trakt ließ sich eine Hyperglykosilierung in den Karzinomproben beobachten (Abbildung 20), so dass man als aufgrund dieser Ergebnisse von

einer Hyperglykosilierung des EpCAM-Proteins in SCCHN und in anderen Karzinomen ausgehen kann.

Der Vergleich innerhalb von 27 autologen Probenpaaren, in denen EpCAM in Schilddrüsen- und Tumorprobe nachweisbar war, zeigt eine höhergradige EpCAM-Glykosilierung in den Tumorproben als im Schilddrüsengewebe. In lediglich vier Probenpaaren bestand ein vergleichbarer Glykosilierungsgrad. Ein Einzelfall, der eine umgekehrte Befundkonstellation mit stärkerer Glykosilierung von EpCAM in der Schilddrüse als im Tumor zeigte, stellt eine deutliche Diskrepanz zu den übrigen Ergebnissen dar. Hier muss die Möglichkeit einer Vertauschung der beiden Proben innerhalb des autologen Paares in Betracht gezogen werden. Da die Schilddrüsenproben nur im Westernblot, nicht aber histologisch untersucht wurden, muss dieser Einzelbefund unklar bleiben. Für die ca. 30 % der Fälle, in denen kein EpCAM im Westernblot nachweisbar war, ist anzunehmen, dass die Biopsate nicht ausreichend Schilddrüsenepithel bzw. Karzinomzellen enthielten um EpCAM messen zu können.

Die hier vorgestellten Befunde deuten somit auf eine differente Glykosilierung des epithelialen Adhäsionsmoleküls mit fehlender oder geringgradiger Glykosilierung innerhalb von gesunden EpCAM-exprimierenden Epithelien und Hyperglykosilierung von EpCAM in Karzinomen als Ergebnis einer gewebsspezifischen posttranslationalen Modifikation des epithelialen Antigens. Bemerkenswert ist außerdem, dass EpCAM in den Tumorproben aus Kopf-Hals-Karzinomen jeweils stärker glykosiliert ist als im autologen Schilddrüsengewebe. Dies könnte ein Hinweis auf eine differente Funktion des hyperglykosilierten EpCAM in Karzinomzellen sein. Die Tatsache, dass der Ausprägungsgrad der Glykosilierung unabhängig von Tumorparametern wie Lokalisation, Tumorstadium oder Differenzierungsgrad ist (Abbildung 21 und Abbildung 22), deutet darauf, dass hyperglykosiliertes EpCAM unabhängig von Parametern der Tumorprogression spezifisch für Karzinome ist und auch funktionell eine Rolle in der Karzinogenese spielt.

4.4 Hyperglykosilierung von EpCAM in Karzinomen - Funktionelle Aspekte

Bisher ist nicht bekannt, ob die verschiedenen Glykosilierungsformen von EpCAM eine unterschiedliche Funktion in gesunden Epithelien und in neoplastisch transformiertem Gewebe ausüben. Da man annimmt, dass die Expression von EpCAM in epithelialen Neoplasien mit einer essentiellen funktionellen Bedeutung in der Karzinogenese assoziiert ist, könnte man vermuten, dass zwischen der posttranslationalen Hyperglykosilierung von EpCAM und den funktionellen Eigenschaften des tumorassoziierten Antigens in Karzinomzellen ein Zusammenhang besteht.

Für bestimmte Proteine wurde beschrieben, dass Glykosilierung von Bedeutung für die gegenseitige Erkennung von Rezeptoren und Liganden ist. So ist bei dem Immunglobulin G eine Glykosilierung essentiell für die Erkennung durch Fc-gamma-Rezeptoren (Fc γ -R). Nach Deglykosilierung der C(H)2 Domäne ist die Fc-Region nicht mehr in der Lage, Fc-gamma-Rezeptoren (Fc γ -R) zu binden (Mimura et al. 2001; Radaev and Sun 2001).

Das myeline P0 Protein ist ein glykosiliertes homophiles Adhäsionsmolekül, das eine singuläre Immunglobulin-Domäne aufweist und in Nervengeweben anzutreffen ist. Nur wenn die Bindungsregion durch posttranslationale Modifikation glykosiliert ist, besitzt das Molekül die Fähigkeit zur Ausbildung homophiler Zelladhäsion (Filbin and Tennekoon 1993).

Bei dem Membranprotein CD 44 hat die strukturelle Änderung durch Glykosilierung und die damit verbundene veränderte Ligandenerkennung erhebliche Auswirkungen auf die Proteinfunktion. Das transmembrane Glykoprotein CD44 wird in proliferierenden Epithelzellen und aktivierten Lymphozyten in einer großen Zahl von Isoformen exprimiert und fungiert hauptsächlich als Rezeptor für Hyaluronan, kann aber auch, mit geringerer Affinität, einige andere extrazelluläre Matrixliganden binden. Eine bedeutende Rolle spielt das Protein für das „Homing“ von Lymphozyten. Die

Regulierung des Funktionszustand des Proteins erfolgt zum einen durch alternatives Splicing, insbesondere ist die Bindungsfähigkeit des Rezeptors jedoch vom Glykosilierungszustand des Moleküls abhängig. Dabei ist bemerkenswert, dass einige Molekülvarianten des CD44 Proteins in menschlichen und tierischen Neoplasmen überexprimiert werden (Rudzki and Jothy 1997; Katoh et al. 1999). So ließ sich Tierversuchen sich eine Proteinform von CD44 identifizieren, die in Adenokarzinomen von Ratten entscheidend für der Ausbildung von Metastasen ist.

Diese Beispiele anderer Funktionsproteine zeigen, dass posttranslationale Modifikationen zu Veränderungen in der Erkennung und Bindung von Liganden und Rezeptoren führen können und wesentlichen Einfluss zum einen auf die Interaktion zwischen Karzinomzellen und weiteren Zellen haben können und außerdem Eigenschaften von Tumorzellen, die deren malignes Verhalten ausmachen, (Motilität, Invasivität und Metastasierungspotential) direkt beeinflussen können.

In der extrazellulären Domäne von EpCAM wurde kürzlich der Leukozyten-assoziierte Immunglobulin-ähnliche Rezeptor LAIR1 als Ligand identifiziert (Meyaard et al. 2001). LAIR1 trägt zur Immunevasion von Karzinomzellen bei und wird auf verschiedenen Immunzellen exprimiert. Der Rezeptor transduziert mittels zytoplasmatischer „immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motifs“ (ITIMs) inhibitorische Signale in Zellen. In gesunden EpCAM-positiven Epithelzellen, wie beispielsweise in Kolonschleimhaut mag die Aktivierung von LAIR1 auf Immunzellen zur Ausbildung einer physiologischen Toleranz beitragen. Im Falle von Karzinomzellen dagegen könnte die Hyperglykosilierung von EpCAM ein verändertes Bindungsverhalten gegenüber LAIR1 bedingen, das sich auch in funktioneller Hinsicht auswirkt. So könnte der Ligand in hyperglykosiliertem EpCAM auf Tumorzellen in einer aktivierten Form vorliegen und eine Inhibition infiltrierender Leukozyten bewirken und dadurch eine effektive Immunantwort verhindern. Auch für andere Liganden von EpCAM wäre eine veränderte Bindungskapazität in glykosilierten Formen des Membranproteins vorstellbar. So wäre beispiels-

weise denkbar, dass die posttranslationale Modifizierung in Karzinomzellen auch zu Änderungen der von EpCAM vermittelten wachstumsfördernden Eigenschaften führt, wobei der Nachweis hierfür noch zu führen ist.

Angesichts der aufgeführten Beispiele anderer Proteine ist denkbar, dass auch EpCAM durch die posttranskriptionelle Glykosilierung eine Veränderung des Funktionszustands erfährt und onkogene Eigenschaften annimmt.

