

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern
der Ludwig Maximilians Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K.W. Jauch

**Expression des Urokinase-Systems bei Magenkarzinomen
– Bestätigung der prognostischen Bedeutung in einer
unabhängigen Patientenserie und erstmaliger Nachweis
einer Relevanz in präoperativen Biopsien und Metaplasien**

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

Vorgelegt

von

Bianka Beyer

aus

Nabburg

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Heike Allgayer, PhD

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. St. Braud

Prof. Dr. K. Hallfeldt

Mitbetreuung durch
den promovierten
Mitarbeiter

Prof. Dr. med. Heike Allgayer, PhD

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen
Prüfung: 20.12.2007

| | |
|---|-----------|
| 1. EINFÜHRUNG | 7 |
| 1.1. DAS MAGENKARZINOM..... | 7 |
| 1.2. STRUKTUR UND FUNKTIONSKREISLAUF DES UROKINASESYSTEMS | 8 |
| 1.2.1. UROKINASE (U-PA)..... | 9 |
| 1.2.2. UROKINASEREZEPTOR (U-PAR)..... | 9 |
| 1.2.3. INHIBITOREN (PAI-1 UND PAI-2) | 11 |
| 1.2.4. DER UROKINASEZYKLUS..... | 11 |
| 1.2.5. DAS UROKINASESYSTEM ALS ZENTRUM DER PROTEASENINTERAKTION | 13 |
| 1.3. BISHERIGE STUDIEN ZUR EXPRESSION DES UROKINASE-SYSTEMS DER EIGENEN ARBEITSGRUPPE..... | 15 |
| 1.4. FRAGESTELLUNG UND STUDIENKONZEPT DER VORLIEGENDEN DISSERTATION | 15 |
| 2. PATIENTEN, MATERIALIEN UND METHODEN..... | 16 |
| 2.1. CHARAKTERISIERUNG DES PATIENTENGUTES | 16 |
| 2.1.1 ZUSAMMENSETZUNG DES KOLLEKTIVES..... | 16 |
| 2.1.2. PRÄOPERATIVES STAGING | 17 |
| 2.1.3. TUMORKLASSIFIKATION | 17 |
| 2.1.4. OPERATIONSCHARAKTERISTIKA | 22 |
| 2.2. KLINISCHE NACHBEOBACHTUNG..... | 25 |
| 2.3. MATERIAL UND METHODEN | 26 |
| 2.3.1. DURCHFÜHRUNG DER INTRAOPERATIVEN GEWEBEGEWINNUNG..... | 26 |
| 2.3.2. GEWESSPRÄPARATION, AUFBEWAHRUNG UND ANFERTIGUNG VON KRYOSCHNITTEN | 27 |
| 2.4. IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DES UROKINASESYSTEMS ANHAND VON U-PAR, U-PA UND PAI-1 IN NORMAL- UND TUMORGEWEBE DER INTRAOPERATIV GEWONNEN PRÄPARATE .. | 28 |
| 2.4.1. GEWINNUNG..... | 28 |
| 2.4.2. AUFARBEITUNG..... | 28 |
| 2.5. IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DES UROKINASESYSTEMS ANHAND VON U-PAR, U-PA UND PAI-1 IN NORMAL- UND TUMORGEWEBE DER PRÄOPERATIV BIOPTISCH GEWONNEN BIOPSIEN UND METAPLASIEN | 29 |
| 2.5.1. GEWINNUNG..... | 29 |
| 2.5.2. AUFARBEITUNG..... | 30 |
| 2.6. GEWINNUNG UND AUFARBEITUNG DER KNOCHENMARKSASPIRATE..... | 30 |
| 2.6.1. GEWINNUNG..... | 30 |
| 2.6.2. AUFARBEITUNG..... | 31 |
| 2.7. IMMUNCYTOCHEMISCHE EINFACH- UND DOPPELFÄRBUNG | 31 |
| 2.7.1. EINFACHFÄRBUNG | 31 |
| 2.7.2. DOPPELFÄRBUNG..... | 33 |
| 2.8. KONTROLLEN..... | 34 |
| 2.9. TUMORZELLKULTUREN ZU DEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN | 35 |
| 2.10. BESTIMMUNG DER HELICOBACTER PYLORI-INFEKTION..... | 35 |
| 2.11. STATISTISCHE AUSWERTUNGEN..... | 35 |
| 2.11.1. ELEMENTARE STATISTIKEN UND AUZFÄHLUNGEN..... | 36 |
| 2.11.2. GRUPPENVERGLEICH | 36 |
| 2.11.3. Regression..... | 35 |
| 2.11.4. KAPLAN-MEIER-ANALYSE (ÜBERLEBENSANALYSE) | 37 |
| 2.11.5. UNI- UND MULTIVARIATE BERECHNUNG PROGNOTISCHER RISIKOFAKTOREN | 38 |
| 2.11.6. SIGNIFIKANZNIVEAU UND VERWENDETE PROGRAMME | 38 |
| 2.12. ZUSAMMENSETZUNG UND HERSTELLERNACHWEIS DER VERWENDETEN REAGENZIEN ... | 39 |
| 2.12.1. APPARATIVE EINRICHTUNGEN | 39 |
| 2.12.2. FÄRBESYSTEME/ FÄRBELÖSUNGEN..... | 39 |
| 2.12.3. ANTIKÖRPER..... | 39 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.12.4. | PUFFERLÖSUNGEN | 40 |
| 2.12.5. | MATERIALIEN ZUR ZELLKULTUR | 40 |
| 2.12.6. | CHEMIKALIEN..... | 41 |
| 3. | <u>ERGEBNISSE</u> | 42 |
| 3.1. | METHODISCHE ERGEBNISSE..... | 42 |
| 3.2. | ERGEBNISSE ZUM PATIENTENKOLLEKTIV..... | 45 |
| 3.2.1. | ALLGEMEINE ERGEBNISSE | 45 |
| 3.2.2. | ERGEBNISSE ZUR IMMUNHISTOCHEMIE | 48 |
| 3.3. | KORRELATION DES GESAMTKOLLEKTIVES MIT ETABLIERTEN TUMOR-CHARAKTERISTIKA, HELIKOBACTER PYLORI, DER INTESTINALEN METAPLASIE UND DEN DISSEMINIERTEN TUMORZELLEN IM KNOCHENMARK..... | 51 |
| 3.4. | UNIVARIATE BESTIMMUNG DER PROGNOSE DES U-PA-SYSTEMS IM GESAMTKOLLEKTIV . | 52 |
| 3.5. | MULTIVARIATE BESTIMMUNG DER PROGNOSE DES U-PA-SYSTEMS IM GESAMTKOLLEKTIV | 54 |
| 3.6. | KORRELATION DER AUSSAGEKRAFT PRÄOPERATIV GEWONNENER BIOPSIEN..... | 55 |
| 3.7. | BEDEUTUNG DER INTESTINALEN METAPLASIE IM TUMORNAHEN NORMALGEWEBE | 55 |
| 3.7.1. | KORRELATION DER INTESTINALEN METAPLASIE MIT ETABLIERTEN TUMOR- CHARAKTERISTIKA..... | 57 |
| 3.7.2. | KORRELATION DER INTESTINALEN METAPLASIE DIESES KOLLEKTIVES MIT DEM U-PA- SYSTEM, DER HELICOBACTER PYLORI INFEKTION UND DEN DISSEMINIERTEN TUMORZELLEN IM KNOCHENMARK | 57 |
| 3.7.3. | PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG DES AUFTRETENS VON HELICOBACTER PYLORI UND INTESTINALEN METAPLASIEN | 58 |
| 3.7.4. | DIE KORRELATION UND PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG DES U-PA-SYSTEMS IN DER INTESTINALEN METAPLASIE | 60 |
| 4. | <u>DISKUSSION.....</u> | 65 |
| 4.1. | DISKUSSION METHODISCHER FRAGESTELLUNGEN..... | 65 |
| 4.2. | UNTERMAUERUNG DES STELLENWERTES DES UROKINASESYSTEMS ALS PROGNOSTISCHER PARAMETER | 67 |
| 4.3. | AUSSAGEKRAFT PRÄOPERATIV DURCHGEFÜHRTER BIOPSIEN | 70 |
| 4.4. | MÖGLICHE BEDEUTUNG DER HELICOBACTER INFEKTION IN DER KARZINOGENESE | 72 |
| 4.5. | BESONDERHEIT DER INTESTINALEN METAPLASIE..... | 73 |
| 4.6. | KORRELATION DES U-PA-SYSTEMS IM PRIMÄRTUMOR MIT U-PAR AUF DISSEMINIERTEN TUMORZELLEN IM KNOCHENMARK..... | 75 |
| 4.7. | SCHLUSSFOLGERUNG | 77 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT | 78 |
| 6. | <u>ABKÜRZUNGEN.....</u> | 80 |
| 7. | <u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u> | 81 |
| 8. | <u>ANHANG / FARBTAFELN.....</u> | 92 |
| 9. | <u>DANKSAGUNG.....</u> | 95 |
| 10. | <u>CURRICULUM VITAE.....</u> | 96 |
| 11. | <u>PUBLIKATIONEN</u> | 99 |

1. Einführung

Beginn des Endes

Ein Punkt nur ist es, kaum ein Schmerz,
nur ein Gefühl, empfunden eben;
und dennoch spricht es stets darein,
und dennoch stört es dich zu leben.

Wenn du es ändern klagen willst,
so kannst du's nicht in Worte fassen.
Du sagst dir selber: „Es ist nichts!“
Und dennoch will es dich nicht lassen.

So seltsam fremd wird dir die Welt,
und leis verläßt dich alles Hoffen,
bis du es endlich, endlich weißt,
dass dich des Todes Pfeil getroffen.

(Theodor Storm)

Krebs, von Theodor Storm hier in seinem Todeskampf (†4.7.1888) mit dem Magenkrebs in Gedichtform beschrieben, gab es zu aller Zeit, und er macht keinen Unterschied zwischen bekannten und unbekanntem Persönlichkeiten. Storm beschreibt in seiner ausgefeilten Prosa mit pathetischen Worten genau die Symptomatik mit unklaren, leicht drückenden, kontinuierlich bestehenden Oberbauchschmerzen, die viele Patienten mit einem Magenkarzinom zum Arzt führt.

Diese eher geringen Symptome erklärt auch, dass Patienten häufig erst im sehr fortgeschrittenen Stadium einen Arzt aufsuchen.

1.1. Das Magenkarzinom

Im Unterschied zu vielen anderen malignen Erkrankungen nimmt die Inzidenz des Magenkarzinoms in den letzten 20 Jahren weltweit ab. Die Ursache hierfür ist bisher nicht ganz klar, aber am ehesten auf veränderte Ernährungsgewohnheiten zurückzuführen. Es ist aber weiterhin der sechshäufigste Tumor in Europa und der zweithäufigste Tumor des Gastrointestinaltraktes. Das Verständnis über die Pathogenese des Magenkarzinoms hat in den letzten Jahren abhängig vom Untertypen besonders für den intestinalen Subtyp nach

Laurén zugenommen. Das Modell von Correa et al postuliert einen prolongierten, präkanzerösen Mechanismus, bei dem sich die Magenschleimhaut zunächst vom gesunden Ausgangszustand langsam in eine chronische Gastritis verändert. Dies mündet dann über eine multifokale Atrophie in eine intestinale Metaplasie, die zur Dysplasie führt und sich schließlich zu einem invasiven Karzinom entwickelt. Bei diesem langjährigen Prozeß spielen chronische externe wie interne Noxen – beispielsweise *Helicobacter pylori* – als Risikofaktoren eine entscheidende Rolle. Zudem treten Faktoren wie Malnutrition sowie Rauchen als weitere Faktoren hinzu, welche ebenfalls das Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms erhöhen.

In der Entwicklung eines Magenkarzinoms, ähnlich wie fast bei allen malignen Tumoren verläuft der Entwicklungsprozeß über mehrere Stufen. Der Zeitraum bis zur klinischen Manifestation dauert je nach Tumorart unterschiedliche Zeiträume. Beim Tumorprogress können sich einzelne Tumorzellen aus dem Gewebeverband lösen und das invasive Stadium mit einer Invasion in benachbarte Gewebe beginnen. Kommt es in diesem Zusammenhang zum Einbruch des Tumors in das Gefäßsystem, so gelangen sie über Blut und Lymphe in fernliegende Gewebe und Organe (Metastasierung) (Townsend et al 2001).

Neben dem makroskopisch, visualisierbaren Tumor gibt es Mikrometastasen (Tumorzellansammlungen von 0,2 mm bis 2 mm Durchmesser) und hierunter die sogenannte Minimale Residuelle Erkrankung (MRD) (Allgayer et al 1995). Letztere wird durch einzelne Tumorzellen oder Tumorzellverbände mit einer Größe von weniger als 0,2 mm charakterisiert, welche in verschiedenen Organsystemen nachgewiesen werden können. Dazu zählen Lymphknoten, Blut, Aszites, Pleuraerguß und Knochenmark. Hier findet sich die besondere Bedeutung des Urokinase-Systems mit den unterschiedlichen Faktoren (u-PA, u-PAR und PAI-1) als Marker, die jeweils in spezieller Form in allen Stadien an Bedeutung gewinnen.

1.2. Struktur und Funktionskreislauf des Urokinasesystems

Die Besonderheit von Tumorzellen besteht in ihrer Fähigkeit, die extrazelluläre Matrix (EZM) ihres Gewebes verlassen zu können und nach Durchdringung von Basalmembranen in benachbarte Gewebestrukturen einzudringen. Für die Invasion als auch die Migration von malignen Zellen ist der proteolytische Abbau von Bestandteilen der Basalmembran und der EZM notwendig. In den verschiedenen Phasen von Embryogenese und auch der Wundheilung regulieren normale Zellen die physiologischen Wachstums- und Modifikationsprozesse. Dies erfolgt über die Aktivität von zum Abbau der EZM befähigter Proteasen. Im Gegensatz dazu sind maligne Zellen zur verstärkten Sekretion von inaktiven Vorstufen dieser Proteasen in der Lage, die dann im weiteren Verlauf durch Proteolyse in die aktiven Formen überführt werden. Hierzu gehören verschiedene Klassen von Proteasen, wie z.B. die Serinproteasen (Plasmin, u-PA und tPA), Matrixmetalloproteasen (MMP-2, Kollagenasen usw.) oder Cysteinproteasen (Kathepsin B, H und L) (Johnsen M. et al 1998). Das Urokinasesystem aus der Gruppe der

Serinproteasen ist eines der daran hauptsächlich beteiligten Systeme. Es besteht aus verschiedenen miteinander agierenden Faktoren (u-PAR, u-PA, PAI-1 und PAI2), wobei der Urokinase-Rezeptor (u-PAR) als ein Zelloberflächenrezeptor zentral die Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen mit aktiviert.

1.2.1. Urokinase (u-PA)

U-PA (inaktives u-PA) ist eine Serinproteinase mit einem Molekulargewicht von 55 000. Sie besteht aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten, zusammengesetzt aus einer C-terminalen Serinproteinasen-Domäne und einer N-terminalen A-Kette, welche eine Kringle- und Wachstumsfaktordomäne enthält (Becker K. et al 1997).

Frisch synthetisiertes, noch inaktives u-PA wird von der Tumorzelle als eine Einzelkette aus Polypeptiden (55 kDa), als sogenanntes pro-u-PA gebildet. Nach ihrer Sekretion bindet pro-u-PA mit hoher Affinität an ihren spezifischen Rezeptor (u-PAR) und wird daraufhin durch Plasmin zu u-PA (zweikettig) aktiviert (Conese M. et al 1995, Pappot H. et al 1995). An der Aktivierung von pro-u-PA zu u-PA können noch einige weitere Proteasen mittelbar oder unmittelbar beteiligt sein, wie zum Beispiel: Plasmakallikrein, Trypsin, Thermolysin, Faktor IIa, Cathepsin B/G/L u.s.w (Ichinose A. et al 1986, Learmonth M.P. et al 1992, Marcotte P. et al 1993).

1.2.2. Urokinaserezeptor (u-PAR)

U-PAR (Vassalli J.D. et al 1985) wird an der Zellmembran expremiert und besitzt eine hohe Bindungsaffinität für die A-Kette von u-PA und pro-u-PA. Pro-u-PA und u-PA binden mit der gleichen Affinität an u-PAR.

U-PAR-cDNA wurde aus menschlichem Gewebe geklont (Roldan A.L. et al 1990) und ist ein cysteinreicher, glykolisierter Zelloberflächenrezeptor. Er wird als Polypeptid von 335 Aminosäuren synthetisiert und über einen Processing-Mechanismus unter Abspaltung eines hydrophoben Anteils und Bindung einer Glycolipidstruktur, dem GPI-Anker in den biologisch aktiven Rezeptor überführt (Ploug M. et al 1991, Plesner T. et al 1997, Blasi F. et al 1990). Dieser aktive Rezeptor kann an der Zellmembran sitzen, oder in löslicher Form (su-PAR) sezerniert werden; als solcher wird er auch im Serum bei Krebspatienten gefunden (Kristensen P. et al 1991, Pyke C. et al 1993). u-PAR besitzt 3 Domänen (I, II und III), wobei für die Bindung von u-PA die Domäne I entscheidend ist. Bei einer Schädigung der Domänen II und III konnte zusätzlich eine Reduktion der Bindungsfähigkeit für u-PA demonstriert werden (Ploug M. et al 1991). (siehe Abbildung 1.)

Neben u-PA und pro-u-PA vermag u-PAR auch noch andere Proteine zu binden und Interaktionen einzugehen; unter diesen befinden sich Vitronectin und Integrine. PAI-1, der

wesentliche u-PA-Inhibitor (siehe folgendes Kapitel) inhibiert eine Bindung von u-PAR an Vitronectin.

Die Integrin-u-PAR-Wechselwirkung, sowie die Interaktion mit Vitonektin sind entscheidend für eine Teilnahme des GPI-gebundenen u-PAR an der Regulation von Adhäsion, Migration und Signaltransduktion. Da die Familie der Integrine Oberflächenproteine darstellen, die an der Zell-Zell- und Zell-Martix-Adhäsion, der Immunabwehr und der Tumorprogression teilnehmen (z.B. Neoangiogenese), vermittelt sie eine direkte Funktionalität des Urokinasesystems mit wichtigen Teilfunktionen für die Metastasierung.