4.5 Klinische Bedeutung von EpCAM als spezifisches Zielantigen in Karzinomen

Da EpCAM in Kopf-Hals-Karzinomen und in anderen Karzinomen überexprimiert wird, besitzt das epitheliale Membranprotein eine wesentliche Bedeutung als tumorassoziiertes Antigen in SCCHN und anderen epithelialen Malignomen und ist somit als Zielgen in der Diagnostik und für therapeutische Zwecke prädestiniert. In der Tat hat das Membranprotein EpCAM bereits Bedeutung als Tumormarker und als Zielantigen bei Immuntherapien mit monoklonalen und bispezifischen Antikörpern erlangt (Riethmüller et al. 1998; Braun et al. 1999; Zeidler et al. 2000). Beim Pankreaskarzinom zeigte EpCAM eine vergleichbare Sensitivität und Sensibilität wie etablierten Markersubstanzen (Gansauge et al. 1996), beim Mammakarzinom war die Überexpression von EpCAM mit einer schlechten Prognose assoziiert und bietet als Tumormarker ein diagnostisches Kriterium zur individuellen Einschätzung des Malignitätsgrades bei Brustkrebs (Gastl et al. 2002). Da EpCAM ausschließlich in Malignomen epithelialer Herkunft anzutreffen ist, kann es als epithelialer Tumormarker in immunpathologischen Untersuchungen hilfreich sein, die histologische Herkunft entdifferenzierter Tumoren zu klären und somit zur Entscheidungsfindung in der Therapieplanung beitragen (Balzar et al. 1999). Aber auch in der Differentialdiagnose innerhalb von Karzinomen kann EpCAM zur Klärung beitragen. So zeigen Basalzellkarzinome und das spinozelluläre Karzinom der Haut große morphologische Ähnlichkeit in der histologischen Untersuchung, Expression von EpCAM läßt

sich jedoch nur in Basalzellkarzinomen nachweisen (Tellechea et al. 1993). Lebermetastasen von Kolon- und Gallengangskarzinomen weisen entsprechend ihrer Herkunft eine Expression von EpCAM auf, während das primäre Leberzellkarzinom EpCAM-negativ ist (de Boer et al. 1995).

Weiterhin wurde das Protein bereits erfolgreich als Marker zur Detektion disseminierter Tumorzellen im Knochenmark und im peripheren Blut eingesetzt (Chaubal et al. 1999; Wirtschafter et al. 2002). Damit besteht für Patienten mit SCCHN die Möglichkeit, mit Hilfe von EpCAM den Status einer minimal residual disease zu erfassen. Dies ist insofern von erheblicher Bedeutung als dass disseminierte Tumorzellen als Ausgangspunkt für Metastasen angesehen werden.

Verschiedene immuntherapeutische Ansätze mit EpCAM als Zielmolekül in der Behandlung von fortgeschrittenen Kolonkarzinomen ließen zum Teil beachtliche Ergebnisse erzielen. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Kolonkarzinom, die nach chirurgischer Tumorsektion aufgrund von minimal residual disease mit dem EpCAM-spezifischen mAb 17-1A behandelt wurden, kam es zu einer Verbesserung der 7-Jahres-Überlebensrate von 30 % (Riethmüller et al. 1998). Bei Mammakarzinomen mit Metastasierung oder lokoregionären Rezidiven konnte eine Behandlung mit 17-1A die Elimination von EpCAM-positiven Tumorzellen in vier von zehn Patientinnen erreichen (Braun et al. 1999).

EpCAM bietet also interessante Ansatzpunkte für weitere Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie von Karzinomen. Die Tatsache, dass gesunde Plattenepithelien des Kopf-Hals-Bereichs primär kein EpCAM exprimieren, es im Falle einer neoplastischen Transformation aber zu einer de novo Expression kommt, verleiht dem Glykoproteins besondere Attraktivität als Zielantigen in der Immuntherapie von SCCHN, da sich diese spezifisch gegen Karzinomgewebe und nicht gegen das gesunde, EpCAM-negative Epithel der Kopf-Hals-Region richten würde. Allerdings besteht eine nicht unerhebliche Limitierung der bisherigen EpCAM-assoziierten Immuntherapien darin, dass EpCAM zwar ein tumorassoziiertes, aber kein tumorspezifi-

sches Antigen ist und in gesunden Zellen unter anderem an Funktionen wie der epithelialen Differenzierung beteiligt ist (Balzar et al. 1999). So wird EpCAM nicht nur auf Karzinomzellen exprimiert, sondern ist gerade auch in sich häufig erneuernden gesunden Epithelien wie Lunge, Kolon, Magen, Schilddrüse und einigen weiteren regenerativen Gewebsarten anzutreffen. Vor allem Adenoepithelien, wie beispielsweise Kolonschleimhaut, exprimieren EpCAM in hohem Maße. Die heterogene Verteilung des Antigens in sowohl gesunden als auch neoplastischen Epithelien kann bei Immuntherapien mit EpCAM zu toxischen Nebenwirkungen führen. So zeigten Karzinompatienten unter der Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper GA733 gastrointestinale Nebenwirkungen, die allerdings als geringfügig und vorübergehend beschrieben wurden (Herlyn et al. 1991). Eine weitere Einschränkung von Immuntherapien mit EpCAM als Zielantigen besteht darin, dass Karzinome, die eine sehr heterogene oder insgesamt geringe Expressionsrate für das epitheliale Membranprotein aufweisen, nur eine partielle Elimination von neoplastischem Gewebe durch diese Behandlungsform erwarten lassen. Für manche Fälle von undifferenzierten Karzinomen wurde auch ein Verlust des EpCAM-Antigens beschrieben (High et al. 1996).

Die in dieser Untersuchung beschriebene tumorspezifische Modifikation von EpCAM ist von großem Interesse, da sie weiterführende Möglichkeiten für die Diagnostik und Therapie von Karzinomen eröffnet. Da gezeigt werden konnte, dass die untersuchten Tumorproben aus SCCHN hyperglykosilierte Proteinformen von EpCAM exprimieren, wäre die Entwicklung von Antikörpern vorstellbar, die mit möglichst hoher Spezifität glykosilierte Formen von EpCAM erkennen. Dies würde einerseits ermöglichen, im Rahmen von diagnostischen Maßnahmen Karzinomgewebe als solches zu identifizieren und von gesundem Gewebe zu unterscheiden und andererseits eine Basis für die Entwicklung spezifischer Immuntherapien darstellen.

MUC-1 aus der Proteinfamilie der Muzine gilt ebenfalls als tumorassoziiert und zeigt ermutigende Ergebnisse in ersten Ansätzen von Immuntherapien (Taylor-Papadimitriou et al. 1999). Das als MUC1 oder Muzin bezeichnete

Membranprotein, das durch das MUC1 Gen kodiert wird, weist interessante Analogien zu EpCAM auf. Das Glykoprotein wurde zunächst mit Hilfe monoklonaler Antikörpern auf der Membran von Epithelzellen laktierender Mamma identifiziert und ist sowohl in gesunden Adenoepithelien als auch in daraus hervorgehenden Karzinomen anzutreffen. Neben dem Drüsengewebe der Mamma wird Muzin vor allem in Ovarien und in Kolonschleimhaut exprimiert. Interessanterweise unterscheidet sich dieses Glykoprotein ebenso wie EpCAM in seiner Erscheinungsform in gesunden und transformierten Epithelien: Im Vergleich zu gesunden Drüsengeweben wird Muzin in den daraus entstehenden Karzinomen zum einen überexprimiert, außerdem weist das Protein in dem malignen Geweben aberrante Glykosilierungsformen auf (Taylor-Papadimitriou et al. 1999). Es wird angenommen, dass sich die strukturellen Änderungen auch auf das Bindungsverhalten der für MUC1 identifizierten Liganden auswirken, die wiederum die funktionellen Eigenschaften des Moleküls beeinflussen können. Die wurde für zwei Liganden beschrieben, die ICAM1 und Sialoadhesin binden (Regimbald et al. 1996; Bohm et al. 1997) und die zur Unterdrückung einer Immunreaktion gegenüber Karzinomzellen beitragen könnten (Agrawal et al. 1998; van de Wiel-van Kemenade et al. 1993).