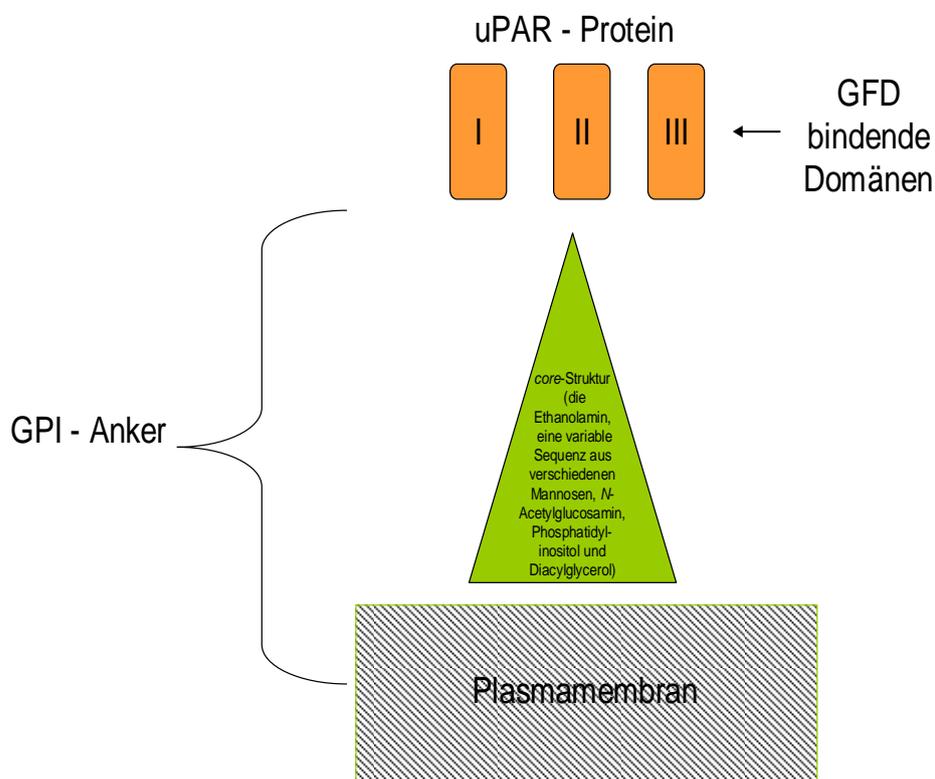


Abb.1.: u-PAR als Schema. Dargestellt ist der GPI – Anker ausgehend von der Plasmamembran, sowie die drei bindenden Domänen

1.2.3. Inhibitoren (PAI-1 und PAI-2)

PAI-1 und PAI-2 sind die wesentlichen u-PA Inhibitoren (zusätzlich zu Protease-Nexin1 und Protein C Inhibitor). Sie gehören der Familie der Serpine (Serpineproteasen) an. Beide Inhibitoren binden sowohl an freies als auch an rezeptorgebundenes u-PA (Carrell R.W. et al 1996, Gils A. et al 1998).

PAI-1 ist ein einkettiges Glycoprotein von 50 kDa, das in seiner aktiven Form von verschiedenen Zellen sezerniert wird (z.B. Endothelzellen, Blutplättchen, aber auch verschiedenen Tumorzellen). Diese aktive Form ist in ihrem Bestand nur metastabil. In vivo wird eine biologische Stabilisierung durch eine Bindung mit Vitronectin erzielt. Die Adhäsionsfähigkeit von Vitronectin wird damit jedoch nicht beeinflusst. In aktiver Form vermag PAI-1 u-PA zu inhibieren, in dem es mit u-PA einen Komplex eingeht (Egelund R. et al 1998), der jedoch nicht an Vitronectin binden kann.

PAI-2 kommt in zwei verschiedenen Formen vor. Zum einen als 47 kDa schweres intrazelluläres Protein, zum anderen als 58-60 kDa glycolisiertes extrazelluläres Glycoprotein, das von Phagozyten und in verschiedenen Tumorzellen produziert und sezerniert wird (Kruithof E.K. et al 1986, Cajot J.F. et al 1986).

PAI-2 bindet ebenfalls über einen Inhibitoren-Proteasen-Komplex an u-PA, besitzt aber gegenüber PAI-1 eine deutlich höhere Stabilität.

1.2.4. Der Urokinasezyklus

Die Krebsinvasion und Metastasierung ist ein komplexer Prozess, in deren Zentrum die Proteolyse der extrazellulären Matrix (EZM) bestehend aus einer Vielzahl von Faktoren (z.B. Nektin, Vitronectin, Laminin) eine Schlüsselrolle spielt.

Die Proteolyse entsteht aus der Interaktion einer großen Anzahl von Enzymsystemen; einer Reihe von Serin und Serpinproteasen, dem Urokinasesystem, verschiedenen Subtypen der Kollagenase IV, weiteren Metalloproteinasen und anderen extrazellulären Enzymen. In verschiedensten Studien konnten Hinweise auf eine Aktivierung dieser Enzymsysteme bei der Tumorprogression, speziell durch die tumorbedingte Expression des Urokinasesystems erbracht werden (Allgayer H. et al 1995, Blasi F. et al 1988, Blasi F. et al 1993, Blasi F. et al 1997, Pappot H. et al 1995, Danó K. et al 1985, Danó K. et al 1994). In diesen Studien wird eine entscheidende Rolle des Urokinasesystems bei der Zellinvasion und Metastasierung beschrieben, dies insbesondere durch Promotion der extrazellulären Proteolyse, der Zelladhäsion und der Chemotaxis.

Diese proteolytischen Enzymsysteme sind jedoch auch beim Gewebsumbau unter nicht-malignen Bedingungen beteiligt. Die Hauptunterschiede bestehen wahrscheinlich in einer defekten Regulation dieser Prozesse bei maligner Umwandlung (Liotta L.A. et al 1991, Pöllänen J. et al 1991).

Das Urokinasesystem als Zentrum dieser Prozesse entspricht einer komplexen Kaskadenreaktion: dem Urokinasezyklus:

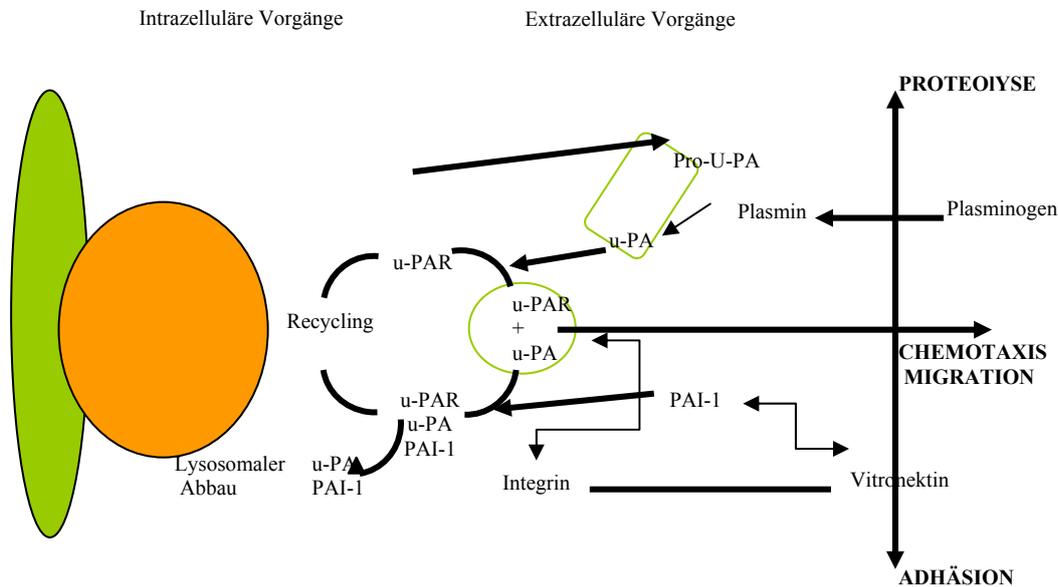


Abb.2.: Der u-PA-u-PAR-PAI-1-Zyklus: Interaktion des Zyklus mit der Zellinvasion, Migration, Adhäsion und Chemotaxis

In einer Kombination aus intrazellulären und extrazellulären Vorgängen aktiviert sich das Urokinasesystem. Dies führt in einer Aktivierungskaskade zur perizellulären Proteolyse. Ausgangspunkt der proteolytischen Kaskade ist die Aktivierung des Plasminogens zu Plasmin, entweder in rezeptor-gebundener oder freier Form, wobei u-PAR die proteolytische Aktivität auf die Zelloberfläche konzentriert. Additiv ist pro-u-PA wiederum ein Substrat von Plasmin und führt somit durch eine positive Rückkopplung zu einer Potenzierung der proteolytischen Aktivität.

Sowohl für den invasiven Prozess als auch für die Migration maligner Zellen ist der proteolytische Abbau von Teilen der Basalmembran und der EZM erforderlich. In Interaktion von u-PA und u-PAR mit Vitronectin und Integrinen kommt es zur Steigerung der Affinität von u-PA zum Substrat und der Bindung von u-PA-PAI-1 Komplexen.

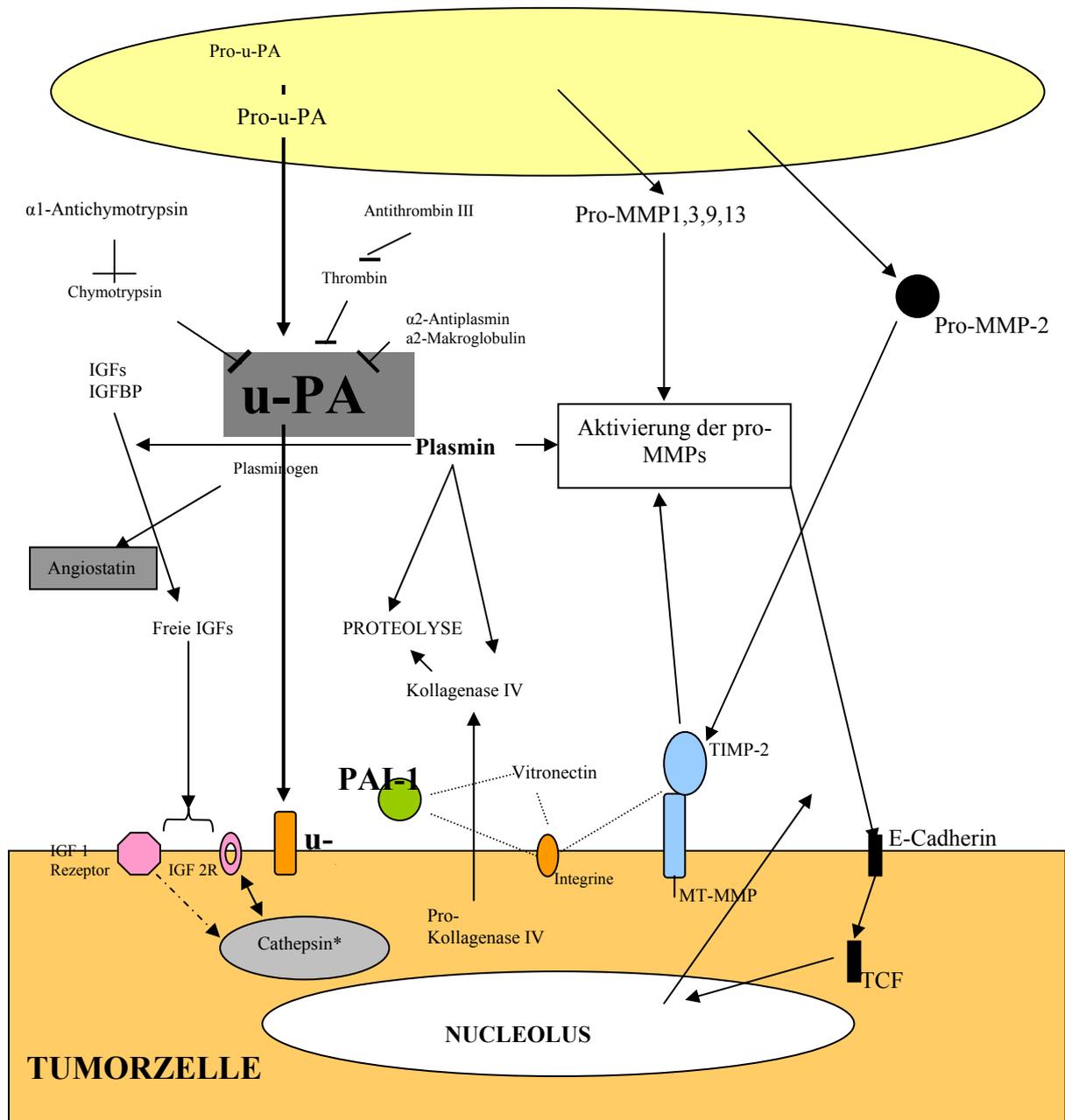
Hohe Konzentrationen von PAI-1 führen durch Bindung an u-PA zur Internalisierung des u-PA-u-PAR-PAI-1 Komplexes, was gleichzeitig zu einer gesteigerten Zellproliferation führt. Die Inhibition der proteolytischen Aktivität durch PAI-1 ermöglicht der Zelle dann eine bessere Anheftung an die extrazelluläre Matrix und damit eine Migration. Durch Endocytose wird der Komplex internalisiert, aufgeführt und es entsteht wieder ein freier Urokinaserezeptor.

1.2.5. Das Urokinasesystem als Zentrum der Proteaseninteraktion

Proteasen ermöglichen durch die Proteolyse der extrazellulären Matrix den Ausbruch aus dem lokalen Zellverband. Die Tumorzelle wird hierfür durch normale Stromazellen (Fibroblasten, inflammatorische Zellen, Gefäßendothelien) unterstützt, welche während der Tumorprogression zur Produktion von Proteasen, Inhibitoren und Wachstumsfaktoren angeregt werden. In der Tat kommen mehr Proteasen von umliegenden Stromazellen (Tumorgewebezellen, Fibroblasten und Endothelzellen), als von den malignen Zellen selbst (Pyke C. et al 1993).

Abbildung (3) zeigt die Interaktionen der zwei führenden Proteasensysteme zwischen Tumorgewebe und Tumorzelle, die für die meisten proteolytischen und invasiven Vorgänge entscheidend sind. Dies sind das Urokinasesystem (Schwerpunkt dieser Doktorarbeit) und die Matrixmetalloproteinasen (MMPs). u-PA und MMP werden in inaktiven Vorstadien produziert und ausgeschüttet, ihre Aktivierung finden sie daraufhin an der Oberfläche von Tumorzellen. Diese Enzyme sind auch beteiligt an der Neubildung von Gefäßen (Tumorangiogenese), um dem Tumorwachstum Metabolite und Sauerstoff zuzuführen. Der u-PA-Rezeptor besitzt zusätzlich chemotaktische, adhaesive und Signalfähigkeiten (Pappot H. et al 1995, Conese M. et al 1995), die die Proliferation von Tumorzellen und anderen Phänomenen anregt (Aguirre-Ghiso et al 2001)

Die Interaktion zwischen u-PA, u-PAR und den Integrinen verstärkt die Bindung von Vitronectin an die Zellen und damit die Adhäsion. Andererseits besitzt PAI-1 die Fähigkeit, an Vitronectin zu binden. Diese Art der Bindung führt jedoch zur Unterbrechung der Zelladhäsion. PAI-1 fungiert somit als Faktor der Anti-Adhäsion. Insgesamt ist eine hohe Expression von PAI-1 im Tumorgewebe mit einer schlechten Prognose assoziiert. In Tierversuchungen zeigt sich bei einer geringeren PAI-1 Expression eine geringere Tumordinvasion und Vaskularisation (Harbeck et al 2002, 2004, Heiss et al 1995, Foidart J.M. et al 1993).



*Lysosom
MMP = Matrixmetalloproteinase
IGF = Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
TIMP = Metalloproteinaseinhibitor

Abb.3.: Überblick über die Interaktionen der verschiedenen Proteasen und Inhibitoren des u-PA-Systems bzw. dem u-PA-Rezeptor zwischen Tumorgewebe- und Tumorzelle.

1.3. Bisherige Studien zur Expression des Urokinase-Systems der eigenen Arbeitsgruppe

In Vorstudien unserer Arbeitsgruppe war das Urokinasesystem schon seit längerer Zeit im Zentrum des Interesses.

In einer konsekutiven, prospektiven Serie von 247 Patienten mit primärem Magenkarzinom wurden im Zeitraum von Februar 1989 bis Oktober 1991 203 Patienten einer chirurgischen Therapie zugeführt. Gewebestücke aus dem Primärtumor wurden in Paraffin gebettet und nach Schneiden in 4µm dicke Präparate immunhistochemisch mittels ABC-Färbung (Vectastain) nach u-PA, u-PAR, PAI-1 und PAI2 gefärbt.

Die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte erfolgte semiquantitativ mit Scoreeinteilung (score 0-3).

Es erfolgte ein Follow-up über median 31 Monaten bei einem Spektrum zwischen 9 und 56 Monaten.

Das tumorfreie- und Gesamtüberleben wurde mit Kaplan-Meier, uni- und multivariater Analyse nach Cox mit bekannten Tumormarkern verglichen.

In der univariaten Analyse fand sich eine hochsignifikante Korrelation von u-PA ($p=0,0008$), u-PAR ($p=0,0002$) und PAI-1 ($p=0,0002$) mit dem Gesamtüberleben, wohingegen für PAI2 nur eine sehr schwache Korrelation gefunden werden konnte. In der multivariaten Analyse war PAI-1 ein unabhängiger Prognosefaktor ($p=0,005$). Bei pT1/2, diffusem und Mischtyp nach Lauren fand sich für u-PA, u-PAR und PAI-1 eine signifikante prognostische Assoziation. PAI-1 war zusätzlich assoziiert mit dem Gesamtüberleben in der Untergruppe der Patienten mit positivem Lymphknotenstatus.