Ein wichtiger Schritt hin zu einer spezifischen Immuntherapie mit MUC1 war die Identifizierung des SM3-Epitops, einer Antigenstruktur, die nur in Karzinomen auf dem MUC1-Protein anzutreffen ist, wohingegen dieses Epitop in gesunden Muzin-exprimierenden Epithelien maskiert und nicht darstellbar ist. Es kam zur Entwicklung von Antikörpern, die spezifisch die in malignen Geweben anzutreffende Proteinvariante erkennen (Paul et al. 2000). In vitro gelang die Herstellung zytotoxischer T-Zellen mit Spezifität für MUC1, die in der Lage sind, Tumorzellen mit Expression von MUC1 wirkungsvoll zu zerstören (Mukherjee et al. 2001). In einer Pilotstudie an Patientinnen mit fortgeschrittenen Brust- und Ovarialkarzinomen ließen sich nach einer Vakzinierung mit MUC1- oder HER-2/neu-Peptiden in 5 von 10 Fällen Peptid-spezifische zytotoxische T-Zellen über einen Zeitraum von über sechs Monaten nachweisen (Brossart et al. 2000).

Die Erfahrungen mit MUC1 ermutigen zu weiterführenden Untersuchungen an dem tumorassoziierten epithelialen Glykoprotein EpCAM, das ebenfalls in Karzinomen hyperglykosiliert ist. Es sollten weitere Anstrengungen unternommen werden, die darauf abzielen, die differentiellen Glykosilierungsformen von EpCAM in SCCHN und anderen Karzinomen strukturell zu analysieren. Könnten an EpCAM karzinomspezifische Epitope identifiziert werden, so wäre dies eine wesentliche Grundlage für die Entwicklung karzinomspezifischer Antikörper. Ziel für den klinischen Einsatz wären Immuntherapien mit Antikörpern, die spezifisch hyperglykosilierte Proteinformen von EpCAM in Karzinomen erkennen, wobei noch zu klären wäre, ob nicht etwa für Karzinome unterschiedlicher histologischer Herkunft differente oder gar spezifische Glykosilierungsformen existieren. So zeigten sowohl SCCHN als auch Kolon- und Magenkarzinome die beschriebene differentielle Hyperglykosilierung von EpCAM, wobei die Kopf-Hals-Karzinome aus EpCAM-negativen Plattenepithelien hervorgehen, während die Deckepithelien der Lumina des Magen-Darm-Trakt EpCAM-positiv sind.

Angesichts der insgesamt schlechten Prognose von soliden Tumoren und insbesondere der Kopf-Hals-Karzinome scheinen die Möglichkeiten von Chirurgie, Radio- und Chemotherapie trotz aller Anstrengungen und Neuentwicklungen der letzten Jahrzehnte ausgeschöpft. Die Notwendigkeit neuer Konzepte, die über die bisherigen Therapieformen hinausgehen, ist offensichtlich. Therapien mit spezifischen Antikörpern, die gegen Karzinom-assoziiertes hyperglykosiliertes EpCAM gerichtet sind, ließen auf eine höhere Therapieeffizienz bei geringeren Nebenwirkungen hoffen, als bisher in Immuntherapien mit EpCAM erreicht worden ist. Weiterhin würde der Einsatz solcher Karzinom-spezifische Antikörper die diagnostischen Möglichkeiten bei Karzinompatienten erweitern. Von spezifischen Immuntherapien, die gegen hyperglykosiliertes Karzinom-assoziiertes EpCAM gerichtet wären, könnten insbesondere Patienten mit residual disease profitieren, bei denen die konventionellen Therapieoptionen ausgeschöpft sind und für die dadurch eine Verbesserung der Prognose zu erhoffen wäre. Weiterhin wäre der

Einsatz einer adjuvanten Immuntherapie mit EpCAM bei fortgeschrittenen Tumorstadien denkbar.

Zusammenfassend wäre die Identifizierung karzinomspezifischer Varianten von EpCAM eine vielversprechende Voraussetzung für die Entwicklung neuer Formen der Immuntherapie mit höherer Spezifität und größerer Wirksamkeit und gleichzeitig geringeren Nebenwirkungen.

5 Zusammenfassung

Das epitheliale Adhäsionsmolekül EpCAM wird insbesondere in gesunden Adenoepithelien exprimiert, nicht aber in den mukösen Plattenepithelien der oberen Atem- und Verdauungswege. Aus diesen Geweben hervorgehende Plattenepithelkarzinome dagegen zeigen eine Überexpression von EpCAM. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zudem, dass die Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region EpCAM außerdem in einer hyperglykosilierten Proteinvariante exprimieren, die das Ergebnis posttranskriptioneller Modifikation ist.

So konnte gezeigt werden, dass in gesundem und in malignem Gewebe tatsächlich unterschiedliche Glykosilierungsformen von EpCAM vorliegen: In gesundem Gewebe wird EpCAM als unglykosiliertes Protein von 37 kDa exprimiert. Das aus Tumorgewebe stammende EpCAM hingegen war in den untersuchten Karzinomzelllinien aus SCCHN, Mamma- und Kolon und in den Gewebeproben aus Patienten mit SCCHN und mit Kolonkarzinomen hyperglykosiliert. Dabei zeigten die Karzinome ein heterogenes Bild mit unterschiedlichen Variationen und Kombinationen der verschiedenen Glykosilierungsformen. Gesundes EpCAM-positives Schilddrüsenepithel und auch gesunde Kolon- und Magenschleimhaut dagegen exprimierten vorwiegend unglykosilierte Formen von EpCAM. Innerhalb von Probenpaaren aus SCCHN und autologem Schilddrüsenepithel war EpCAM in den meisten Fällen (81,5 %) in der Karzinomprobe stärker glykosiliert als im gesunden Epithel, eine analoge Verteilung der Glykosilierungsmuster zeigten die Probenpaare aus gesunder und neoplastisch veränderter Kolon- und Magenschleimhaut.

In epithelialen Neoplasien wird EpCAM eine essentielle Bedeutung für die Karzinogenese zugeschrieben. Gleichzeitig dominieren in SCCHN und in anderen Karzinomen hyperglykosilierte Proteinvarianten von EpCAM, die in gesunden Epithelien nicht oder kaum anzutreffen sind. Man könnte daher vermuten, dass zwischen der posttranslationalen Hyperglykosilierung von

EpCAM und den funktionellen Eigenschaften des tumorassoziierten Antigens in Karzinomzellen ein enger Zusammenhang besteht.

Weitere Untersuchungen wären notwendig, um die molekulare Struktur und funktionelle Bedeutung der hyperglykosilierten Proteinvarianten von EpCAM in Karzinomen zu klären. Die Identifizierung karzinomspezifischer Epitope auf dem Glykoprotein EpCAM wäre Voraussetzung für die Entwicklung spezifischer Antikörpern, die hyperglykosiliertes EpCAM auf Karzinomzellen erkennen. Ziel wäre eine Immuntherapie mit EpCAM von hoher Karzinomspezifität und somit ein hoher therapeutischer Wirkungsgrad bei geringerer Toxizität. Für Patienten mit SCCHN könnte dies insbesondere bei minimal residual disease zu einer Verbesserung der bisher ungünstigen Prognose führen.