In dieser Vorstudie konnten wir also u-PA, u-PAR und PAI-1 als neue funktionelle und prognostische Risikofaktoren beim Magenkarzinom beschreiben. Im speziellen kristallisierte sich PAI-1 als unabhängige Variable heraus, die eine Assoziation mit einem erhöhten Risiko hinsichtlich eines Tumorrezidives und dem Gesamtüberleben aufweist.

Damit konnten wir das Urokinasesystem als entscheidenden Marker für das Outcome der Patienten in einer ersten Patientenserie mit Magenkarzinom vorschlagen (Allgayer H. et al 1995). Bisher fehlte jedoch eine Bestätigung dieser prognostischen Bedeutung an einer zweiten unabhängigen Serie.

1.4. Fragestellung und Studienkonzept der vorliegenden Dissertation

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, fehlt bisher eine Bestätigung der unabhängigen prognostischen Bedeutung des Urokinase-Systems beim Magenkarzinom an einer zweiten, unabhängigen Patientenserie. Zudem wäre es gerade insbesondere im Hinblick auf Durchführung neoadjuvanter Therapiekonzepte beim Magenkarzinom hochinteressant zu zeigen, dass eine Diagnostik des Urokinase-Systems mit gleicher Aussagekraft auch in präoperativ entnommenen gastrokopischen Biopsien möglich ist. Auch diese Fragestellung

wurde in der Vergangenheit bisher nie untersucht. Drittens wurde bisher kaum untersucht, inwiefern das Urokinase-System beim Magenkarzinom möglicherweise mit einer parallel bestehenden Infektion durch *Helicobacter pylori* in einem Zusammenhang steht. Viertens gab es bisher unseres Wissens nach noch keine Untersuchung zur Expression des Urokinase-Systems und seiner möglichen diagnostischen und prognostischen Bedeutung bei intestinalen Metaplasien. Entsprechend ergeben sich für die vorliegende Dissertation die folgenden Fragestellungen:

- 1) Bestätigung der unabhängigen prognostischen Bedeutung des Urokinase-Systems an einer unabhängigen Serie von Patienten mit Magenkarzinom. Bestätigung der Korrelation der Expression des u-PA-Systems mit der Expression von u-PAR auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark an einer unabhängigen Serie von Patienten.
- 2) Diagnostische Aussagekraft des u-PAR-Systems an präoperativ gewonnenen Biopsien, und Vergleichbarkeit der u-PAR-System-Immunhistochemie zwischen präoperativen Biopsien und intraoperativ entnommenen Resektionspräparaten.
- 3) Untersuchung der Assoziation der Expression des Urokinase-Systems beim Magenkarzinom mit einer *Helicobacter pylori*-Infektion.
- 4) Erstmalige Untersuchung der Expression des Urokinase-Systems in intestinalen Metaplasien im Tumor- und Normalgewebe und Untersuchung einer möglichen Korrelation mit etablierten Tumorparametern bzw. der klinischen Prognose.

2. Patienten, Materialien und Methoden

2.1. Charakterisierung des Patientengutes

2.1.1 Zusammensetzung des Kollektives

Im Zeitraum von Dezember 1994 bis Dezember 1997 wurde von 104 Patienten mit Magenkarzinom in einer konsekutiven Studie an der Chirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern postoperativ Gewebe gewonnen. Von zwölf dieser 104 Patienten wurden weiterhin präoperativ im Rahmen einer Gastroskopie zusätzlich Biopsien gewonnen. Die Nachbeobachtungszeit erfolgte bis zum August 1999.

Das Kollektive unterteilte sich in 68 männliche und 35 weibliche Patienten im Alter von 31 bis 91 Jahren. Zwei Patienten mussten aus der Studie genommen werden. Bei einem Patienten war das Gewebe aufgetaut und daher histologisches nicht mehr verwendbar. Bei einem

weiteren Patienten konnte sich die auswärts gestellte Diagnose nicht bestätigen lassen. Es handelte sich nur um eine intestinale Metaplasie.

2.1.2. Präoperatives Staging

Präoperativ wurden 98 Patienten einer Gastroskopie mit Biopsien malignitätsverdächtiger und unauffälliger Bezirke zur histologischen Sicherung des Befundes unterzogen. Zusätzlich erfolgte eine Abklärung auf einen möglichen synchronen Zweittumor.

Zur Bestimmung des klinischen Tumorstadiums wurde jeweils eine röntgenologische Untersuchung des Thorax sowie Sonographie bzw. Computertomographie des Abdomens durchgeführt.

Zur Verlaufskontrolle wurden ebenso die Tumormarker CEA, CA 19-9 und CA 72-4 präoperativ bestimmt.

Gab es einen klinischen Verdacht auf entsprechende Organbeteiligung, so kamen weitere Untersuchungstechniken, wie Knochenszintigraphie, Coloskopie, kraniales Computertomogramm, MRT und intravenöses Urogramm zum Einsatz.

2.1.3. Tumorklassifikation

Die Einteilung des Tumorstadiums, sowie das Grading erfolgte anhand der pathologischen Auswertung des intraoperativ bzw. während der Gastroskopie gewonnenen Gewebes im Pathologischen Institut der LMU München. Die einzelnen Klassifizierungen entsprechen hierbei den Empfehlungen des Tumorzentrums (5., vollkommen neu bearbeitete Auflage 1997/2003)(1)

Die Tumorklassifikation im Rahmen dieser Arbeit sah wie folgt aus (Tabelle 1):

| Tumorklassifikation | | |
|----------------------------|----------------|----|
| Geschlecht | männlich | 68 |
| | weiblich | 36 |
| Lokalisation | Cardia | 29 |
| | Fundus/Corpus | 43 |
| | Antrum/Pylorus | 29 |
| | Stumpf-Ca | 2 |
| | kein Tu | 1 |
| Durchmesser | < 25mm | 5 |
| | 25 - 50mm | 54 |
| | > 50mm | 32 |
| | keine Angaben | 11 |

| | | |
|------------|----------------------------|----|
| pT-Stadium | kein Tu | 1 |
| | pTis | 1 |
| | pT1 | 10 |
| | pT2 | 57 |
| | pT3 | 31 |
| | pT4 | 4 |
| pN-Stadium | kein Tu | 1 |
| | pN0 | 29 |
| | pN1 | 30 |
| | pN2 | 42 |
| | pN3 | 2 |
| pM-Stadium | kein Tu | 1 |
| | Mx | 2 |
| | M0 | 87 |
| | M1 | 15 |
| Resttumor | R0 | 85 |
| | R1 | 8 |
| | R2 | 11 |
| Grading | kein Tu | 1 |
| | G1 | 1 |
| | G1-2 | 1 |
| | G2 | 18 |
| | G2-3 | 8 |
| | G3 | 75 |
| | G4 | 0 |
| UICC | kein Tu | 1 |
| | IA | 9 |
| | IB | 18 |
| | II | 24 |
| | IIIA | 24 |
| | IIIB | 14 |
| | IV | 14 |
| Lauren | kein Tu | 1 |
| | Lymphom | 3 |
| | intestinal | 51 |
| | diffus | 41 |
| | gemischt | 9 |
| Borrmann | polypös | 5 |
| | polypös-ulcerierend | 13 |
| | ulcerierend-infiltrativ | 76 |
| | infiltrierend | 9 |
| | kein Tu | 1 |
| Histologie | kein Tu | 1 |
| | Adenokarzinom | 72 |
| | Siegelringkarzinom | 25 |
| | Adenosquamöses Karzinom | 4 |
| | Undifferenziertes Karzinom | 1 |
| | Malt Lymphom | 1 |

Tab. 1: Auflistung der Tumorcharakteristika

Die histologische Typisierung des Magenkarzinoms erfolgt grundsätzlich an allen Instituten einheitlich nach der Klassifikation der WHO (Tabelle 2) und des Weiteren nach einer zusätzlichen Unterteilung, wie sie von Lauren (Tabelle 3) propagiert wurde.

In der WHO-Klassifikation erfolgte die Einteilung nach dem erkennbaren Differenzierungsgrad. Adenokarzinome werden nach Grad 1-3, undifferenzierte und kleinzellige Karzinome werden nach G4 und Siegelringkarzinome nach G3 eingestuft.

| Histologie | Prozent |
|----------------------------|----------------|
| Adenokarzinom | ca. 70% |
| papilläres | |
| tubuläres | ca 50% |
| mucinöses | |
| Siegelringzellkarzinom | ca. 10% |
| Adenosquamöses Karzinom | |
| Plattenepithelkarzinom | |
| Kleinzelliges Karzinom | |
| Undifferenziertes Karzinom | ca. 20% |
| Andere | |

Tab. 2: Klassifikation nach WHO (Becker K. et al 1997)

Eine weitere, häufig verwendete Klassifikation stammt von Lauren. Hier erfolgt die Einteilung prinzipiell in einen intestinalen und diffusen Typ und zusätzlich einen Mischtyp, der jedoch in seiner Prognose dem diffusen Typ zugeschrieben wird.

| Histologie | Mikroskopische Beschreibung |
|-------------------------|--|
| Intestinaler Typ | Überwiegend Drüsen Auskleidende Zellen ähnlich intestinalen Zylinderzellen Meist gut begrenzt Kompakt gebaut |
| Diffuser Typ | Überwiegend schlecht kohäsive Zellen Ausgedehnte Infiltration der Magenwand Schlecht begrenzt Weit verstreute Tumorzellen |

Tab. 3: Klassifikation nach Lauren (Becker K. et al 1997)

Weiterhin werden in der Literatur bei den makroskopischen und endoskopischen Erscheinungsformen noch zwischen dem Frühkarzinom und dem fortgeschrittenen Karzinom differenziert.

Das Frühkarzinom wird als Karzinom definiert, bei dem die Tumorinfiltration nur auf die Mukosa, bzw. Mukosa und Submukosa begrenzt bleibt. Es fehlt jedoch eine Berücksichtigung der Lymphknotenbeteiligung, die in ca. 5% der Frühkarzinome vom Mukosatyp und bei ca. 20% des Submukosatyps bereits beobachtet werden können. Nach der Beschreibung des Tumorzentrums München (Becker K. et al 1997) handelt es sich jedoch beim so genannten Magenfrühkarzinom chronologisch-histologisch um ein oberflächliches Karzinom. Im Kollektiv dieser Studie befand sich kein Magenfrühkarzinom.

Das fortgeschrittene Magenkarzinom wird nach seiner makroskopischen Erscheinungsform zusätzlich nach Borrmann eingeteilt (Becker K. et al 1997).

| Klassifikation | Makroskopische Erscheinungsform |
|----------------|---------------------------------|
| Borrmann I | Polypös |
| Borrmann II | polypös-ulzerativ |
| Borrmann III | ulzerativ-infiltrativ |
| Borrmann IV | Infiltrativ |

Tab. 4: Klassifikation nach Borrmann (Becker K. et al 1997)

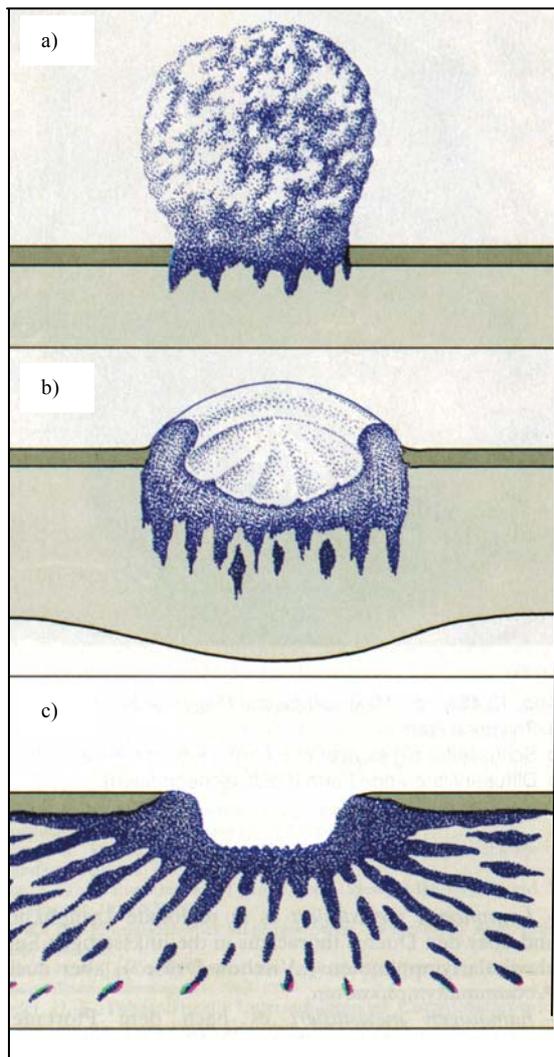


Abb. 4: Hier stellt sich Borrmann I als a) dar. Borrmann II entspricht b). Borrmann III hingegen ergibt sich als Kombination aus b) und c). Borrmann IV entspricht dem Teil c) (Tumormanual 1997)

Nach dem Tumormanual des Tumorzentrums München, mit der letzten Änderung aus dem Jahre 1997 (Becker K. et al 1997) ergibt sich folgende pathohistologische Klassifikation (nach TNM) und Stadiengruppierung (nach UICC). TNM klassifiziert mit T, den lokalen Tumorbefund, mit N den Befall der Lymphknotenkompartimente und mit M den Status der

Fernmetastasierung bei der Erstdiagnose des primären Tumors. In der Stadiengruppierung des UICC's werden verschiedene Kombinationen der TNM-Klassifikation aufgenommen, die in der Historie mit einem vergleichbaren Langzeitverlauf kombiniert waren. Die darin klassifizierten Untergruppen mit UICC 0 – IV haben alle die gleiche Prognose und beschreiben damit eine Eingruppierung in Gruppen des gleichen, relativen Überlebens. Die Tumorausbreitung des Magenkarzinoms erfolgte in 2/3 der Fällen zum Zeitpunkt der Operation bereits lokoregionär, entweder per continuitatem durch eine frühzeitige Penetration oder Infiltration der Serosa mit einem Befall der Nachbarorgane (Milz, Pankreas, Querkolon, Zwerchfell, Bauehand und usw.) und/oder einem Befall der subserösen Lymphgefäße und damit einer bereits bestehenden lymphogenen Metastasierung. Eine weitere Tumorausbreitungsform ist die hämatogene Metastasierung mit Fernmetastasen, die vor allem über den Weg des Pfortadersystems in der Leber zu finden sind.

| T | Primärtumor |
|----------|--|
| TX | Primärtumor kann nicht beurteilt werden |
| T0 | Kein Anhalt für Primärtumor |
| Tis | Carcinoma in situ: intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der Lamina propria |
| T1 | Tumor infiltriert Lamina propria oder Submukosa |
| T2 | Tumor infiltriert Muscularis propria oder Subserosa |
| T3 | Tumor penetriert Serosa (viszerales Peritoneum), infiltriert aber nicht benachbarte Strukturen |
| T4 | Tumor infiltriert benachbarte Strukturen |

Tab. 5: Klassifikation nach T (lokaler Tumorbefund) entsprechend der pathohistologische Klassifikation (Becker K. et al 1997)

| N | Regionäre Lymphknoten |
|----------|---|
| NX | Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden |
| N0 | Keine regionären Lymphknotenmetastasen |
| N1 | Metastasen in 1-6 regionären Lymphknoten |
| N2 | Metastasen in 7-15 regionären Lymphknoten |
| N3 | Metastasen in mehr als 15 regionären Lymphknoten |

Tab. 6: Klassifikation nach N (Lymphknotenbefall der Kompartimente) entsprechend der pathohistologische Klassifikation (Becker K. et al 1997)

| M | Fernmetastasen |
|----------|--|
| MX | Fernmetastasen können nicht beurteilt werden |
| M0 | Keine Fernmetastasen |
| M1 | Fernmetastasen |

Tab. 7: Klassifikation nach M (Fernmetastasierung) entsprechend der pathohistologische Klassifikation (Becker K. et al 1997)

| Stadiengruppierung nach UICC | | | |
|------------------------------|------------|------------|----|
| Stadium 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stadium IA | T1 | N0 | M0 |
| Stadium IB | T1 | N1 | M0 |
| Stadium II | T2 | N0 | M0 |
| | T1 | N2 | M0 |
| | T2 | N1 | M0 |
| Stadium IIIA | T3 | N0 | M0 |
| | T2 | N2 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| Stadium IIIB | T4 | N0 | M0 |
| | T3 | N2 | M0 |
| Stadium IV | T1, T2, T3 | N3 | M0 |
| | T4 | N1, N2, N3 | M0 |
| | Jedes T | Jedes N | M1 |

Tab. 8: Klassifikation nach UICC (Becker K. et al 1997)

2.1.4. Operationscharakteristika

Beim Magenkarzinom ist die operative Therapie als bisher einziges, kuratives Therapieprinzip anzusehen. Durch das präoperativ durchgeführte Staging sollte geklärt werden ob eine kurative (R0) Resektion möglich ist. Alle in diese Studie aufgenommenen Patienten wurden mit kurativem Anspruch reseziert. Ziel der Operation war also die R0 – Resektion, d.h. die Entfernung des tumortragenden Magenabschnitts, inklusive beider Omenta, sowie der entscheidenden drei Lymphabflussregionen, desweiteren aller infiltrierten, umliegenden Organe und Strukturen.

Als Standardverfahren gelten hierbei die totale und die subtotale Gastrektomie.

Magenfrühkarzinome von Mukosatyp kamen in unserem Patientenkollektiv nicht vor.

Findet sich zum Zeitpunkt der Operation ein kleiner Tumor im distalen Magen mit einem Durchmesser von kleiner 2 cm, einer pathohistologischen Klassifikation von T1 oder T2 und einer intestinalen Wachstumsform, so kann eine subtotale Gastrektomie ausreichend sein. Der Resektionsabstand zum Tumor muss bei dieser Technik mindestens 5-6 cm betragen.

Die Linien in der folgenden Abbildung (Abb. 5) zeigen die Resektionslinien bei einer subtotalen Gastrektomie. Hierbei kommt es zu einer 4/5 Resektion des Magens. Die Resektion soll hierbei im Bereich der kleinen Kurvatur unmittelbar subkardial erfolgen. Im Bereich der großen Kurvatur liegt sie in Höhe des Abgangs der Arteria gastroepiploica sinistra.

Die Lymphadenektomie wird bei der subtotalen Gastrektomie wie bei der totalen Gastrektomie durchgeführt womit eine Dissektion der Kompartimente I (Lymphknotenstadien 1-6) und II (Lymphknotenstadien 7 -11) erfolgt (Abb.9).

Die Rekonstruktion wird mit einer antekolischen oder retrokolischen Gastroenterostomie oder nach Y – Roux-Schlinge bewerkstelligt (Abb.6, Abb.7) in diesem Kollektiv bei 87 Patienten.

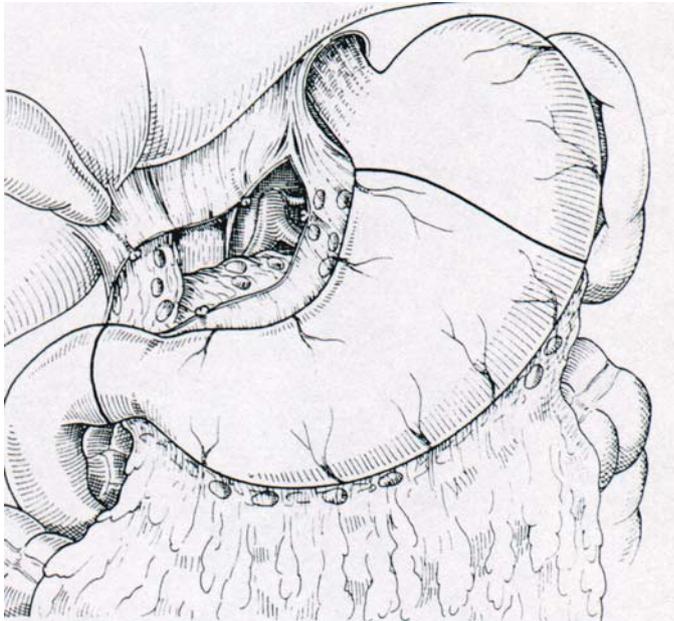


Abb. 5: Resektionslinien bei der subtotalen Gastrektomie [Rohen J.W. et al 1998]

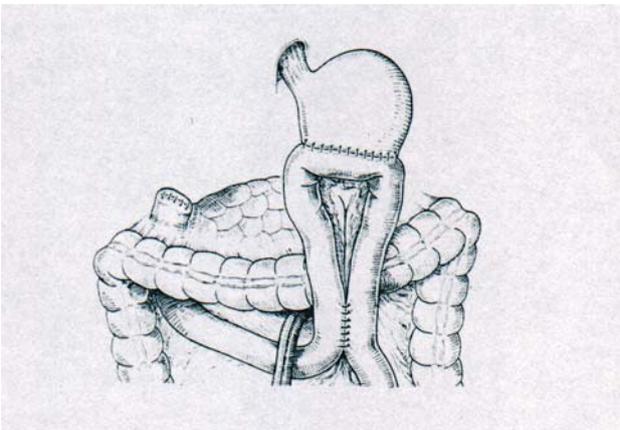


Abb. 6: Rekonstruktion mit einer antekolischen Gastroenterostomie [Rohen J.W. et al 1998]

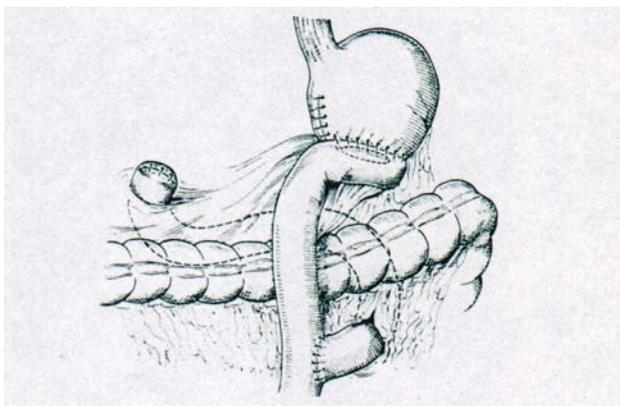


Abb. 7: Rekonstruktion mit einer Y-Roux-Schlinge [Rohen J.W. et al 1998]

Bei der totalen Gastrektomie (Abb.8) erfolgt die komplette Omentektomie unter Mitnahme des kranialen Peritonealblattes, des Mesokolons und des Pankreas – Peritonealen – Übergangs.

Bei Tumoren des Corpus, Fundus oder des subkardialen Übergangs, die die Magenkontur überschreiten, kann zusätzlich eine Pankreaslinksresektion und Splenektomie nötig werden (in dieser Serie wurde bei 24 Patienten zusätzlich eine Splenektomie und bei 4 zusätzlich eine Pankreaslinksresektion).

Auch Enbloc – Resektionen unter Mitnahme des Querkolons können bei fortgeschrittenen Tumoren nötig werden. Diese und noch einige weitere Ausdehnungen des Operationsausmaßes fasst man unter den Begriff der erweiterten Gastrektomie zusammen. Bei allen 104 Patienten dieser Studie wurde eine offene Gastrektomie mit unterschiedlich großem Operationsrahmen durchgeführt, bei zwei Patienten wurde nach einer Probelaparoskopie offen weiter operiert.

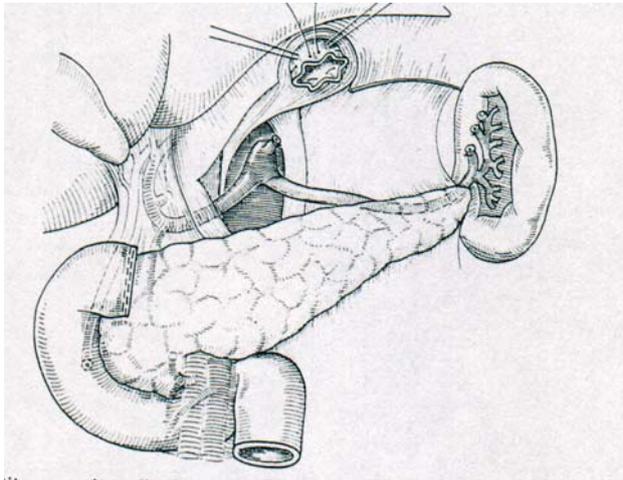


Abb. 8: Ergebnis nach der totalen Gastrektomie (Rohen J.W. et al 1998)

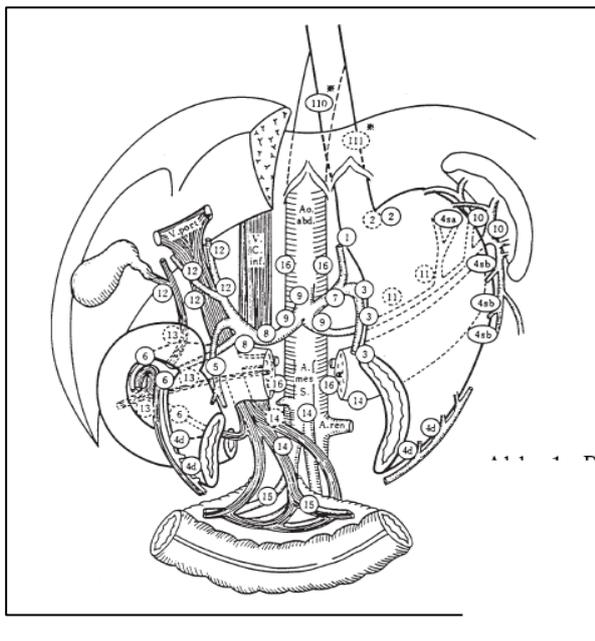


Abb. 9: Lymphadenektomie (Japanese Research Society for gastric Cancer 1981)

Eine Lymphadenektomie beim Magenkarzinom erfolgt nach Kompartimenten.

Die erste Lymphknotenstation wird nahe der Magenwand, perigastrisch als Kompartiment I beschrieben. Die Adenektomie dieser Region umfasst die Entfernung sämtlicher Lymphknoten entlang der großen und kleinen Kurvatur (Lymphknotenstadien 1-6).

Kompartiment II beinhaltet die Lymphknoten an der A. gastroduodenalis, A. gastrica sinistra, A. hepatica communis, A. lienalis und des Truncus coeliacus (Lymphknotenstadien 7-11).

Als Kompartiment III werden die Lymphknotenstationen im Verlauf des Ligamentum hepatoduodenale, retropankreatisch, mesenterial, paraaortal und paracaval beschrieben (Lymphknotenstadien 12-15). Diese Regionen werden bei der Operation nie völlig eingesehen und können daher nicht komplett ausgeräumt werden. Ein Befall in diesem Bereich wird daher in der TNM – Klassifikation als Fernmetastasierung definiert

2.2. Klinische Nachbeobachtung

In allen Fällen wurde die Operation mit dem Anspruch auf eine primär, kurative Resektion begonnen. Bei 16 Patienten stellte sich intraoperativ eine Metastasierung heraus, bzw. bei 10 Patienten konnte aufgrund des Lokalbefundes nur eine R2 – Resektion durchgeführt werden. Eine R1 – Resektion lag bei 9 Patienten vor. Diese Patienten, sowie 8 Fälle mit Lymphknotenbefall des Kompartiments III wurden einer postoperativen Chemotherapie zugeführt. 12 Patienten erhielten zusätzlich eine Strahlentherapie, 3 Patienten erhielten eine Chemoimmuntherapie/Immuntherapie.

Im Rahmen eines klinischen Studienprotokolls wurden 16 Patienten einer intraoperativen Strahlentherapie (IORT) unterzogen.

Für diese Patientenserie wurde von allen Patienten intraoperativ sowohl Tumor- als auch Normalgewebe gewonnen. Es folgte daraufhin eine Immunhistochemische Untersuchung des Tumorgewebes auf die Standardparameter und zusätzlich den Faktoren des Urokinasesystems. Dasselbe erfolgte für das Normalgewebe (in 98 Patienten) hierbei wurde insbesondere auf metaplastische Veränderungen geachtet. In 31 Fälle waren hierbei positive Befunde zu erheben (17 Patienten hatten ein Magenkarzinom vom intestinalen Typ, 11 vom diffusen Typ und 3 vom Mischtyp nach Lauren siehe Tab. 30).

Alle Präparate wurden zusätzlich auf eine Infektion mit Helicobacter pylori untersucht, die in 36 Fällen bestand.

Bei 12 Patienten wurde präoperativ eine gastroscopische Biopsie aus dem Tumor und Normalgewebe gewonnen und ebenfalls auf alle Tumorcharakteristika, intestinale Metaplasie und die Faktoren des Urokinase-Systems (u-PA, u-PAR und PAI-1) untersucht.

Alle entlassenen Patienten wurden postoperativ einer Nachsorge im Haus oder bei ihrem Hausarzt übergeben, die von uns regelmäßig abgefragt wurde. In ca. 3-6 monatigen Abständen erfolgte obligat eine körperliche Untersuchung und eine Vitamin B12 – Gabe.

Dem Hausarzt wurde ein Vorgehen, wie es in unserem Haus mit Magenkarzinompatienten üblich ist empfohlen:

- Anamnese und körperliche Untersuchung
- regelmäßige (ca. alle 6-12 Monate) Laborkontrolle, mit HS, Krea, CEA, CA 19-9, CA 72-4, LDH, AP und Hb
- Oberbauchsonografie (in den ersten 2 Jahren alle 6 Monate, dann 1 mal jährlich)
- Endoskopie im ersten Jahr 2 mal, dann ebenfalls jährlich jeweils mit Biopsien
- Bei Problemen, Schmerzen, verdächtigen Befunden zusätzlich CT, konventionellem Thorax, Szintigraphie, MRT, oder weitere Untersuchungen

Diese Ergebnisse wurden von uns schriftlich oder telefonisch halbjährlich abgefragt, bzw. bei Befundprogredienz nach Vorstellung ergänzt.

Einige Patienten, die an der parallelen Studie über Mikrometastasen im Knochenmark teilgenommen hatten (Simon et al 2002), wurden 3 monatlich zur Knochenmarkspunktion einbestellt und kontrolliert.

2.3. Material und Methoden

2.3.1. Durchführung der intraoperativen Gewebegewinnung

Alle 104 Patienten wurden einer offenen Gastrektomie mit unterschiedlich großem Operationsrahmen unterzogen, bei zwei Patienten wurde nach einer Probelaparoskopie offen weiter operiert.

Zur Aservierung von frischem Material wurde ein spezieller „Gewebedienst“ ins Leben gerufen.

Dieser aservierte noch im Operationssaal nach Eröffnung des frisch entnommenen Magenpräparats an der großen Kurvatur jeweils 2 Biopsien (ca. 0,5cm x 0,5cm) sowohl aus dem Tumorbereich, wie auch aus makroskopisch vermutetem Normalgewebe (zur Untersuchung auf metaplastische Veränderungen).

Zum Transport wurden die jeweiligen Biopsien ohne Konservierung in separate Behälter (Tubes) auf Eis verbracht und zur Weiterverarbeitung ins Labor transportiert (ca. 5 Minuten). Hier erfolgte eine sofortige Aufbereitung.

Bei 12 Patienten wurden präoperativ, im Rahmen ihrer Kontrollgastroskopie Biopsien mit der Biopsiezange gastroskopisch sowohl aus dem Tumorbereich, als auch aus dem Normalgewebe entnommen (minimal 2 Biopsien aus der Tumorregion minimal 2 Biopsien aus makroskopisch vermutetem Normalgewebe).

Das so gewonnene Gewebe wurde ebenfalls nach Entnahme vom Gewebedienst aserviert in Tubes auf Eis transportiert und innerhalb von 15 Minuten weiterverarbeitet.

2.3.2. Gewebspräparation, Aufbewahrung und Anfertigung von Kryoschnitten

Die aservierten Gewebepreparate wurden nach Verbringen ins Labor umgehend zur Weiterverarbeitung vorpräpariert. Zu diesem Zweck erfolgte das Aufbringen der intraoperativen sowie gastrokopisch gewonnen Biopsien mittels Gefrierigel (Sigma) auf kleine Korkplättchen (Sigma) bevor sie zum Schockgefrieren in Flüssigstickstoff (Temperatur: -270° Celsius) verbracht wurden. Dieses Vorgehen verhindert eine Zerstörung des Gewebes durch die, beim langsamen Gefrieren entstehenden Eiskristalle und ermöglicht eine rasche Fixation der noch intakte Antigene. Danach konnten die Kryopräparate sofort geschnitten oder alternativ bis zum Schneiden in einer Gefriertruhe bei -80° Grad Celsius vor der Weiterverarbeitung zwischengelagert werden.

Zur Anfertigung der Schnitte wurden die gefrorenen Biopsien aus der Gefriertruhe entnommen. Um ein Auftauen der Präparate zu verhindern wurden diese mittels eines Behälters, der mit Flüssigstickstoff gefüllt war, zum Schneidegerät gebracht. Hierbei wurde peinlich genau darauf geachtet, dass die Präparate weder vor, während, noch nach dem Schneiden auftauen. Das Einfrieren nach einem Wiederauftauen wäre mit dem Verlust von vielen Antigenen verbunden. Die Anfertigung von neuen Schnitten und Färbungen mit diesem Präparat wäre sonst verfälscht bis unmöglich. Die Korkplättchen wurden aus dem Stickstoffbehälter entnommen und mittels eines Tropfens destillierten Wassers an einen Metallstempel des Gefrierschneiders, Kryotoms (Kryostat) bei -25° Grad Celsius festgefroren. In diesem Kryostaten wurden $5\mu\text{m}$ dicken Schnitte hergestellt und auf zuvor mit Aceton gereinigte Objektträger aufgezogen und 24h luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurden sie entweder direkt immunhistochemisch gefärbt oder zur späteren Färbung bei -25° Grad Celsius aufbewahrt.

Von jedem Präparat wurden jeweils 13 Schnitte möglichst in Serie angefertigt, d.h. die aufeinander folgenden Schnitte entstammten unmittelbar anliegenden Gewebebereichen. Von jedem Patienten wurden also jeweils 13 Schnitte Tumor und Normalgewebe und in 12 Fällen zusätzlich jeweils 13 Schnitte aus den gastrokopischen Tumor und Normalgewebe angefertigt.

2.4. Immunhistochemischer Nachweis des Urokinasesystems anhand von u-PAR, u-PA und PAI-1 in Normal- und Tumorgewebe der intraoperativ gewonnen Präparate

2.4.1. Gewinnung

Wie unter Punkt 2.3.1. beschrieben.