6 Literatur

- Agrawal B, Krantz MJ, Reddish MA, Longenecker BM. Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2. *Nat Med.* 1998;4(1):43-9.
- Balzar M, Bakker HA, Briaire-de-Bruijn IH, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol.* 1998;18(8):4833-43.
- Balzar M, Briaire-de Bruijn IH, Rees-Bakker HA, Prins FA, Helfrich W, de Leij L, Riethmüller G, Alberti S, Warnaar SO, Fleuren GJ, Litvinov SV. Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol.* 2001;21(7):2570-80.
- Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med.* 1999;77(10):699-712.
- Beckerle MC. Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion. *Bioessays.* 1997;19(11):949-57.
- Bergsagel PL, Victor-Kobrin C, Timblin CR, Trepel J, Kuehl WM. A murine cDNA encodes a pan-epithelial glycoprotein that is also expressed on plasma cells. *J Immunol.* 1992;148(2):590-6.
- Berrino F, Sant M, Verdecchia A, Capocaccia R, Hakulinen T, Esteve J. Survival of cancer patients in Europe. The Eurocare study. Lyon: IARC Scientific Publications No. 132, 1995.
- Bjork P, Jonsson U, Svedberg H, Larsson K, Lind P, Dillner J, Hedlund G, Dohlsten M, Kalland T. Isolation, partial characterization, and molecular cloning of a human colon adenocarcinoma cell-surface glycoprotein recognized by the C215 mouse monoclonal antibody. *J Biol Chem.* 1993;268(32):24232-41.
- Bohm CM, Mulder MC, Zennadi R, Notter M, Schmitt-Graff A, Finn OJ, Taylor-Papadimitriou J, Stein H, Clausen H, Riecken EO, Hanski C. Carbohydrate recognition on MUC1-expressing targets enhances cytotoxicity of a T cell subpopulation. *Scand J Immunol.* 1997;46(1):27-34.
- Braun S, Hepp F, Kantenich CR, Janni W, Pantel K, Riethmüller G, Willgeroth F, Sommer HL. Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res.* 1999;5(12):3999-4004.

- Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood*. 2000;96(9):3102-8.
- Bumol TF, Marder P, DeHerdt SV, Borowitz MJ, Apelgren LD. Characterization of the human tumor and normal tissue reactivity of the KS1/4 monoclonal antibody. *Hybridoma*. 1988;7(4):407-15.
- Burke CL, Stern DF. Activation of Neu (ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface. *Mol Cell Biol*. 1998;18(9):5371-9.
- Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(6):1670-4.
- Chaubal S, Wollenberg B, Kastenbauer E, Zeidler R. Ep-CAM--a marker for the detection of disseminated tumor cells in patients suffering from SCCHN. *Anticancer Res*. 1999;19(3B):2237-42.
- Cirulli V, Ricordi C, Hayek A. E-cadherin, NCAM, and EpCAM expression in human fetal pancreata. *Transplant Proc*. 1995;27(6):3335.
- Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, Golub TR. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3260-5.
- Cook JA, Jones AS, Phillips DE, Soler Lluch E. Implications of tumour in resection margins following surgical treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Otolaryngol*. 1993;18(1):37-41.
- Cooper JS, Pajak TF, Rubin P, Tupchong L, Brady LW, Leibel SA, Laramore GE, Marcial VA, Davis LW, Cox JD, et al. Second malignancies in patients who have head and neck cancer: incidence, effect on survival and implications based on the RTOG experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989;17(3):449-56.
- Davis CG. The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biol*. 1990;2(5):410-9.
- de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol*. 1999;188(2):201-6.
- Deswal R, Sopory SK. Glyoxalase I from *Brassica juncea* is a calmodulin stimulated protein. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1450(3):460-7.

- Dhooge IJ, Albers FW. Multiple primary tumors in head and neck cancer: etiology and incidence. *J Belge Radiol.* 1994;77(2):55-9.
- Dimery IW, Hong WK. Overview of combined modality therapies for head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(2):95-111.
- Durbin H, Rodrigues N, Bodmer WF. Further characterization, isolation and identification of the epithelial cell-surface antigen defined by monoclonal antibody AUA1. *Int J Cancer.* 1990;45(3):562-5.
- Filbin MT, Tennekoon GI. Homophilic adhesion of the myelin P0 protein requires glycosylation of both molecules in the homophilic pair. *J Cell Biol.* 1993;122(2):451-9.
- Flieger D, Kufer P, Beier I, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. A bispecific single-chain antibody directed against EpCAM/CD3 in combination with the cytokines interferon alpha and interleukin-2 efficiently re-targets T and CD3+CD56+ natural-killer-like T lymphocytes to EpCAM-expressing tumor cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2000;49(8):441-8.
- Gansauge F, Gansauge S, Parker N, Beger MI, Poch B, Link KH, Safi F, Beger HG. CAM 17.1--a new diagnostic marker in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 1996;74(12):1997-2002.
- Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dunser M, Mikuz G. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet.* 2000;356(9246):1981-2.
- Gires O, Kieu C, Fix P, Schmitt B, Münz M, Wollenberg B, Zeidler R. Tumor necrosis factor alpha negatively regulates the expression of the carcinoma-associated antigen epithelial cell adhesion molecule. *Cancer.* 2001;92(3):620-8.
- Glatz JF, Vork MM, Cistola DP, van der Vusse GJ. Cytoplasmic fatty acid binding protein: significance for intracellular transport of fatty acids and putative role on signal transduction pathways. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1993;48(1):33-41.
- Grau JJ, Cuchi A, Traserra J, Firvida JL, Arias C, Blanch JL, Estape J. Follow-up study in head and neck cancer: cure rate according to tumor location and stage. *Oncology.* 1997;54(1):38-42.
- Gruss HJ, Brach MA, Drexler HG, Bonifer R, Mertelsmann RH, Herrmann F. Expression of cytokine genes, cytokine receptor genes, and transcription factors in cultured Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Cancer Res.* 1992;52(12):3353-60.
- Helfrich W, Kroesen BJ, Roovers RC, Westers L, Molema G, Hoogenboom HR, de Leij L. Construction and characterization of a bispecific di-

- abody for retargeting T cells to human carcinomas. *Int J Cancer*. 1998;76(2):232-9.
- Herlyn D, Sears HF, Ernst CS, Iliopoulos D, Steplewski Z, Koprowski H. Initial clinical evaluation of two murine IgG2a monoclonal antibodies for immunotherapy of gastrointestinal carcinoma. *Am J Clin Oncol*. 1991;14(5):371-8.
- Hicklin DJ, Kageshita T, Ferrone S. Development and characterization of rabbit antisera to human MHC-linked transporters associated with antigen processing. *Tissue Antigens*. 1996;48(1):38-46.
- High AS, Robinson PA, Klein CE. Increased expression of a 38kd cell-surface glycoprotein MH99 (KS 1/4) in oral mucosal dysplasias. *J Oral Pathol Med*. 1996;25(1):10-3.
- Hopkins CR. Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter. *Trends Biochem Sci*. 1992;17(1):27-32.
- Houck JR, Medina JE. Management of cervical lymph nodes in squamous carcinomas of the head and neck. *Semin Surg Oncol*. 1995;11(3):228-39.
- Hussey DH, Latourette HB, Panje WR. Head and neck cancer: an analysis of the incidence, patterns of treatment, and survival at the University of Iowa. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl*. 1991;152:2-16.
- Jansen-Durr P, Meichle A, Steiner P, Pagano M, Finke K, Botz J, Wessbecher J, Draetta G, Eilers M. Differential modulation of cyclin gene expression by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3685-9.
- Kasper M, Behrens J, Schuh D, Muller M. Distribution of E-cadherin and Ep-CAM in the human lung during development and after injury. *Histochem Cell Biol*. 1995;103(4):281-6.
- Katoh S, Miyagi T, Taniguchi H, Matsubara Y, Kadota J, Tominaga A, Kincade PW, Matsukura S, Kohno S. Cutting edge: an inducible sialidase regulates the hyaluronic acid binding ability of CD44-bearing human monocytes. *J Immunol*. 1999;162(9):5058-61.
- Kim KB, Khuri FR, Shin DM. Recent advances in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2001;1(1):99-110.
- Klein CE, Cordon-Cardo C, Soehnchen R, Cote RJ, Oettgen HF, Eisinger M, Old LJ. Changes in cell surface glycoprotein expression during differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1987;89(5):500-6.

- Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet.* 1979;5(6):957-71.
- Kufer P, Mack M, Gruber R, Lutterbuse R, Zettl F, Riethmüller G. Construction and biological activity of a recombinant bispecific single-chain antibody designed for therapy of minimal residual colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 1997;45(3-4):193-7.
- Lamerz R. AFP. In: Thomas L (Hrsg) *Labor und Diagnose.* 5. Auflage. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt /Main 1998, S. 961-966.
- Lang S, Wollenberg B, Dellian M, Steuer-Vogt MK, Schwenzer K, Sautier W, Chucholowski M, Eckel R, Faas I, Wilmes E, Ehrenfeld M, Arnold W, Kastenbauer E, Holzel D. Klinische und epidemiologische Daten zu Malignomen des Kopf-Hals-Bereichs Laryngo-Rhino-Otologie. 2002;81(7):499-508.
- Lang S, Zeidler R, Pauli C, Andratschke M, Wollenberg B. IL-2 Gentherapie bei HNO-Karzinomen. *Laryngo-Rhino-Otologie.* 2001;80(4):191-5.
- Leitlinie Onkologie des Kopf-Hals-Bereiches, Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie. Konsensusbericht. *HNO* 2000;48:104-118.
- Lenarcic B, Ritonja A, Strukelj B, Turk B, Turk V. Equistatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from *Actinia equina*, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain. *J Biol Chem.* 1997;272(21):13899-903.
- Linnenbach AJ, Seng BA, Wu S, Robbins S, Scollon M, Pyrc JJ, Druck T, Huebner K. Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol.* 1993;13(3):1507-15.
- Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Prins F, Fleuren GJ, Warnaar SO. Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *J Cell Biol.* 1997;139(5):1337-48.
- Litvinov SV, van Driel W, van Rhijn CM, Bakker HA, van Krieken H, Fleuren GJ, Warnaar SO. Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol.* 1996;148(3):865-75.
- Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 1994;125(2):437-46.

- LoBuglio AF, Saleh MN. Advances in monoclonal antibody therapy of cancer. *Am J Med Sci.* 1992;304(3):214-24.
- Maio M, Brasoveanu LI, Coral S, Sigalotti L, Lamaj E, Gasparollo A, Visintin A, Altomonte M, Fonsatti E. Structure, distribution, and functional role of protectin (CD59) in complement-susceptibility and in immunotherapy of human malignancies (Review). *Int J Oncol.* 1998;13(2):305-18.
- Mann K, Deutzmann R, Aumailley M, Timpl R, Raimondi L, Yamada Y, Pan TC, Conway D, Chu ML. Amino acid sequence of mouse nidogen, a multidomain basement membrane protein with binding activity for laminin, collagen IV and cells. *EMBO J.* 1989;8(1):65-72.
- Means AR, Dedman JR. Calmodulin--an intracellular calcium receptor. *Nature.* 1980;285(5760):73-7.
- Means AR, VanBerkum MF, Bagchi I, Lu KP, Rasmussen CD. Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol Ther.* 1991;50(2):255-70.
- Mellstedt H, Fagerberg J, Frodin JE, Hjelm-Skog AL, Liljefors M, Markovic K, Mosolits S, Ragnhammar P. Ga733/EpCAM as a target for passive and active specific immunotherapy in patients with colorectal carcinoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;910:254-61.
- Mellstedt H, Frodin JE, Masucci G, Ragnhammar P, Fagerberg J, Hjelm AL, Shetye J, Wersall P, Osterborg A. The therapeutic use of monoclonal antibodies in colorectal carcinoma. *Semin Oncol.* 1991;18(5):462-77.
- Meyaard L, van der Vuurst de Vries AR, de Ruiter T, Lanier LL, Phillips JH, Clevers H. The epithelial cellular adhesion molecule (Ep-CAM) is a ligand for the leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor (LAIR). *J Exp Med.* 2001;194(1):107-12.
- Mimura Y, Sondermann P, Ghirlando R, Lund J, Young SP, Goodall M, Jefferis R. Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding. *J Biol Chem.* 2001;276(49):45539-47.
- Momburg F, Moldenhauer G, Hammerling GJ, Moller P. Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res.* 1987;47(11):2883-91.
- Mukherjee P, Ginardi AR, Tinder TL, Sterner CJ, Gendler SJ. MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes eradicate tumors when adoptively transferred in vivo. *Clin Cancer Res.* 2001;7(3 Suppl):848s-855s.

- Münz, M. Funktionelle Charakterisierung des tumorassoziierten epithelialen Glykoproteins EpCAM. Dissertationsarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2003.
- Nelson AJ, Dunn RJ, Peach R, Aruffo A, Farr AG. The murine homolog of human Ep-CAM, a homotypic adhesion molecule, is expressed by thymocytes and thymic epithelial cells. *Eur J Immunol.* 1996;26(2):401-8.
- Oosterwijk E, Ruiter DJ, Wakka JC, Huiskens-van der Meij JW, Jonas U, Fleuren GJ, Zwartendijk J, Hoedemaeker P, Warnaar SO. Immunohistochemical analysis of monoclonal antibodies to renal antigens. Application in the diagnosis of renal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 1986;123(2):301-9.
- Partridge M, Green MR, Langdon JD, Feldmann M. Production of TGF-alpha and TGF-beta by cultured keratinocytes, skin and oral squamous cell carcinomas--potential autocrine regulation of normal and malignant epithelial cell proliferation. *Br J Cancer.* 1989;60(4):542-8.
- Paul S, Bizouarne N, Dott K, Ruet L, Dufour P, Acres RB, Kieny MP. Redirected cellular cytotoxicity by infection of effector cells with a recombinant vaccinia virus encoding a tumor-specific monoclonal antibody. *Cancer Gene Ther.* 2000;7(4):615-23.
- Perez MS, Walker LE. Isolation and characterization of a cDNA encoding the KS1/4 epithelial carcinoma marker. *J Immunol.* 1989;142(10):3662-7.
- Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet.* 2000;355(9208):949-55.
- Piyathilake CJ, Frost AR, Weiss H, Manne U, Heimbürger DC, Grizzle WE. The expression of Ep-CAM (17-1A) in squamous cell cancers of the lung. *Hum Pathol.* 2000;31(4):482-7.
- Quak JJ, Balm AJ, van Dongen GA, Brakkee JG, Scheper RJ, Snow GB, Meijer CJ. A 22-kd surface antigen detected by monoclonal antibody E 48 is exclusively expressed in stratified squamous and transitional epithelia. *Am J Pathol.* 1990;136(1):191-7.
- Radaev S, Sun PD. Recognition of IgG by Fc gamma receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *J Biol Chem.* 2001;276(19):16478-83.

- Ragnhammar P, Fagerberg J, Frodin JE, Hjelm AL, Lindemalm C, Magnusson I, Masucci G, Mellstedt H. Effect of monoclonal antibody 17-1A and GM-CSF in patients with advanced colorectal carcinoma--long-lasting, complete remissions can be induced. *Int J Cancer*. 1993;53(5):751-8.
- Regimbald LH, Pilarski LM, Longenecker BM, Reddish MA, Zimmermann G, Hugh JC. The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res*. 1996;56(18):4244-9.
- Remmert S, Rottmann M, Reichenbach M, Sommer K, Friedrich HJ. Lymphknotenmetastasierung bei Kopf-Hals-Tumoren. *Laryngo-Rhino-Otologie*. 2001;80(1):27-35.
- Rice DH, Becker TS. The salivary glands. Radiology, Surgery, Pathology. In: Hanafee WN, Ward PH (Hrsg). *Clinical Correlations in the head and neck*. Bd. 2. New York: Georg Thieme Verlag, 1994 :37-54.
- Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Funke I, Pichlmaier H, Hirche H, Buggisch P, Witte J, Pichlmayr R. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol*. 1998;16(5):1788-94.
- Robertson SC, Tynan JA, Donoghue DJ. RTK mutations and human syndromes when good receptors turn bad. *Trends Genet*. 2000;16(6):265-71.
- Rodrigues GA, Park M. Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr Opin Genet Dev*. 1994;4(1):15-24.
- Rofstad EK, Graff BA. Thrombospondin-1-mediated metastasis suppression by the primary tumor in human melanoma xenografts. *J Invest Dermatol*. 2001;117(5):1042-9.
- Roovers RC, Henderikx P, Helfrich W, van der Linden E, Reurs A, de Bruine AP, Arends JW, de Leij L, Hoogenboom HR. High-affinity recombinant phage antibodies to the pan-carcinoma marker epithelial glycoprotein-2 for tumour targeting. *Br J Cancer*. 1998;78(11):1407-16.
- Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Sznol M, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Seipp CA, Einhorn JH, Rogers-Freezer L, White DE. Impact of cytokine administration on the generation of antitumor reactivity in patients with metastatic melanoma receiving a peptide vaccine. *J Immunol*. 1999;163(3):1690-5.