2.4.2. Aufarbeitung

Für den immunhistochemischen Nachweis des Urokinasesystems wurde in dieser Arbeit der ABC-Streptavidin-Biotin-Elite-Komplex (Vectastain ABC-Elite-Kit) verwendet. Die frischen oder nach dem Schneiden neuerlich eingefrorenen Präparate wurden bei Raumtemperatur getrocknet (1 Stunde), nach Antikörper, Verdünnung und Färbedatum beschriftet und wie folgt bearbeitet:

- I. Fixierung und Dehydrierung der Kryopräparate mittels Aceton (200ml) für 10 Minuten
- II. Inaktivierung der endogenen Peroxidase in einem 0,5% Wasserstoffperoxid/Methanolgemisch (200ml) für 30 Minuten am Schüttler
- III. Reinigung der Präparate mittels dreimaligem Waschen mit TBS (200ml) für 10 Minuten
- IV. Daraufhin erfolgt die Vorinkubation mittels Pferdeserum 150µl auf 10 ml TBS und 150µl AB Serum zur Reduktion der unspezifischen Fc-Reaktion für 30 Minuten
- V. Reinigung der Präparate mittels dreimaligem Waschen mit TBS (200ml) für 10 Minuten
- VI. Zur Blockierung der endogenen Avidin/Biotin-Aktivität erfolgt die Blockierung mittels Avidin/Biotin Blocking Kit:
 - a) Avidininkubation 15 Minuten
 - b) TBS Waschen 5 Minuten
 - c) Biotinblockierung 15 Minuten
- VII. Reinigung der Präparate mittels dreimaligem Waschen mit TBS (200ml) für 10 Minuten
- VIII. Inkubation mittels jeweiligem Primärantikörper (1:1000 u-PA, 1:1000 u-PAR und PAI-1 1:800) in 150µl Pferdeserum auf 10ml
- IX. Reinigung der Präparate mittels dreimaligem Waschen mit TBS (200ml) für 10 Minuten

- X. Inkubation mit Sekundärantikörper gegen Maus IgG 50µl auf 150µl Pferdeserum und 10ml TBS für 30 Minuten
- XI. 2 mal Waschen mit TBS-Brij für 5 Minuten, 1 mal Waschen mit TBS für 5 Minuten
- XII. Inkubation mit Avidin/Biotin Reagens AB (50µl Reagens A, 50µl Reagens B) auf 10 ml TBS für 40 Minuten
- XIII. 2 mal Waschen mit TBS-Brij für 5 Minuten, 1 mal Waschen mit TBS für 5 Minuten
- XIV. Die Färbung erfolgt mittels 28mg AEC (Aminoethylcarbazole) in 105µl Wasserstoffperoxid und 98 ml Acetatpuffer (ph5,0) für 30 Minuten am Schüttler
- XV. Reinigung der Präparate mittels dreimaligem Waschen mit TBS (200ml) für 10 Minuten
- XVI. Zur Gegenfärbung verwenden wir HE (10%) für 7 Minuten
- XVII. Reinigung der Präparate mittels dreimaligem Waschen mit TBS (200ml) für 10 Minuten
- XVIII. Eindecken der Präparate mittels Kaiser's Glyceringelatine

Die Auswertung erfolgte daraufhin ohne Kenntnis des zugehörigen Falles und des bisherigen Krankheitsverlaufes des Patienten. Die Einteilung der Gruppen erfolgt nach der von Babic [2] verwendeten Klassifizierung/Scoring:

| | | |
|----------|----------------------|-----------------|
| score 0= | 0% | positive Zellen |
| score 1= | 1-30% | positive Zellen |
| score 2= | ³ 30%-70% | positive Zellen |
| score 3 | >70% | positive Zellen |

und der histologischen Klassifizierung in Epithel und Tumorgewebebereich.

2.5. Immunhistochemischer Nachweis des Urokinasesystems anhand von u-PAR, u-PA und PAI-1 in Normal- und Tumorgewebe der präoperativ biotisch gewonnen Biopsien und Metaplasien

2.5.1. Gewinnung

Wie unter Punkt 2.3.1. beschrieben.

2.5.2. Aufarbeitung

Die Gewinnung erfolgte wie unter Punkt 2.4.2. beschrieben. Die Präparate wurden ohne Kenntnis der Ergebnisse bei den intraoperativ gewonnen Präparaten ausgewertet.

2.6. Gewinnung und Aufarbeitung der Knochenmarksaspirate

Parallel zur eigenen Untersuchung wurden KM-Aspirate von 74 Patienten vom Mittdoktoranten E. Simon hinsichtlich der u-PAR-Expression auf disseminierte Tumorzellen untersucht. Nachdem in dieser Arbeit eine Korrelation des immunhistochemischen Befundes zum u-PA-System im Primärtumor zu diesen Ergebnissen im Knochenmark korreliert werden sollte, wird im folgenden eine Beschreibung der von Herrn Simon verwendeten immunocytochemischen Methoden gegeben.

2.6.1. Gewinnung

Die Knochenmarksaspirate wurden intraoperativ aus den beiden Spinae iliacae anteriores superiores und im Rahmen der Nachsorge postoperativ aus den spinae iliacae posteriores superiores in mit Heparin versetzten Plastikspritzen gewonnen. Vor den Eingriffen wurden die Patienten über mögliche Komplikationen (Entzündung, Infektion, Nachblutung, Schmerz, Nadelbruch, Knochenperforation bei Osteoporose, Punctio sicca) und Kontraindikationen (allergische Reaktionen auf Lokalanästhetikum oder schlechte Gerinnung) aufgeklärt, bzw. die Gerinnung prae interventionem durch Abnahme von Q (Quick) und PTT abgeklärt. Die intraoperative Knochenmarksgewinnung war aufgrund der Narkose ohne Lokalanästhesie möglich. Die Nachsorgepunktion erfolgte nach Infiltration der Haut, Subcutis und des Periosts der beiden Punktionsstellen sowie der unmittelbaren Umgebung mit 5-10 ml Scandicain 2%. Mittels sterilen, groß-lumigen Knochenmarkspunktionskanülen erfolgte die Punktion unter operativ, sterilen Bedingungen. Das gewonnene Probenvolumen schwankte zwischen 1 –10 ml pro Aspirat. Die Aufarbeitung des Aspirats erfolgte umgehend, spätestens innerhalb von 12 Stunden.

2.6.2. Aufarbeitung

Die Aufarbeitung erfolgte gemäß der von Loos und Roos 1974 erstmals beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll.

- I. Reinigung von groben Partikeln und Fetten durch Verdünnung mit 50 ml PBS und Zentrifugation mit 1200 rpm bei Raumtemperatur für 8 Minuten
- II. Entfernung des Überstandes (Fett, Detritus, Plasma)
- III. Resuspension des Zentrifugats in 20 ml PBS
- IV. Aufpipettieren von 20 ml Ficoll unter Erhalt der Zweiphasigkeit
- V. Dichtegradiententrennung durch Zentrifugation bei 4°C mit 2000 rpm für 25 Minuten
=> mononukleären Zellen, Thrombozyten und Tumorzellanreicherungen in der Interphase
- VI. Abpipettieren der Interphase und Verwerfen von Pellet, Ficoll und Plasma
- VII. Resuspension in 50 ml PBS und Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 1200 rpm für 8 Minuten, damit erfolgte die Reinigung der Zellen
- (VIII.) bei starker Versetzung des Suspensates mit Erythrozyten, erfolgt hier eine einminütiger Waschgang mit 1-3 ml Erythrozytenpuffer
- IX. Vitalfärbung der Zellen mit Trypanblau
- X. Auszählen der vitalen Zellzahlen in der Nägebauer-Zählkammer
- XI. Auffüllen des Suspensionsvolumens mit PBS zur Einstellung der gewünschten Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml
- XII. Aufbringung von 100 µl dieser Zellsuspension und damit 10^5 Zellen mittels Zytrozentrifugation (500rpm, 5 min) pro Glasobjektträger
- XIII. Lufttrocknung der Objektträger für 12-24 Std. bei Raumtemperatur
- XIV. Färbung bzw. Lagerung bei -20°C eingefroren

2.7. Immuncytochemische Einfach- und Doppelfärbung

2.7.1. Einfachfärbung

Als Antikörper zur Bestimmung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark verwendeten wir der monoklonale Antikörper, Cytokeratin 18. Dessen besondere

Komponenten besitzen die Fähigkeit einschichtige, epitheliale Zellen, sowie maligne Zellen mit einschichtigem epithelialen Ursprung zu markieren (Moll et al 1982).

Die Sensitivität und Spezifität dieser Färbung wurde bereits in vielen Studien nachgewiesen (Heiss et al 1992, Pantel et al 1993).

Zur Färbung kam die APAAP-Methode nach Cordell und Fallini et 1982

- I. Präparate nach 18 Std. lufttrocknen oder kontrollierten Auftauen von – 20C° 10 min mittels Aceton fixiert.
- II. Drei-maliges Waschen für 5 min in PBS
- III. Inkubation zur Reduktion unspezifischer Fc-Reaktionen für 25 min mit 20% AB-Serum/PBS
- IV. Drei-maliges Waschen mit PBS
- V. Inkubation mittels monoklonalen Antikörper CK2 (Maus) gegen Cytokeratin 18 (Verdünnung 4µg/ml in 10%AB-Serum/PBS) für 60 min
- VI. Drei-maliges Waschen mit PBS
- VII. Brückenantikörper (Kanninchen) gegen Maus-IgG (3,1 mg/ml, 1.50 in 10% AB-Serum/PBS) für 30 min
- VIII. Monoklonale Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex (Maus, 0,17 mg/ml, 1.100 in 10% AB-Serum/PBS) für 30 min
- IX. Färbung mittels einer Substratlösung aus 0,2 mg/ml Naphtol-AS-MX-Phosphat in Dimethylformamid gelöst, 1%igem Fat-Blue-Salz (1mg/ml), 0,2molarem TRIS-Puffer (ph 8,2) und 0,25 mg/ml Levamisol (blockiert endogene alkalische Phosphatase)
- X. Drei-maliges Waschen mit PBS für 5 min
- XI. Eindecken der Präparate mittels Kaiser's Glyceringelatine

Die Auswertung erfolgte daraufhin ohne Kenntnis des zugehörigen Falles und des bisherigen Krankheitsverlaufes des Patienten. Aufgrund der Vorpräparation wurden stets 10⁶ Zellen ausgewertet und hierbei die Anzahl der positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl beurteilt. (Vergrößerungen von 1:10 – 1: 100)

2.7.2. Doppelfärbung

Die Doppelmarkierungsmethode auf der Basis einer hochsensitiven Immunogold-Silber-Färbung mit alkalischer Phosphatase-konjugierten Streptavidin/Biotin wurde erstmals von Riesenberg et al beschrieben und von unserer eigene Arbeitsgruppe modifiziert (Cordell et al 1982, Riesenberg et al 1993)

Stammend aus der Doktorarbeit von Dr. Erich Simon unserer Arbeitsgruppe.

- I. Präparate nach 18 Std. lufttrocknen oder kontrollierten Auftauen von – 20C° 10 min mittels Aceton fixiert.
- II. Drei-maliges Waschen für 5 min in PBS
- III. Inkubation zur Reduktion unspezifischer Fc-Reaktionen für 25 min mit 20% AB-Serum/PBS
- IV. Drei-maliges Waschen mit PBS
- V. Inkubation mit monoklonalem Mausantikörper gegen humanes membranständigen und intrazellulären Urokinase-Rezeptor in der Verdünnung 8 µg/ml in 10% AB-Serum/PBS für 60 min
- VI. Drei-maliges Waschen mit PBS
- VII. Applikation des mit 1nm-Goldpartikeln konjugierten Brückenantikörpers gegen Maus-IgG (Ziege, 0,08 mg/ml, 1.50 in 10% AB-Serum/PBS) für 30 min
- VIII. Waschen mit PBS für 10 min
- IX. Zur Verhinderung von Kreuzreaktionen 10% Maus-Serum/PBS für 25 min
- X. Drei-maliges Waschen mit PBS
- XI. Inkubation mit zweitem Primärantikörper (biotinyliert monoklonal) CK2 gegen Cytokeratin 18 (10 µg/ml in 10% AB-Serum/PBS) für 45 min
- XII. Drei-maliges Waschen mit PBS
- XIII. Applikation von alkalische-Phosphatase-konjugiertem Streptavidin (1,1 mg/ml, 1:100 in 10% AB-Serum/PBS) für 30 min
- XIV. Drei-maliges Waschen mit PBS
- XV. Drei-maliges Waschen mit Aqua dest.
- XVI. Färbung mit Neufuchsin (0,40 mg/ml), Na-Nitrit (0,04 mg/ml) in Aqua bidest., Levamisol (0,36 mg/ml), 0,2m TRIS-Puffer (ph 8,7) in Aqua bidest., Naphtol-AS-BI-Phosphat (0,08 mg/ml) in Dimethylformamid für 20 min
- XVII. Sieben-maliges Waschen mit bidestilliertem Wasser
- XVIII. Mikroskopisch kontrollierte Versilberung, silver kit für 20 min
- XIX. Waschen mit Aqua dest. Für 5 min

XII. Eindecken der Präparate mittels Kaiser's Glyceringelatine

Die Auswertung erfolgte daraufhin ohne Kenntnis des zugehörigen Falles und des bisherigen Krankheitsverlaufes des Patienten. Aufgrund der Vorpräparation wurden stets 10^6 Zellen ausgewertet und hierbei die Anzahl der positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl beurteilt. (Vergrößerungen von 1:10 – 1: 100)

Beurteilt wurde bei der Mikroskopie die Anzahl der CK18-positiven Zellen- die qualitative Expression u-PAR auf CK18-positiven Zellen- die Anwesenheit von u-PAR positiven mesenchymalen Zellen ohne CK18 Expression und der prozentuale Anteil von u-PAR/CK18-doppelt positiver Zellen an der Gesamtzahl der CK18-positiven Zellen.

2.8. Kontrollen

Negativkontrollen:

- VI. Kontrollen durch Nicht-Tumorpatienten:
Hier handelt es sich um Patienten mit Magenulzerationen ohne Nachweis einer Tumorerkrankung
- VII. Kontrolle für unspezifische Farbstoffreaktionen:
Ein Gefrierschnitt des Magentumors des zu untersuchenden Patienten wird mit TBS-Puffer und den Farbstoffen AEC und HE behandelt, um unspezifische, nicht Antikörper-bedingte Farbstoffreaktionen zu erkennen, wie etwa die fehlende Hemmung der endogenen Peroxidase
- VIII. Sekundärantikörperkontrolle (Isotyp-Kontrolle):
Inkubation der Kontrollpräparate mit im Magengewebe nicht reaktiven monoklonalen Immunglobulinen, MOPC (Ig2a)

Positivkontrollen

- IX. In Vorstudien als eindeutig für den jeweiligen Antikörper stark positive Präparate (score3) von Patienten mit der histologischen Diagnose eines Magenkarzinoms
- X. Cytospinpräparate aus der humanen Kolonkarzinomlinie HT29 (Institut für Immunologie, LMU, Prof Dr Johnson) zusätzlich zur Evaluierung der Färbeschritte für u-PA und u-PAR, als bekannte positive Zellreihe
- XI. Bei der Einfachfärbung und Doppelfärbung von KM (Dissertation von E. Simon) verwendeten wir die CK18-positiven Tumorzelllinien HT29, SW403

2.9. Tumorzellkulturen zu den immunhistochemischen Färbungen

Verwendung fanden in dieser Studie etablierte, gastrointestinale Zelllinien der Firma ATCC (Rockville, Maryland, USA).

HT29: ATCC-Nr. HTB 38, G2 Colonkarzinom (Adenokarzinom) einer 44 jährigen weißen Patienten aus dem Jahre 1975

SW403: ATCC-Nr. CCL 230. G3 Colonkarzinom (Adenokarzinom) einer 51 jährigen weißen Patientin, 1976

Die Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 100% und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Das Kulturmedium von 500 ml RPMI 1640 enthielt 7 ml Na-Pyruvat, 7 ml L-Glutamin, 10 ml Penicillin/Streptomycin Lösung, 50 ml hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) und 2,5 µg/ml Fungizone.

Nach Anreicherung der mononukleären Zellen in der Interphase wurde die Konzentration der Zellen zur Herstellung der Cytozentrifugationspräparate abgelöst und auf Objektträger wie die KM-Präparate aufgebracht (siehe 2.7.2).

2.10. Bestimmung der Helicobacter pylori-Infektion

Zur Diagnose einer Helicobacter pylori-Infektion wurden in dieser Serie verschiedene Test verwendet. Der Nachweis des Bakteriums erfolgt entweder aus einer, bei einer Magenspiegelung (Gastroskopie) oder intraoperativ im Endpräparat entnommenen Gewebeprobe unter dem Mikroskop, über den so genannten Urease-Schnelltest oder durch den C13-Atemtest. Beim Urease-Schnelltest wird das Biopsiematerial aus der Magenspiegelung mit einer harnstoffhaltigen Indikatorflüssigkeit zusammengebracht. Helicobacter produziert ein Enzym, das ihm erlaubt, Harnstoff zu spalten: die Urease. Ist dieses Enzym, und damit auch Helicobacter pylori, in der Gewebeprobe enthalten, verfärbt sich die Indikatorflüssigkeit. Trotzdem ist die Farbänderung zwar ein starker, aber kein hundertprozentig sicherer Nachweis einer Helicobacter-pylori-Infektion.

Deshalb ergänzt ein mikroskopischer Nachweis des Keims diese Untersuchungen. Dieser wurde von den Kollegen des pathologischen Instituts ergänzend durchgeführt.

Der Vorteil des Schnelltests liegt darin, dass oft schon innerhalb einer Stunde nach der Magenspiegelung die Diagnose gestellt und gegebenenfalls eine entsprechende Therapie eingeleitet werden kann. (Daher erfolgte bei den 12 Patienten, deren präoperative Biopsien ebenfalls in dieser Serie untersucht wurden, zusätzlich ein Schnelltest).

2.11. Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen wurden entsprechend der Empfehlung des LRZ München vorgenommen.

2.11.1. Elementare Statistiken und Aufzählungen

Zur einfachen Datenbeschreibung werden die Variablen des Kollektives der Untergruppen u-

PA, u-PAR und PAI-1 als: arithmetisches Mittel
Standardabweichung, Standardfehler, Variationskoeffizienz
Maximum, Minimum
Spannweite und Anzahl der gültigen Fälle
angegeben.

Die Häufigkeitsauszählung aller verschiedenen Werte von u-PA, u-PAR und PAI-1 wird ausgegeben mit Angabe von Maximum, Minimum, arithmetischem Mittel, Varianz und Standardfehler. Des Weiteren wurde das 95% Konfidenzintervall für das arithmetische Mittel definiert.

Bei univarianten Plots wurden die Ergebnisse in Histogrammen wiedergegeben. Bei Paarvergleichen von Variablen wurden Scatterplots verwendet.

2.11.2. Gruppenvergleich

Der Gruppenpaarvergleich wird zum Beispiel beim Vergleich zweier oder mehrerer Überlebenskurven als modifizierter Wilcoxon-Test und log-rank-Test nach Mantel-Cox verwendet.

Beide Tests liefern eine Testgröße χ^2 , die bei größeren Stichprobenumfängen approximativ χ^2 verteilt sind, wobei sich die Anzahl der Freiheitsgrade $f = k-1$ aus der Anzahl k der zu vergleichenden Überlebensfunktion berechnet.

Eine mehrdimensionale Gruppenbeschreibung wurde zur Untersuchung der Abhängigkeiten zwischen den Prozentanteilen der Expression der Antikörper in intraoperativen Geweben angelegt. Für die Biopsien und Zellen im Knochenmark wurden Korrelationsdiagramme (Scatterplots) angefertigt, und zugehörige Regressiongeraden sowie Korrelationskoeffizienten berechnet. Durch Bestimmung dieses Parameters war eine statistische Beschreibung von Art und Grad bestehender Korrelationen möglich. Mittels linearer Regression wurden die Signifikanzen dieser Abhängigkeiten ermittelt.

Mit Hilfe des χ^2 -Tests wurden die Korrelationen zwischen dem quantitativen sowie qualitativen Auftreten von u-PA, u-PAR und PAI-1 in intraoperativen Ergebnissen (Tumorgewebe und Knochenmark) mit den etablierten Risikofaktoren, mit dem Verlauf in der Nachsorge und mit den Ergebnissen in den Biopsien überprüft.

Der χ^2 -Test ist für diskret verteilte Merkmale geeignet, die sich in einer Kontingenztafel anordnen lassen.

Berechnung erfolgt aus:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^l \frac{\left(n_{ij} - \frac{n_{i.} \cdot n_{.j}}{n} \right)^2}{\frac{n_{i.} \cdot n_{.j}}{n}}$$

wobei
k = Zeilen
l = Spalten
ni = Zeilensumme
nj = Spaltensumme
nij = absolute Häufigkeiten

2.11.3. Logistische Regression

Die Durchführung der schrittweisen, logistischen Regression mit,

$$P(y=1) = \frac{e^{g(x)}}{1 + e^{g(x)}} \text{ wobei}$$
$$g(x) = b(0) + b(1) \cdot x(1) + b(2) \cdot x(2) + \dots + b(k) \cdot x(k)$$

für eine dichotome, abhängige Variable und mehrere, unabhängige Variablen $x(1), x(2), \dots, x(k)$ wurde zusätzlich zum einfachen χ^2 -Test verwendet, wenn es sich bei den untersuchten Zielgrößen um binäre Variablen handelte.

2.11.4. Kaplan-Meier-Analyse (Überlebensanalyse)

Die am häufigsten verwendete Methode zur Schätzung der Überlebensfunktion $S(t)$ ist die Kaplan-Meier-Schätzung. Diese wurde in dieser Studie sowohl für das rezidivfreie und Gesamtüberleben verwendet. Die Stichproben wurden über einen Beobachtungszeitraum t betrachtet.

Folgende Faktoren wurden dazu verwendet:

- t_i ($i = 1, 2, \dots, n$) Beobachtungszeiten, der unzensierten Patienten (Eintritt des Ereignisses während des betrachteten Zeitraums)
- d_i Anzahl der Ereignisse zum Zeitpunkt t_i
- n_i Zahl der Patienten, die unmittelbar zu t_i noch beobachtbar sind

Aus diesen Größen wird der Faktor $\pi_i = 1 - (d_i/n_i)$ berechnet, der die bedingte Wahrscheinlichkeit für ein „ereignisfreies Überleben“ des Zeitpunkts t_i ergibt, wenn der Patient unmittelbar vor t_i noch ereignisfrei war.

Die Kaplan-Meier-Schätzung der Überlebensfunktion $S(t)$ ergibt sich dann als Produkt des Faktors π_i .

2.11.5. Uni- und multivariate Berechnung prognostischer Risikofaktoren

Die Bedeutung der prozentualen Expressionen von u-PA, u-PAR und PAI-1 im Operationspräparat, des quantitativen Tumorzellverlaufs im Knochenmark bzw. der u-PAR-Expression auf diesen Zellen univariat und als eigenständige Risikoparameter multivariat wurden im Cox Proportional Hazard Modell ermittelt (Cox D.R. 1972).

Hierbei flossen die, beim Magenkarzinom etablierten Risikofaktoren pT, pN, pM, G, Lymphangiosis carcinomatosa, Lauren-, Borrmannklassifikation, Tumordurchmesser und –lokalisierung (Cardia, Fundus, Corpus oder Antrum) sowie das Operationsverfahren (erweiterte versus nicht erweiterter Resektion) und die chirurgische Radikalität mit ein, sofern sie sich bei einer vorausgehenden, univariaten Cox-Analyse in dem jeweils untersuchtem Subkollektiv als prognostisch signifikant erwiesen hatten. u-PA, u-PAR und PAI-1 im Primärtumor wurden in alle Berechnungen des Cox-Modells einbezogen. Die Klassifizierung erfolgte hierbei nach dem unter 2.5.2. verwendeten Scoring-Modell.

Das relative Risiko wurde mit Hilfe der odds ratio genähert; das zugehörige 95%-Konfidenzintervall (Gardner M.J. et al 1989) mit der Formel:

$$95\%CI = e [\text{Coeff} \pm 1,96 \text{SD}(\text{Coeff})]$$

ermittelt (e = natürliche Zahl, Coeff = vom Cox-Modell berechneter Koeffizient, $\text{SD}(\text{Coeff})$ = Standardabweichung des Koeffizienten).

2.11.6. Signifikanzniveau und verwendete Programme

Für alle statistischen Analysen wurde ein Signifikanzniveau (zweiseitig) von $p=0,05$ angesetzt.

Die Berechnungen erfolgten mit dem SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Version 14.0) und Excel Programm (Microsoft Office 2003).

2.12. Zusammensetzung und Herstellernachweis der verwendeten Reagenzien

2.12.1. Apparative Einrichtungen

Gefriertruhe –80°C,

Cytozentrifuge Universal von Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Zentrifuge Rotixa/RP, Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Lichtmikroskop mit Okular 1:10 und Fotoaparataufsatz mit Objektiven : 1:10, 1:40, 1:100(Ölimmersion), Zeiss, Deutschland

Neubauer Zählkammer, Nr 9161082, Bender&Hobein, Deutschland

Eppendorf-Varipetten 1-10µl, 10-100µl, 200-1000µl (Nr 4810), Eppendorf, Deutschland

Eppendorf-Pipetten 100µl, 500µl, 1000µl (Nr 4815), Eppendorf, Deutschland

Präzisionswaage FX 440, Firma AND, Japan

Schüttelapparat mit Taumelbewegung, Nr 3011, Schubert&Weiss, Schwandorf, Deutschland

Diamantenschreiber, Nr 9032920, Bender&Hobein, Ismaning, Deutschland

PH-Meter, Firma Merck, Deutschland

2.12.2. Färbesysteme/ Färbelösungen

ABC-Kit Kat.-Nr. PK-6100 von Vectastain Burlinghame, USA über Camon Labor Service GmbH, Wiesbaden

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), Nr. A5754, Sigma

Hämalaun, Nr. F-1200, Sigma

Fast Blue BB salt, Nr. F-0250, Sigma, Missouri MO, USA

Levamisol, Nr. L-9756, Sigma, Missouri MO, USA

Auroprobe one Silver enhancement kit, RPN 491, Amersham, Braunschweig, Deutschland

Trypanblau, Nr. 47285, Serva Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland

Neufuchsin, Nr. 30293, Serva Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland

2.12.3. Antikörper

1. Antikörper für Immunhistochemie:

u-PA, monoklonaler IgG 1-Antikörper, Nr. #394, American Diagnostica, New York, USA

u-PAR, monoklonaler IgG 2α-Antikörper, Nr. #3937, American Diagnostica, New York, USA

PAI-1, monoklonaler IgG 1-Antikörper, Nr. #3783, American Diagnostica, New York USA

Sekundärantikörper Maus, monoklonaler IgG 2α, Nr. 702, Vectastain, Burlinghame, USA

2. Isotypenkontrollantikörper:

MOPC 21, monoklonaler IgG 1-Antikörper, Maus, Nr. M7894, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

UPC 10, monoklonaler IgG 2 α -Antikörper, Maus, Nr. M7769, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

3. Antikörper für Immuncytochemie:

CK2 gegen Cytokeratin 18, monoklonaler IgG 1-Antikörper, Maus, Boehringer Mannheim, Deutschland

Rabbit-anti-mouse (R α m), polyklonaler Antikörper, Dako GmbH, Hamburg, Deutschland

2.12.4. Pufferlösungen

PBS (Phosphate buffered saline): 80g NaCl, Nr. 71380, Fluka, Deutschland
2g KCL, Nr. 60130, Fluka, Deutschland
14,5mg di-Na-hydrogenphosphat-dihydrat, Nr. 6580, Merck, Deutschland
2g K-dihydrogenphosphat, Nr. 4873, Merck, Deutschland

gelöst in 10l Aqua dest. Mit einem pH von 7,4

TBS (TRIS buffered saline): 80g NaCl, Nr. 71380, Fluka, Deutschland
6,1g Tris (trishydroxymethylaminomethan), Nr. 8387, Merck, Deutschland
37 ml HCL 1N, Nr. 4617, Merck, Deutschland
n 1l Aqua dest. Auf pH 7,6 eingestellt und auf 10l Aqua dest. verdünnt.

Acetatpuffer: 210ml 0,1N Essigsäure (5,75 ml Eisessigsäure in 1l Aqua dest.), Nr.471861, Merck, Deutschland
790ml 0,1M Natriumacetat (13,61g Natriumacetattrihydrat in 1l Aqua dest.),Nr.543169, Merck, Deutschland

2.12.5. Materialien zur Zellkultur

RPMI 1640, Nr. 041-01870, Gibco, Deutschland

10% FCS, Nr. 11-06290, Gibco, Deutschland

20% Dimethylsulfoxid (DMSO), Nr. 41640, Fluka, Deutschland

Na-Pyruvat, Nr. 043-1360, Gibco, Deutschland

L-Glutamin, Nr. 043-05030, Gibco, Deutschland

Penicillin/Streptomycin Lösung, Nr. 043-05140, Gibco, Deutschland

Transferrin, Nr., 062-03008, Gibco, Deutschland
EGF, Nr. 066-03003, Gibco, Deutschland
Insulin, Nr. 062-03007, Gibco, Deutschland
Hydrocortison, Nr. H-0543, Sigma, Deutschland
Fungizone, Nr. 043-05290, Gibco, Deutschland
EDTA, Nr. 03710, Fluka, Deutschland

2.12.6. Chemikalien

Brij 35, 0%, Nr. 430 AG6, Sigma, Deutschland
Ethanol 100%, Apotheke Klinikum Großhadern
Isopropanol 70%, Apotheke Klinikum Großhadern
Methanol reinst, Apotheke Klinikum Großhadern
2-Methylbutan, Nr. 6056, Merck, Deutschland
Aceton, Nr. 00570, Fluka, Deutschland
Glutaraldehyd, Nr. 5882, Sigma, Deutschland
Kaiser`s Glyceringelatine, Nr. 9242, Merck, Deutschland
N-Dimethylformamid, Nr. 40250, Fluka, Deutschland
Na-nitrit, Nr. 6549, Merck, Deutschland
Naphtol-As-Bi-Phosphat, Nr. N-2250, Sigma, St.Louis, MO, USA
Alcaline-phosphatase-conjugated streptavidin, Nr. 016-050-084, Jackson Immuno Research,
West Grove, PA, USA
Maus-Serum, Nr. X-910, Dako, Hamburg, Deutschland
Dimethylformamid, Nr. D-4254, Sigma, Deutschland
D-biotinyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester, Nr. 1008960, Boehringer,
Mannheim, Deutschland
Ficoll-Hypaque, Dichte 1,077, Nr. 6115, Biochrom KG, Berlin, Deutschland

3. Ergebnisse

3.1. Methodische Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden zwei Immunperoxidase-Färbemethoden verwendet, um zelluläre Antigene zu lokalisieren. Die Avidin-Biotin-Methode (Hsu SM. Et al 1981) und die APAAP-Methode (aus der Arbeit von Herrn Simon) bieten die Möglichkeit, Moleküle auf der Proteinebene in einer Vielzahl von verschiedenen Präparatarten (Kryostatschnitte, Zentrifugenpräparate oder auch mit Formaldehyd fixierte Präparate) in Bezug auf den entsprechenden Zelltyp sichtbar zu machen.

In dieser Studie wurde zur Färbung der immunhistochemischen Kryopräparate die Avidin-Biotin-Komplexfärbung mit Hämatoxylin-Gegenfärbung (HE) verwendet. Die Schnitte erscheinen unter dem Mikroskop als Grundfärbung blau (HE), wobei sich eine positive Zell/Antigenfärbung bräunlich darstellt (siehe Bild.2-8 im Anhang). Ein negatives Präparat hingegen bleibt komplett blau (HE) (siehe Bild.1 im Anhang).

Zur Überprüfung der Reagenzien, aber auch der Arbeitstechnik sind Verfahrenskontrollen und Reagenzkontrollen zur Bestätigung der immunhistochemischen Färberesultate notwendig. Eine Qualitätskontrolle hinsichtlich der Antikörper wird vom Hersteller zwar standardmäßig durchgeführt, wurde aber auch zur Kontrolle der Lagerung der Proben und der Färbetechnik während der Studie stetig beibehalten. Das Ziel ist die Sicherstellung der Antigen-spezifität von primärem und sekundärem Antikörper.

In dieser Studie wurden entsprechend zunächst die für die Primärantikörper u-PA, u-PAR und PAI-1, sowie für den Sekundär (Brücken-)Antikörper idealen Verdünnungen ausgetestet. Die Werte der Hersteller wurden dazu als Orientierungspunkt genommen.

Die Austestung erfolgt im Rahmen einer Verdünnungsreihe anhand zweier Kriterien:

- a) die spezifische Antigenfärbung
- b) die unspezifische Hintergrundfärbung

Das Ziel ist, die größtmögliche Intensität einer spezifischen Anfärbung mit möglichst geringer Hintergrundfärbung zu erreichen. Je höher hierbei die Antikörperverdünnung gewählt wurde, desto geringer erscheint die Hintergrundfärbung.

Als Skala für die Intensität wurden folgende Zeichen verwendet:

- +++ intensiv positiv
- ++ stark positiv
- + positiv
- (+) schwach positiv
- negativ

Die Verdünnungsreihe wurde nach der Schachbrett-Titrationstechnik (Bourne JA 1992) vorgenommen.

Zur Austestung des Sekundärantikörpers wurde der Primärantikörper in dem Verdünnungsbereich gewählt wie vom Hersteller angegeben:

| Sek.Ak.Verd. | Primärantikörperverdünnung | | |
|--------------|----------------------------|-------|--------|
| | 1:400 | 1:800 | 1:1000 |
| 1:10 | +++ | +++ | ++ |
| 1:25 | ++ | ++ | + |
| 1:50 | + | + | + |
| 1:100 | + | - | - |

Tab. 9: Austestungs-Schachbrett zur Testung des Sekundärantikörpers

Aus diesen Ergebnissen mit u-PA als Primärantikörper kristallisierte sich eine Verdünnung von 1:50 als Idealwert für den Sekundärantikörper heraus. Die Verdünnungsreihen zum Sekundärantikörper für u-PAR und PAI-1 werden hier nicht separat aufgeführt, da sie im wesentlichen absolut gleiche Ergebnisse erbrachten und damit auch mit 1:50 verdünnt wurden.

Testung u-PA als Primärantikörper:

| | | Primärantikörperverdünnung u-PA | | | | | | |
|--------------|------|---------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| | | 1:200 | 1:400 | 1:600 | 1:800 | 1:1000 | 1:1200 | 1:1400 |
| Sek.Ak.Verd. | 1:50 | +++ | ++ | ++ | + | (+) | - | - |
| Hintergrund | | ++ | + | (+) | - | - | - | - |

Tab. 10: Austestungs-Schachbrett zur Testung des Primärantikörpers u-PA

Für u-PA ergab sich daraus als idealer Verdünnungsbereich für den Primärantikörper 1:600, 1:800 bei einer Sekundärantikörperverdünnung von 1:50.

Aufgrund der noch dezenten Hintergrundfärbung bei 1:600 wurde die Verdünnung von 1:800 für u-PA als Primärantikörper und 1:50 für den Sekundärantikörper gewählt.

Für den Primärantikörper u-PAR:

| | | Primärantikörperverdünnung u-PAR | | | | | | |
|-------------|------|----------------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1:400 | 1:600 | 1:800 | 1:1000 | 1:1200 | 1:1400 | 1:1600 |
| Sek.Ak.Verd | 1:50 | +++ | ++ | ++ | + | (+) | - | - |
| Hintergrund | | ++ | ++ | + | - | - | - | - |

Tab. 11: Austestungs-Schachbrett zur Testung des Primärantikörpers u-PAR

Als ideale Verdünnung für den Antikörper u-PAR mit optimal, geringer Hintergrundfärbung ergab sich damit das Verhältnis von 1:1000.

Die Verdünnungsreihe für PAI-1:

| | | <i>Primärantikörperverdünnung PAI-1</i> | | | | | | |
|--------------------|-------------|---|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| | | 1:200 | 1:400 | 1:600 | 1:800 | 1:1000 | 1:1200 | 1:1400 |
| Sek.Ak.Verd | 1:50 | +++ | ++ | ++ | + | + | - | - |
| Hintergrund | | ++ | ++ | + | (+) | - | - | - |

Tab. 12: Austestungs-Schachbrett zur Testung des Primärantikörpers PAI-1

Für PAI-1 ergab sich wie für u-PAR als ideale Verdünnung 1:1000.

Um eine Sicherstellung des genau gleichen Testablaufs bei jeder Färbung zu gewährleisten wurden neue Reagenzien im Testprotokoll gekennzeichnet. Bei Neuerwerb verwendeter Antikörper wurde die Verdünnungstestreihe wie oben beschrieben wiederholt.

Um die Spezifität des Primärantikörpers sicherzustellen, wurden bei jedem Färbedurchlauf sowohl eine Positivkontrolle, wie auch eine Negativkontrolle mitgeführt.