- Rudzki Z, Jothy S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *Mol Pathol.* 1997;50(2):57-71.
- Schiechl H, Dohr G, Eherer A. Immunohistochemical localization and characterization of a protein from the basolateral membrane of rat small intestine epithelium using monoclonal antibody GZ-1. *J Histochem Cytochem.* 1986;34(12):1659-65.
- Schön MP, Schön M, Mattes MJ, Stein R, Weber L, Alberti S, Klein CE. Biochemical and immunological characterization of the human carcinoma-associated antigen MH 99/KS 1/4. *Int J Cancer.* 1993;55(6):988-95.
- Schuhmacher M, Kohlhuber F, Holzel M, Kaiser C, Burtscher H, Jarsch M, Bornkamm GW, Laux G, Polack A, Weidle UH, Eick D. The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(2):397-406.
- Schwartz RH. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med.* 1996;184(1):1-8.
- Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell.* 1986;46(5):659-67.
- Siegenthaler G, Hotz R, Chatellard-Gruaz D, Didierjean L, Hellman U, Saurat JH. Purification and characterization of the human epidermal fatty acid-binding protein: localization during epidermal cell differentiation in vivo and in vitro. *Biochem J.* 1994;302 (Pt 2):363-71.
- Siegenthaler G, Hotz R, Chatellard-Gruaz D, Jaconi S, Saurat JH. Characterization and expression of a novel human fatty acid-binding protein: the epidermal type (E-FABP). *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;190(2):482-7.
- Simon B, Podolsky DK, Moldenhauer G, Isselbacher KJ, Gattoni-Celli S, Brand SJ. Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(7):2755-9.
- Sinha P, Hutter G, Kottgen E, Dietel M, Schadendorf D, Lage H. Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas. *Electrophoresis.* 1999;20(14):2952-60.

- Stein R, Basu A, Goldenberg DM, Lloyd KO, Mattes MJ. Characterization of cluster 13: the epithelial/carcinoma antigen recognized by MAb RS7. *Int J Cancer Suppl.* 1994;8:98-102.
- Stieber P, Wollenberg B, Schmitt UM, Jan N von, Hofmann K, Fateh-Moghadam A. Stellenwert von Tumormarkern bei primären und rezidivierenden Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. *Tumordiagn. u. Ther.* 1996;17:116-121.
- Strnad J, Hamilton AE, Beavers LS, Gamboa GC, Apelgren LD, Taber LD, Sportsman JR, Bumol TF, Sharp JD, Gadski RA. Molecular cloning and characterization of a human adenocarcinoma/epithelial cell surface antigen complementary DNA. *Cancer Res.* 1989;49(2):314-7.
- Szala S, Froehlich M, Scollon M, Kasai Y, Steplewski Z, Koprowski H, Linnenbach AJ. Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA733-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(9):3542-6.
- Takamuku K, Baba K, Arinaga S, Li J, Mori M, Akiyoshi T. Apoptosis in antibody-dependent monocyte-mediated cytotoxicity with monoclonal antibody 17-1A against human colorectal carcinoma cells: enhancement with interferon gamma. *Cancer Immunol Immunother.* 1996;43(4):220-5.
- Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, McGuire WL. Association of the 323/A3 surface glycoprotein with tumor characteristics and behavior in human breast cancer. *Cancer Res.* 1990;50(11):3317-21.
- Tarmann T, Dohr G, Schiechl H, Barth S, Hartmann M. Immunohistochemical detection of an epithelial membrane protein in rat embryos at different stages of development. *Acta Anat (Basel).* 1990;137(2):141-5.
- Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles DW, Dalziel M. MUC1 and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1455(2-3):301-13.
- Tellechea O, Reis JP, Domingues JC, Baptista AP. Monoclonal antibody Ber EP4 distinguishes basal-cell carcinoma from squamous-cell carcinoma of the skin. *Am J Dermatopathol.* 1993;15(5):452-5.
- Thampoe IJ, Ng JS, Lloyd KO. Biochemical analysis of a human epithelial surface antigen: differential cell expression and processing. *Arch Biochem Biophys.* 1988;267(1):342-52.
- Trebak M, Begg GE, Chong JM, Kanazireva EV, Herlyn D, Speicher DW. Oligomeric state of the colon carcinoma-associated glycoprotein

- GA733-2 (Ep-CAM/EGP40) and its role in GA733-mediated homotypic cell-cell adhesion. *J Biol Chem.* 2001;276(3):2299-309.
- Tsubura A, Senzaki H, Sasaki M, Hilgers J, Morii S. Immunohistochemical demonstration of breast-derived and/or carcinoma-associated glycoproteins in normal skin appendages and their tumors. *J Cutan Pathol.* 1992;19(1):73-9.
- Tsuchida T, Kijima H, Tokunaga T, Oshika Y, Hatanaka H, Fukushima Y, Abe Y, Kawai K, Yoshida Y, Miura S, Yamazaki H, Tamaoki N, Ueyama Y, Nakamura M. Expression of the thrombospondin 1 receptor CD36 is correlated with decreased stromal vascularisation in colon cancer. *Int J Oncol.* 1999;14(1):47-51.
- Tuyns AJ, Esteve J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, Boffetta P, Crosignani P, del Moral A, Lehmann W, et al. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer.* 1988;41(4):483-91.
- UICC. *TNM Classification of Malignant Tumours.* 5th Edition ed. John Wiley and Sons, New York, 1997.
- van de Wiel-van Kemenade E, Ligtenberg MJ, de Boer AJ, Buijs F, Vos HL, Melief CJ, Hilkens J, Figdor CG. Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction. *J Immunol.* 1993;151(2):767-76.
- van Dongen GA, Brakenhoff RM, ten Brink CT, van Gog FB, de Bree R, Quak JJ, Snow GB. Squamous cell carcinoma-associated antigens used in novel strategies for the detection and treatment of minimal residual head and neck cancer. *Anticancer Res.* 1996;16(4C):2409-13.
- Velders MP, van Rhijn CM, Briaire IH, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SV. Immunotherapy with low and high affinity monoclonal antibodies 17-1A and 323/A3 in a nude mouse xenograft carcinoma model. *Cancer Res.* 1995;55(19):4398-403.
- Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 1993;328(3):184-94.
- Von Hoff DD. Head and Neck Cancer. In: Stein JH (Hrsg). *Internal Medicine.* Mosby-Year Book, 1994: 943-947.
- Weiner LM, Harvey E, Padavic-Shaller K, Willson JK, Walsh C, LaCreta F, Khazaeli MB, Kirkwood JM, Haller DG. Phase II multicenter

- evaluation of prolonged murine monoclonal antibody 17-1A therapy in pancreatic carcinoma. *J Immunother.* 1993;13(2):110-6.
- Wirtschaffter A, Benninger MS, Moss TJ, Umiel T, Blazoff K, Worsham MJ. Micrometastatic tumor detection in patients with head and neck cancer: a preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128(1):40-3.
- Wollenberg B, Kastenbauer, Mundl H, Schaumberg J, Mayer A, Andratschke M, Lang S, Pauli C, Zeidler R, Ihrler S, Lohrs, Naujoks K, Rollston R. Gene therapy--phase I trial for primary untreated head and neck squamous cell cancer (HNSCC) UICC stage II-IV with a single intratumoral injection of hIL-2 plasmids formulated in DOTMA/Chol. *Hum Gene Ther.* 1999;10(1):141-7.
- Zaloudik J, Basak S, Nesbit M, Speicher DW, Wunner WH, Miller E, Ernst-Grotkowski C, Kennedy R, Bergsagel LP, Koido T, Herlyn D. Expression of an antigen homologous to the human CO17-1A/GA733 colon cancer antigen in animal tissues. *Br J Cancer.* 1997;76(7):909-16.
- Zeidler R, Mysliwietz J, Csanady M, Walz A, Ziegler I, Schmitt B, Wollenberg B, Lindhofer H. The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. *Br J Cancer.* 2000;83(2):261-6.
- Zeidler R, Reisbach G, Wollenberg B, Lang S, Chaubal S, Schmitt B, Lindhofer H. Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *J Immunol.* 1999;163(3):1246-52.
- Zorzos J, Zizi A, Bakiras A, Pectasidis D, Skarlos DV, Zorzos H, Elemenoglou J, Likourinas M. Expression of a cell surface antigen recognized by the monoclonal antibody AUA1 in bladder carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur Urol.* 1995;28(3):251-4.