Als Negativkontrolle wurde in dieser Studie, bei der alle verwendeten Antikörper (u-PA, u-PAR und PAI-1) monoklonale Antikörper waren, ein ebenfalls monoklonaler Antikörper namens MOPC verwendet, der jedoch eine andere Spezifität besitzt. Diese Kontrolle zeigte bei allen Färbungen eine völlig zweifelsfreie, negative Färbung und bestätigte damit die Sensitivität der Färbung.

Als Positivkontrollen wurden für u-PA und u-PAR Zellkulturen von HT29 und SW403 verwendet, die für beide verwendeten Antikörper eine fast 100% Färbung ergibt. Für die Färbung von PAI-1 wurde eine eindeutig positive Gewebsserie als Positivkontrolle verwendet. Die Positivkontrollen wurden exakt wie die neuen Patientenproben behandelt (Fixierung und Einbettung). Sie zeigten ebenfalls immer ein spezifisch, positives Färbemuster der Mucosa mit Score3.

Ein Nachlassen der Färbung dieser Positivkontrollen diente dann auch als Prüfmuster für die Sensitivität und Qualität der Färbung. Ein Nachlassen der Intensität war ein Indikator für eine zunehmende Inaktivität eines Reagenz im Färbeverfahren. Damit mussten die Färbeserien neu getestet und mögliche verfallene oder in ihrer Aktivität geminderte Reagenzien ausgetauscht werden.

Die Biopsiefärbungen erfolgten in der genau gleichen Technik mit denselben Konzentrationen der Antikörper. Allein die Präparatgröße ist aufgrund der Gewinnungstechnik natürlich begrenzt, wie auch die Anzahl der vorliegenden Präparate. Es waren aber alle Präparate auswertbar. Eine Biopsie war aufgrund des geringen Gewebematerials nur einzeln für jeden Antikörper verwendbar.

3.2. Ergebnisse zum Patientenkollektiv

3.2.1. Allgemeine Ergebnisse

Das Gesamtkollektiv (Tab. 13) bestand aus 104 Fällen mit einem medianen Alter von 64,35 + 11,81 Jahren.

Bei 2 Fällen konnte keine Auswertung stattfinden, so dass die Fälle aus der Gesamtauswertung genommen werden mussten. Es handelte sich bei einem Patienten um einen benignen Funduspolypen mit einer ausgeprägten intestinalen Metaplasie. Das Gewebe im zweiten Fall war bei der Konservierung (Einfrieren) aufgrund von Wassereinlagerungen zerstört worden, so dass eine sinnvolle Auswertung nicht möglich war.

Bei 83 Patienten (79,8%) wurde in diesem Kollektiv eine R0 – Resektion im Sinne einer primär kurativen Resektion durchgeführt. Bei 19 Patienten (18,3%) konnte nur eine R1/2 – Resektion durchgeführt werden.

Die OP – Letalität betrug 3%.

Im Beobachtungszeitraum verstarben 56,7% (n=59) der Patienten, davon 55,8% (n=58) tumorbedingt, davon 50,3% (n=42) in der R0 – Gruppe (davon 9 mit Peritonealkarzinose, 20 mit Lokalrezidiv und 13 durch Fernmetastasen) und 89,5% (n=17) in der R1/R2 – Gruppe (hier war die Peritonealkarzinose die führende Diagnose).

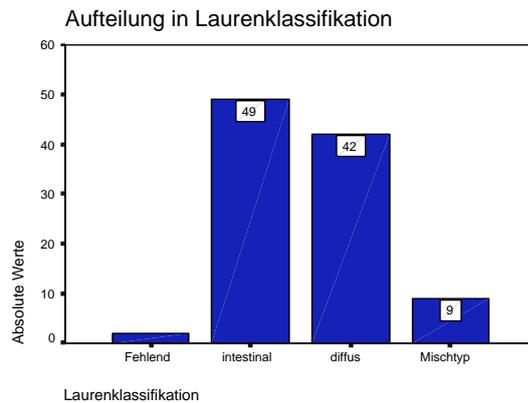
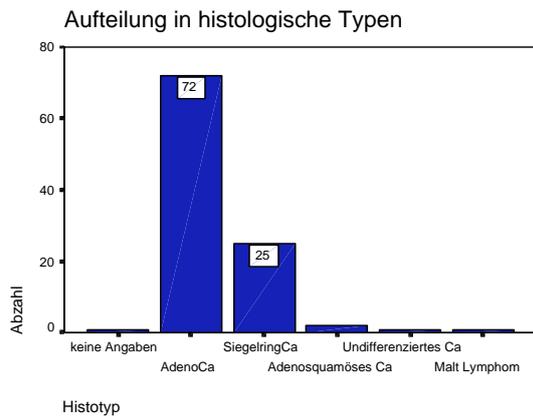
Der Zeitraum bis zum Rezidiv betrug im Durchschnitt 9,4 + 10,17 Monate.

Ein Lokalrezidiv trat hierbei in 26 Fällen auf, eine Metastasierung in 53 Fällen.

| | Immunhisto./ Op-Präp | Immunhisto.Biopsien |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Gesamtzahl | 104 | 12 |
| R0 | 83 | 12 |
| R1/R2 | 19 | 0 |
| Alter median (in Jahren) | 64,35 (± 11,81) | 62,83 (± 11,90) |
| Op Letalität | 3 | 0 |
| Tod R0 | 42 | 3 |
| Tod R1/2 | 17 | 0 |
| tumorbedingt | 58 | 3 |
| Zeit bis Rezidiv (in Monaten) | 9,4 (± 10,17) | 12,3 (± 12,9) |
| Lokalrezidiv | 26 | 1 |
| Metastasierung | 53 | 3 |

Tab. 13: Darstellungsüberblick des Gesamtkollektives

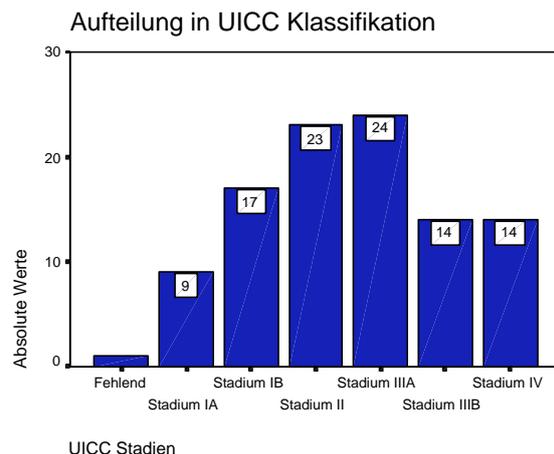
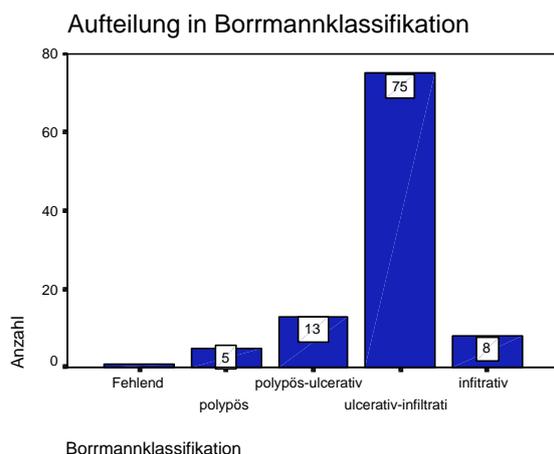
In der histologischen Klassifikation des Magenkarzinoms im Kollektiv ergab sich mit einem Anteil von 71 % an Adenokarzinomen eine Verteilung wie sie in der WHO-Klassifikation beschrieben wird. Der Anteil an Siegelringzellkarzinomen ist in diesem Kollektiv mit 24% jedoch höher.



Tab. 14 und 15: Klassifikationen nach WHO und Lauren

In der Laurenklassifikation überwiegen 49 Patienten, und damit mit 48% der Fälle, die mit intestinalem Typ, dem eine bessere Prognose zugesprochen wird. Der diffuse Typ ist mit 40% vertreten. Der mit 9 Fällen vertretene Mischtyp entspricht prognostisch dem diffusen Typ. (Riede U.N. et al 1993)

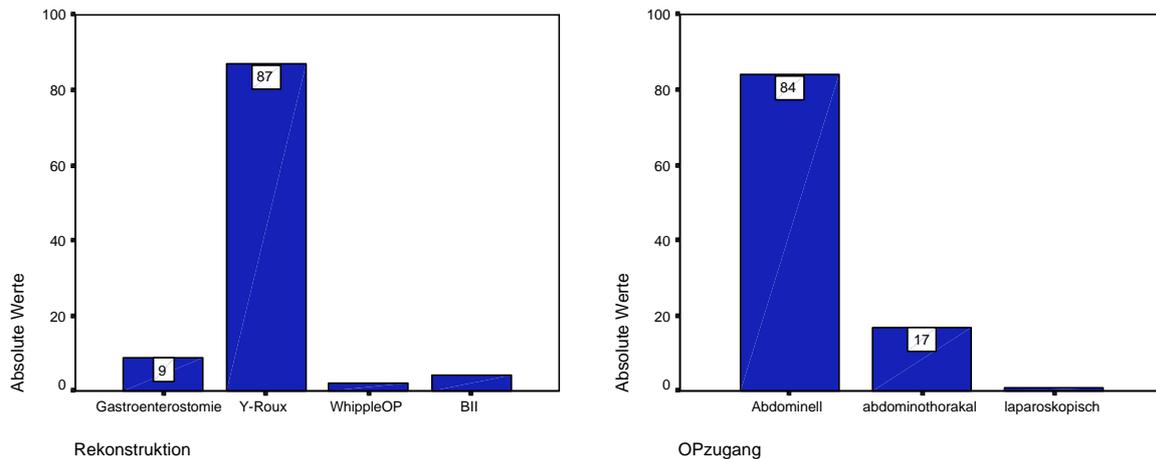
In der Klassifikation nach Borrmann (Tab. 4) werden die Typen I und II (polypös, polypös-ulzerativ) am ehesten dem intestinalen Typ zugesprochen, während der Typ III und IV in seiner Prognose und makroskopischer Erscheinungsform am ehesten dem diffusen Typ ähnelt. Der ulzerativ-infiltrative Typ findet jedoch in dieser Studie mit 74% die Mehrheit.



Tab. 16 und 17: Klassifikationen nach Borrmann und UICC

In der Häufigkeitsverteilung der Patienten in der UICC - Klassifikation finden sich in den Stadien II und IIIA der größte Anteil mit 22,5% und 23,5%. Jedoch ist die Gesamtverteilung hier eher gleichmässig gruppiert.

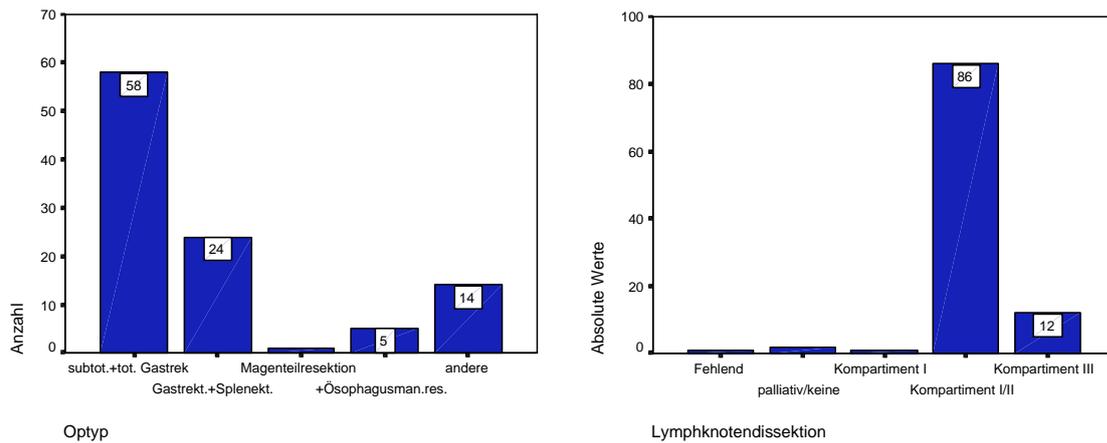
In der Klassifikation der Operationsstatistika dieser Studiengruppe fanden sich 87 Rekonstruktionen nach Y – Roux. Bei neun Patienten wurden Gastroenterostomien durchgeführt. Bei vier Patienten konnte eine Operation nach Billroth II durchgeführt werden. Zwei weitere Patienten mussten auf Grund ihres fortgeschrittenen Tumorstadiums einer Operation nach Whipple unterzogen werden.



Tab. 18 und 19: Rekonstruktionsarten und operative Zugangswege im Kollektiv

In diesem Kollektiv kam es zu einer abdominalen Resektion in 84 Fällen, in 17 Fällen wurde primär thorako-abdominell reseziert, bzw. musste thorakal erweitert werden, da die oberen Resektionsränder nach histologischer Schnellschnittuntersuchung nicht tumorfrei waren. In zwei Fällen wurde bei nicht klarem Tumorausmaß primär als diagnostische Laparotomie begonnen. Nach Feststellung der Operabilität wurde auf eine offene Operationstechnik umgestellt und eine Resektion durchgeführt.

Bei der Einteilung in die Operationstypen (Tab.20) fanden sich in diesem Kollektiv 58 Patienten, bei denen eine subtotale oder totale Gastrektomie durchgeführt werden musste. In 24 Fällen kam zur Gastrektomie noch eine Splenektomie dazu. Zwei Patienten bedurften aufgrund eines relativ kleinen, lokalisierten Tumorbefundes im Magenausgangsbereich nur einer Magenteilresektion. Bei fünf Patienten musste die Operation zusätzlich durch eine weit in den Thorax reichende Ösophagusmanschettenresektion ausgedehnt werden. In den restlichen 14 Fällen waren ausgedehntere Resektionen im Sinne einer erweiterten Gastrektomie, mit z.B. Pankreaslinksresektion, Querkolonresektion, Whipple'scher Operation, Leberteileresektion, Cholezystektomie, usw. nötig.



Tab. 20 und 21: Operationstyp und Kompartimente der Lymphknotendissektion

Wie auch von der WHO empfohlen, wurden in den meisten Fällen, 85,8 %, dieser Studie eine Lymphadenektomie der Kompartimente I und II durchgeführt. In 11,7 % wurden zusätzlich Regionen des Kompartiments III, bei Verdacht auf Lymphknotenmetastasen mit disseziert. In den restlichen Fällen, bis auf den Patienten, bei dem kein Tumor nachgewiesen werden konnte, war ein palliatives Vorgehen auf Grund des fortgeschrittenen Tumorleidens vorgenommen worden (Tab.20)

3.2.2. Ergebnisse zur Immunhistochemie

Aus dem Gewebe von 102 Patienten konnten immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden. Wie bereits im Methodenteil beschrieben, wurden die Präparate nach ihrer Anfärbestärke in Scores eingeklassifiziert. In dieser Arbeit fand sich für die drei Antikörper meist eine Membranfärbung oder eine cytoplasmatische Färbung mit einer klaren Membrankomponente (siehe Abbildungen 2-8). Diese Befunde sind schon in Vorstudien beschrieben und definiert worden (Heiss M.M. et al 1995).

| | u-PA | u-PAR | PAI-1 |
|--------|------|-------|-------|
| Score0 | 9 | 12 | 10 |
| Score1 | 29 | 46 | 36 |
| Score2 | 41 | 36 | 36 |
| Score3 | 23 | 8 | 20 |

Tab. 22: Scoring Immunhistochemie Tumorgewebe

Neun von den 102 Tumorgeweben für u-PA waren negativ (score0), 12 für u-PAR und 10 für PAI-1. Den score1 zeigten 29 Fälle für u-PA, 46 für u-PAR und 36 für PAI-1; 41 Fälle zeigten den score2 für u-PA, 36 für u-PAR und PAI-1; Den score3 wiesen 23 für u-PA, 8 für u-PAR und für 20 PAI-1 auf (Tabelle 22).

Wie schon in den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beschrieben, zeigten sich auch in tumornahen Makrophagen (Stromazellen) und wenigen normalen epithelialen Zellen eine Expression von u-PA-Parametern. Normales Gewebe im resezierten Anteil war wie in der ersten Serie nicht positiv.

In 98 von 102 Fällen konnte das normale Gewebe ebenso gefärbt und hinsichtlich Besonderheiten wie eine intestinale Metaplasie untersucht werden. Hier wiederum zeigte sich im Gegensatz zum normalen Gewebe eine Färbung für u-PA, u-PAR und PAI-1, als zytoplasmatische Färbung mit einer zusätzlichen Membrankomponente (Bild 7 und 8). In diesem Kollektiv zeigte sich in 31 Fällen eine intestinale Metaplasie im tumorfernen Gewebe.

| | u-PA | u-PAR | PAI-1 |
|--------|------|-------|-------|
| Score0 | 3 | 13 | 2 |
| Score1 | 6 | 8 | 3 |
| Score2 | 16 | 8 | 13 |
| Score3 | 6 | 2 | 13 |

Tab. 23: Scoring Immunhistochemie an der intestinalen Metaplasie im tumorfernen Gewebe

Drei von den 31 Metaplasien in Normalgeweben für u-PA waren mit score0, 13 für u-PAR und 2 für PAI-1 negativ. Score1 zeigten 6 Fälle für u-PA, 8 für u-PAR und 3 für PAI-1; 16 Patienten wiesen score2 für u-PA, 8 für u-PAR und 13 für PAI-1 auf und Score3 zeigten 6 Patienten für u-PA, 2 für u-PAR und 13 für PAI-1 (Tabelle 23).

Zusätzlich wurden bei 12 Patienten präoperativ gastrokopisch Biopsien gewonnen. Alle Patienten kamen aus der Gruppe des R0 – resezierten Kollektives.

Eine Infektion des Magens mit *Helicobacter pylori* zeigte sich in 36 der 102 Fälle.

Aus der Arbeit von Herrn Simon stammen die folgenden Zahlen aus der Einzel- und Doppelfärbung für disseminierte Tumorzellen im Knochenmark.