Teile aus dieser Arbeit wurden im April 2003 veröffentlicht in:

Pauli C, Münz M, Kieu C, Mack B, Breinl P, Wollenberg B, Lang S, Zeidler R, Gires O. Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett.* 2003 Apr 10;193(1):25-32.

7 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Einteilung Schweregrade von TNM-Stadien nach UICC. Stadium I und II gelten als frühe Tumorstadien, die Stadien III und IV als fortgeschrittene Tumorstadien.

Tabelle 2: Monoklonale Antikörper (mAbs) und deren Bindungsregionen in der extrazellulären Domäne des EpCAM Proteins. Ein Großteil der mAbs reagiert mit einem der teilweise überlappenden Epitope in der ersten EGF-ähnlichen Wiederholung (1. EGF-like repeat).

Tabelle 3: Patienten- und Tumor-bezogene Daten der 60 untersuchten Patienten mit SCCHN. Aufgeführt sind Tumorlokalisierung und Patientenalter und das Tumorstadium nach TNM -Klassifikation und UICC. In der TNM-Kategorie ist angegeben, ob die Klassifizierung in T- und N-Stadien aufgrund histopathologischer Untersuchung oder klinisch („c“) vorgenommen wurde, „M0“ bezeichnet das Fehlen, „M1“ das Vorhandensein von Fernmetastasierung. (Rez.=Rezidiv, LK=Biopsie aus Halslymphknotenmetastase).

Tabelle 4: 60 Patienten mit SCCHN: Übersicht über die Verteilung der T- und N-Stadien in gegenseitiger Abhängigkeit. Große Primärtumoren (T3-4) waren meist mit fortgeschrittener Lymphknotenmetastasierung (N2b – N3) assoziiert.

Abbildung 1: Das GA733-2 Gen kodiert für das humane Transmembran-Glykoprotein EpCAM. Es ist auf der chromosomalen Region 4q lokalisiert und besteht aus 9 Exons (nach Linnenbach et al. 1993).

Abbildung 2: Die Struktur des EpCAM Moleküls. Das Polypeptid besteht aus 314 Aminosäuren. Die Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren an, die Kreise zeigen die N-Glykosilierungs-Stellen, die Rechtecke die einzelnen Domänen. (N=N-Terminus, SP=Signalpeptid, EGF=EGF-

ähnliche Wiederholung, TMD=Transmembran-Domäne, zyt.Dom.=Zytoplasmatische Domäne, C=C-Terminus, ZM=Zellmembran).

Abbildung 3: Untersuchung von EpCAM in verschiedenen Plattenepithelkarzinomen (Zelllinien) im Westernblot. Lysate aus den verschiedenen Zelllinien wurden in Konzentration und Proteinmenge angeglichen, die Proben durch vertikale Gelelektrophorese aufgetrennt und dann EpCAM mit Hilfe spezifischer Antikörper dargestellt. Wie an den Banden abzulesen, exprimierten alle Karzinome außer HeLa, die EpCAM-negativ ist, das Tumorantigen in Varianten mit unterschiedlichen Molekulargewichten zwischen 35 kDa und 42 kDa. (FaDu, PCI-1, PCI-13, HLAC-78 und Tu179 aus SCCHN; HCT-8 aus Kolonkarzinom; MCF-7 und SKBR3 aus Mammakarzinom; HeLa aus Zervixkarzinom)

Abbildung 4: Untersuchung von EpCAM auf Karzinomzellen aus N- bzw. O-Glykosylierung. Lysate aus der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie FaDu. FaDu-Zellen wurden mit Tunicamycin bzw. N-Galactosaminid (NaGal) inkubiert, anschließend lysiert und die Lysate in einheitlicher Proteinmenge und -konzentration in vertikaler Gelelektrophorese aufgetrennt, EpCAM mit Hilfe des spezifischen Antikörpers C215 im Westernblot zur Darstellung gebracht. Mit steigender Konzentration des N-Inhibitors dominierte die 37 kDa-Form von EpCAM, während die Inhibition der O-Glykosylierung keinen Einfluss auf das Molekulargewicht von EpCAM hatte.

Abbildung 5: Repräsentative Proben aus Schilddrüse und Tumorgewebe und gesundem Plattenepithel. Lysate der Proben wurden in Proteinmenge und -konzentration angeglichen, durch vertikale Gelelektrophorese aufgetrennt, EpCAM mit Hilfe spezifischer Antikörper im Westernblot dargestellt. In der Tumorprobe 1 aus Larynxkarzinom exprimiert der Tumor nur die glykosylierte 42 kDa-Variante von EpCAM, während die gesunde Schleimhaut kein EpCAM exprimiert. Die hier dargestellten Tumorproben präsentieren unterschiedliche

Glykosilierungsvarianten von EpCAM, die gezeigten Schilddrüsenproben dagegen zeigen unglykosilierte Proteinformen. (MUC = gesunde Schleimhaut aus oberem Aerodigestivtrakt; TU = Tumor; TH = Schilddrüsenewebe).

Abbildung 6: EpCAM wurde in Tumorproben aus SCCHN mit Hilfe spezifischer Antikörper markiert und im Immunblot dargestellt. Gezeigt sind unterschiedliche Varianten der Glykosilierungsmuster und verschiedene Formen unterschiedlich stark ausgeprägter Glykosilierung.

Abbildung 7: Verteilung der EpCAM Glykosilierung innerhalb von 44 Tumorproben aus SCCHN. In der Hälfte der Proben lag die ausgeprägte Glykosilierungsform von EpCAM vor, es dominierten die 40 bzw. 42 kDa-Form von EpCAM. In annähernd einem Viertel der Fälle ließ sich die mittelgradig und schwach glykosilierte Form nachweisen.

Abbildung 8: Verteilung der EpCAM-Glykosilierung innerhalb von 30 Schilddrüsenproben aus SCCHN. In 2/3 der Proben war EpCAM unglykosiliert (-) , in etwa 1/4 der Fälle lag die geringgradige Glykosilierungsform von EpCAM vor (+) und in nur 2/30 Proben die Variante mit mittelgradiger Glykosilierung (+). In keiner Schilddrüsenprobe war die stark glykosilierte Form von EpCAM (+++) anzutreffen.

Abbildung 9: Verteilung geringgradiger (-/+) und höhergradiger (++) Glykosilierungsvarianten in Schilddrüsen- und Tumorproben. Schilddrüsenepithel zeigte vor allem die nicht- oder nur mäßiggradig glykosilierte Variante und in keinem Fall hochgradig glykosiliertes EpCAM. Die Tumorproben boten ein umgekehrtes Muster mit vorwiegend stark und auch mittelgradig glykosiliertem EpCAM, in keiner Tumorprobe war EpCAM unglykosiliert.

Abbildung 10: EpCAM-Glykosilierung in Gegenüberstellung von Tumorproben vs. Schilddrüsenproben aus 27 autologen Probenpaaren aus Patienten mit SCCHN. Es zeigt sich ein inverses Glykosilierungsmuster mit vorwiegend fehlender und geringgradiger

Glykosilierung im Schilddrüsengewebe und Überwiegen der höheren Glykosilierungsgrade im Tumorgewebe.

Abbildung 11: EpCAM-Glykosilierung - Vergleich Tumorproben vs. Schilddrüsenproben innerhalb der einzelnen autologen Paare TU/SD aus SCCHN (n = 27). In über 80 % der autologen Paare zeigt das Tumorgewebe eine höhere Glykosilierungsform als die Schilddrüsenprobe.

Abbildung 12: Gewebeproben aus gesunder Kolonschleimhaut (Proben 1 und 2) und autologe Probenpaare aus Kolonkarzinom und benachbarter gesunder Kolonschleimhaut (Proben3-8). Nach Lysierung wurden Proteinmengen und –konzentrationen angeglichen und EpCAM mit Hilfe spezifischer Antikörper im Westernblot dargestellt. Die gezeigten Proben aus gesunder Mukosa exprimieren unglykosilierte Formen von EpCAM (Proben Nr. 1, 2, 3 und 5), in den Gewebeproben aus Karzinomen dagegen ist EpCAM hyperglykosiliert (Proben Nr. 6 und 8).

Abbildung 13: Geschlechterverteilung der 60 Patienten mit SCCHN. Der überwiegende Anteil der Patienten waren Männer (97 %), nur zwei Untersuchte (3 %) waren Patientinnen.

Abbildung 14: Altersverteilung der 60 Patienten mit SCCHN. Über die Hälfte der Patienten erkrankte im sechsten Dezennium (52 %), dreißig Prozent im siebten Lebensjahrzehnt.

Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung der Tumorlokalisation der 60 Patienten mit SCCHN. Die häufigste Primärtumorlokalisation war mit 40 % der Larynx, gefolgt von Hypopharynx (30 %) und Oropharynx (23 %).

Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung der T-Kategorie der 60 Patienten mit SCCHN. Bei 72 % der Patienten lag bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium (T3, T4 oder Tx) vor.

Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung der N-Kategorie der 60 Patienten mit SCCHN. In zwei Drittel der Fälle hatte bereits Halslymphknotenmetastasierung stattgefunden.

Abbildung 18: Häufigkeitsverteilung der M-Kategorie der 60 Patienten mit SCCHN. Bei drei Patienten bestand Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose.

Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung der UICC-Stadien der 60 Patienten mit SCCHN: In 88 % der Fälle bestand ein fortgeschrittenes Tumorstadium (UICC III-IV).

Abbildung 20: Verteilung des histologischen Differenzierungsgrad der 60 Patienten mit SCCHN. Mit 70 % wies der überwiegende Anteil der untersuchten Plattenepithelkarzinome eine geringgradige Differenzierung (G3) auf.

Abbildung 21: Verteilung der Glykosilierungsgrade: Fehlende Lymphknotenmetastasierung (N0) vs. vorhandene Lymphknotenmetastasierung (N+). Es besteht eine gleichmäßige Verteilung der verschiedenen Glykosilierungsstufen innerhalb der verschiedenen Lymphknotenstadien.

Abbildung 22: Verteilung der Glykosilierungsstärke: Frühe Tumorstadien (T1-2) vs. fortgeschrittene Tumorstadien (T3-4/Tx). Es besteht eine insgesamt ausgeglichene Verteilung der unterschiedlichen Glykosilierungsstärken in Früh- und Spätstadien.

8 Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-Fetoprotein
bsAb	bispezifischer Antikörpern
CAM	Zelluläres Adhäsionsmolekül
CEA	Karzinomembryonales Antigen
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CKS 1	Cyclin-abhängige Kinase
CUP	Carcinoma of unknown primary
Diff. Grad	Differenzierungsgrad
EpCAM	<u>E</u> pithe <u>l</u> iales <u>c</u> elluläres <u>A</u> dhäsions <u>m</u> olekül
EGF	epidermal growth factor.
EGP-1/Trop-2	epitheliales Glykoprotein 1
EGP 40	epitheliales Glykoprotein 40
ESA	Epithelial surface antigen
Fc γ -R	Fc-gamma-Rezeptor
Glox I	Glyoxalase I
kDa	Kilodalton
ITIMs	immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motifs
LAIR	Leukozyten-assoziiertes Immunoglobulin-ähnlicher Rezeptor
LK	Lymphknoten
mAbs	monoklonalen Antikörpern
min	Minute
ml	Milliliter
mrd	minimal residual disease
MUC	gesunde Schleimhaut aus oberem Aerodigestivtrakt
μ g	Mikrogramm
N0	Fehlen von Halslymphknotenmetastasierung
N+	Vorhandene Halslymphknotenmetastasierung
n	Anzahl

NaGal	N-Galactosaminid
Pat.Nr.	Patientennummer
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinasen
Rez.	Rezidiv
SCC	squamous cell carcinoma
SCCHN	squamous cell carcinoma of head and neck
SD-Probe	Schilddrüsenprobe
SDS	Dodecylsulfate Na-salt
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylendiamin
TGF- β	tumor growth factor beta
TU	Tumor
TU/SD	autologes Probenpaar aus Tumor und Schilddrüse
U/min	Umdrehungen pro Minute

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denen bedanken, die zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. med. Kastenbauer danke ich für die großzügige Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Frau Professor Dr. med. Wollenberg und Herrn Dr. rer. nat. Olivier Gires danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für kritische und unterstützende Diskussionen. Herrn Dr. rer. nat. Olivier Gires danke ich für die stets hilfsbereite und geduldige und immer freundliche Unterstützung in praktischen und theoretischen Fragen und für die angenehme Arbeitssphäre im HNO-Forschungslabor.

Danken möchte ich Herrn Cuong Kieu, Frau Bärbel Schmitt, Frau Tanja Hofmann und Frau Tanja Krug, Herrn Dr. Christof Pauli und Herrn Dr. Markus Münz und allen weiteren Mitarbeitern und Mit-Doktoranden des Labors, die das positive, kollegiale und produktive Arbeitsklima mitbestimmt haben und ohne die das Entstehen meiner Arbeit in dieser Weise nicht möglich gewesen wäre.

Mein herzlicher Dank gilt nicht zuletzt meiner Chefärztin Frau Dr. med. Irene Faas und meinem Vater Dr. Helmar Breinl, die meine wissenschaftlichen Ambitionen stets wohlwollend unterstützten und mich zu motivieren wußten. Da diese Dissertationsarbeit parallel zu meiner beruflichen Tätigkeit entstand, war ich während dieser Zeit auf das Entgegenkommen und Verständnis meines beruflichen und familiären Umfeld angewiesen. Besonders Dank sagen möchte ich daher meiner Familie und insbesondere meiner lieben Frau Susanne, die mir den nötigen Rückhalt damit wesentliche Unterstützung gegeben hat. Ein ganz herzliches Dankeschön schließlich gilt Frau Susanne Brunnhölzl, die mir unermüdlich mit großer Kompetenz und viel Freude und Engagement bei der Formatierung der Arbeit zur Seite stand und die immer ein aufmunterndes Wort für mich übrig hatte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Peter Franz Richard B r e i n l
Geburtsdatum: 11.03.1963
Geburtsort: München
Wohnort: Lärchenstr. 7, 82166 Gräfelfing

Schulbildung

1969 – 1974 Grund- und Hauptschule in Lochham bei München
1974 – 1984 Johann-Michael-Sailer-Gymnasium in
Dillingen/Donau
(Abitur am 29.06.1984)

Studium

Okt. 1986 – Mai 1987 1. Studienjahr Humanmedizin Universität Genua,
Italien
Mai 1987 – Mai 1989 Vorklinischer Studienabschnitt an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Mai 1989 – April 1993 Klinischer Studienabschnitt an der
Freien Universität Berlin
(III. Staatsexamen am 08.04.1993)

Beruflicher Werdegang

Mai 1993 - Oktober 1994 Arzt im Praktikum in der Chirurgie des Kranken-
hauszweckverbands Kaufbeuren
(Ärztliche Approbation 01.11.1994)
Nov. 1994 – Mai 2000 Weiterbildung zum Hals-Nasen-Ohren-Arzt im
Kreiskrankenhaus München-Pasing
(Facharztprüfung am 11.05.2000)
Seitdem als HNO-Arzt weiterhin an der Kreisklinik München-Pasing tätig.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.