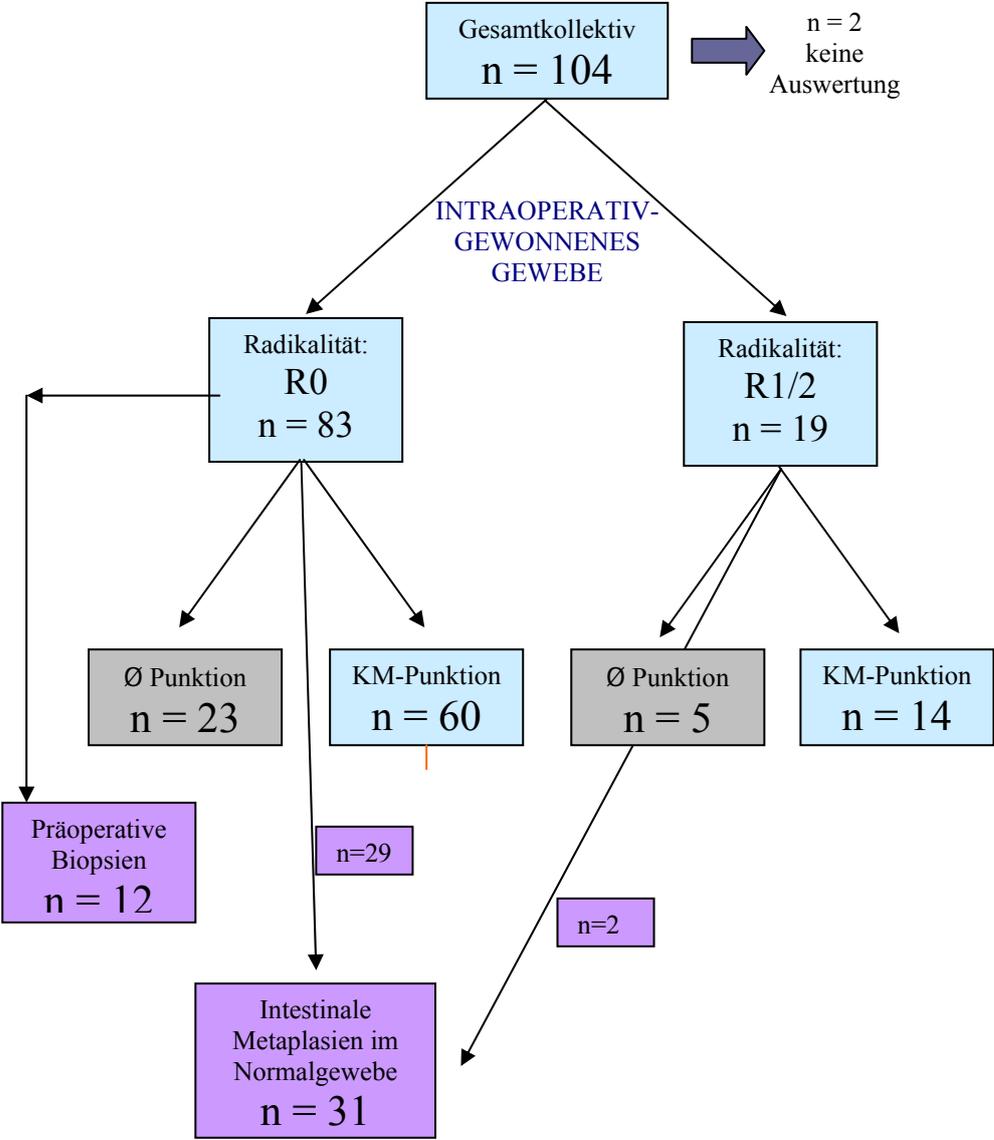
Knochenmarkpunktionen konnten nach präoperativer Aufklärung bei 74 Patienten (71,2%) erfolgen (n=60), in der Gruppe der R0 – resezierten, n=14 bei den R1/2 – resezierten)

CK18 positive Zellen in den intraoperativen Knochenmarkpunktionen fanden sich bei 21 von 60 Patienten (35%) im R0 – resezierten Kollektiv vs. 12 von 19 Patienten (63,2%) im R1/2 – resezierten Kollektiv.

Bei n=33 Patienten (31,7%), die in der Primärpunktion positiv waren, führten wir zusätzlich die immunocytochemische Doppelfärbung hinsichtlich der Expression von u-PAR auf disseminierten Tumorzellen durch.

Hierbei zeigten sich ebenfalls in der Doppelfärbung 31 Patienten mit positiven Zellen und nur bei zwei Patienten kam es zu einem negativen Ergebnis.

Eine Übersicht über die Fallzahlen zu den durchgeführten Untersuchungen findet sich in Tabelle 24.



3.3. Korrelation des Gesamtkollektives mit etablierten Tumor-Charakteristika, Helikobacter pylori, der intestinalen Metaplasie und den disseminierten Tumorzellen im Knochenmark

Nimmt man die Ergebnisse aus den immunhistochemischen Färbungen zu den Komponenten des u-PA-Systems und setzt sie in Korrelation mit den klinisch etablierten Tumorcharakteristika, so ergibt sich eine signifikant positive Korrelation (chi-square Test) für die PAI-1 Färbung (score 0-3) im Tumorgewebe der 102 Patienten mit der pT Klassifikation ($p=0,034$) und mit der UICC-Klassifikation ($p=0,001$) (Tabelle 26)

Für u-PA zeigte sich keine signifikante Korrelation mit einer der etablierten Tumorcharakteristika.

u-PAR hingegen zeigte eine signifikante positive Assoziation mit M ($p=0,020$) und G ($p=0,022$). u-PA, u-PAR und PAI-1 zeigen untereinander eine starke statistische Assoziation im Primärtumor mit $p>0,001$.

| Tumor-charakteristika | P (chi-square) u-PA | P (chi-square) u-PAR | P (chi-square) PAI-1 |
|----------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| T | n.s. | n.s | 0,034 |
| N | n.s | n.s | n.s |
| M | n.s | 0,020 | n.s |
| G | n.s | 0,022 | n.s |
| R | n.s | n.s | n.s |
| UICC | n.s | n.s | 0,001 |
| Lauren | n.s | n.s | n.s |
| Bormann | n.s | n.s | n.s |
| Präsenz von HP | 0,238 | 0,014 | <0,001 |
| Intestinale Metaplasie | 0,013 | 0,006 | 0,030 |
| CK 18 pos. Zellen im KM | n.s | n.s | n.s |
| u-PAR auf CK18 pos. Zellen im KM | 0,009 | 0,014 | n.s |

Tab. 26: Korrelation des u-PA-Systems mit den Ergebnissen aus den immunhistochemischen Färbungen

Als Besonderheiten in diesem Kollektiv fielen eine Korrelation zwischen der Präsenz von Helicobacter pylori und einer hohen Expression von u-PAR ($p=0,014$) und PAI-1 ($p=0,001$) im resezierten Tumorgewebe auf.

Ebenso auffällig war eine positive Färbung für u-PA ($p=0,013$), u-PAR ($p=0,006$) und PAI-1 ($p=0,030$) im Tumorgewebe in Korrelation mit dem Auftreten einer intestinalen Metaplasie im tumorfernen Normalgewebe (Tabelle 26).

Es wurde keine Korrelation des u-PA-Systems mit dem Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark gefunden werden. Jedoch zeigte sich eine signifikante Assoziation von u-PA ($p=0,009$) und u-PAR ($p=0,014$) im Primärtumor mit der Expression von u-PAR auf den disseminierten Tumorzellen. Dies spricht für eine biologische Positiv-Selektion von u-PA-System-exprimierenden Tumorzellen bei der Dissemination.

3.4. Univariate Bestimmung der Prognose des u-PA-Systems im Gesamtkollektiv

In der Kaplan-Meier Analyse zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen einer steigenden u-PA Expression im Primärtumor (score 0-3) und einer negativen Entwicklung für das rezidivfreie Überleben ($p < 0,0001$) (Abb. 11) im Kollektiv der R0 resezierten Patienten. Für das Gesamtüberleben zeigte sich diese Assoziation ebenso, für das Gesamtkollektiv mit $p = 0,002$ (Abb. 10), wie auch für das Kollektiv der R0-Patienten ($p < 0,001$). Der Nachweis von u-PAR korrelierte in Tendenz mit Rezidiv und Überleben, dies war jedoch nicht signifikant.

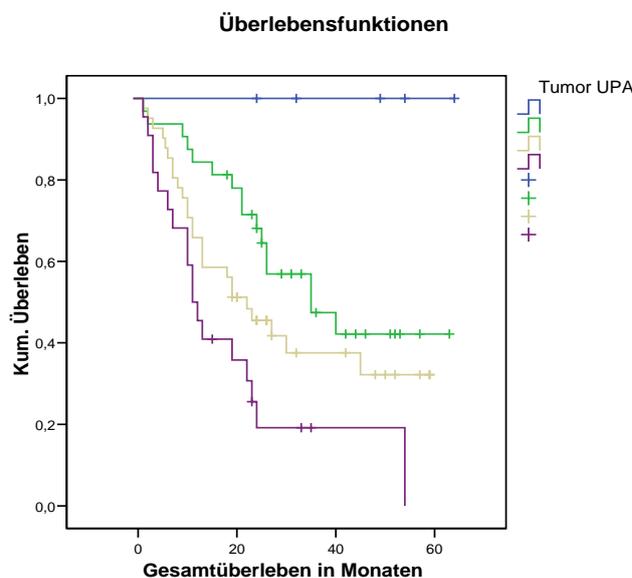


Abb. 10: Kaplan Meier Analyse des Gesamtüberlebens (aller 102 Patienten) in Abhängigkeit von der immunhistochemischen Färbung für u-PA ($p = 0,002$)

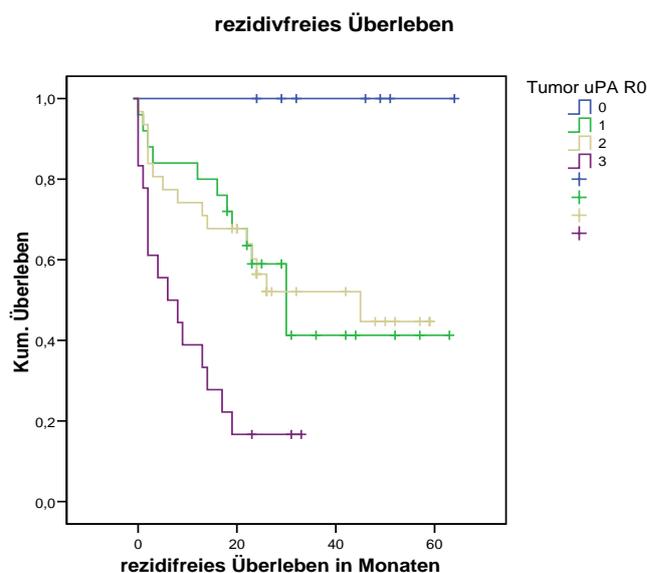


Abb. 11: Kaplan Meier Analyse des Gesamtüberlebens (der 83 R0 resezierten Patienten) in Abhängigkeit von der immunhistochemischen Färbung für u-PA ($p < 0,001$)

Für die PAI-1 Färbung konnte eine hochsignifikante Korrelation mit dem rezidivfreien (p<0,001) (Abb. 13) und Gesamtüberleben im R0 Kollektiv (p<0,001) und im Gesamtkollektiv (p<0,001) (Abb. 12) gezeigt werden.

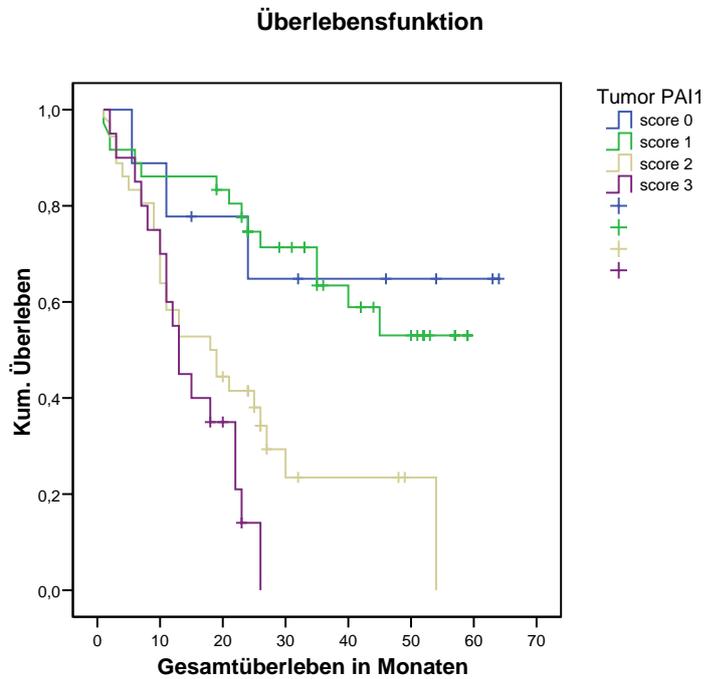


Abb. 12: Kaplan Meier Analyse des Gesamtüberlebens (aller 102 Patienten) in Abhängigkeit von der immunhistochemischen Färbung für PAI-1 (p<0,001)

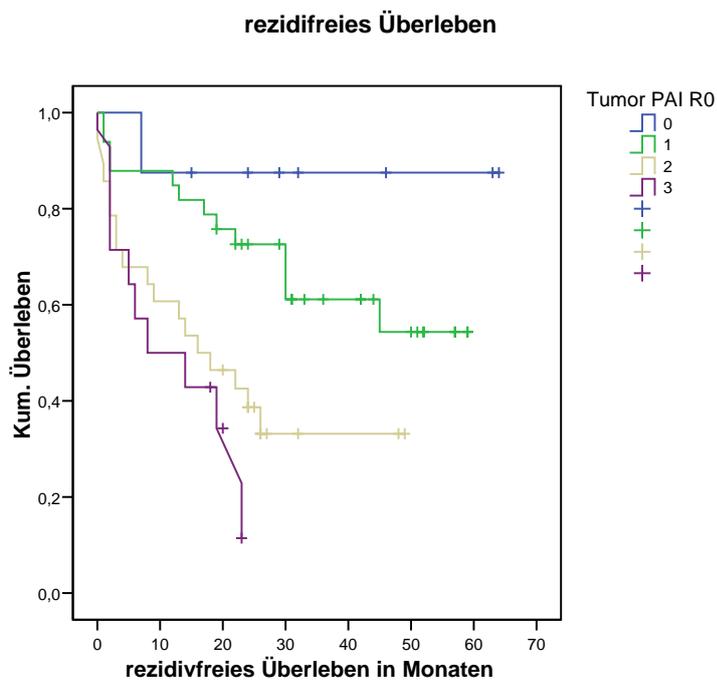


Abb. 13: Kaplan Meier Analyse des Gesamtüberlebens (der 83 R0 resezierten Patienten) in Abhängigkeit von der immunhistochemischen Färbung für PAI-1 (p<0,001)

3.5. Multivariate Bestimmung der Prognose des u-PA-Systems im Gesamtkollektiv

Zur Überprüfung der unabhängigen Aussagekraft des u-PA-Systems (u-PA, u-PAR und PAI-1) wurde unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren beim Magenkarzinom (pT, pN, pM, Tumorgrading, pR, Laurenklassifikation, Borrmann-Klassifikation und UICC) eine Multivarianzanalyse durchgeführt.

Diese Betrachtung wurde nun sowohl im Kollektiv der kurativ resezierten Patienten (n=83), wie auch im Gesamtkollektiv (n=102) durchgeführt.

Für das rezidivfreie Überleben kristallisierten sich im R0 Kollektiv u-PA und PAI-1 als unabhängige, dominante Parameter heraus (u-PA: p=0,050; hazard ratio=1,301, 95% CI= 0,900-1,882, PAI-1 p=0,001; hazard ratio=1,1812, 95% CI 1,257-2,612) (Tabelle 27).

| Charakteristika | P | HR | 95% CI |
|-----------------|-------|--------|-------------|
| T | n.s. | | |
| N | | | |
| M | | | |
| R | | | |
| u-PA | 0,050 | 1,301 | 0,900-1,882 |
| u-PAR | | | |
| PAI-1 | 0,001 | 1,1812 | 1,257-2,612 |

Tab. 27: Multivarianzanalyse im R0 Kollektiv (n=83)

Für das Gesamtüberleben im R0 Kollektiv (Tabelle 28a.), aber auch im Gesamtkollektiv unter Berücksichtigung der chirurgischen Radikalität als entscheidender Risikofaktor, erwies sich PAI-1 als unabhängiger Prädiktor für ein ungünstiges Gesamtüberleben (p=0,031, hazard ratio=1,919, 95% 1,084-5,643 (Tabelle 28a.); p=0,003, hazard ratio=1,62, 95% CI=1,18-2,21(Tabelle 28b.)).

| Charakteristika | P | HR | 95% CI |
|-----------------|-------|-------|-------------|
| T | 0,050 | 1,197 | 1,115–2,703 |
| N | n.s. | | |
| M | n.s. | | |
| R | n.s. | | |
| u-PA | n.s. | | |
| u-PAR | n.s. | | |
| PAI-1 | 0,031 | 1,919 | 1,084–5,643 |

Tab. 28a: Multivarianzanalyse im R0 Kollektiv (n=83) für das Gesamtüberleben

| Charakteristika | P | HR | 95% CI |
|-----------------|-------|-------|-------------|
| T | n.s. | | |
| N | n.s. | | |
| M | n.s. | | |
| R | 0,006 | 1,249 | 0,853-1,798 |
| u-PA | n.s. | 1,192 | 0,903-1,571 |
| u-PAR | n.s. | | |
| PAI-1 | 0,003 | 1,619 | 1,184-2,213 |

Tab. 28b: Multivarianzanalyse im Gesamtkollektiv (n=102) für das Gesamtüberleben

3.6. Korrelation der Aussagekraft präoperativ gewonnener Biopsien

In einer Untergruppe von 12 Patienten dieser Arbeit führten wir im Rahmen der routinemäßigen, präoperativen Gastroduodenoskopie eine Biopsieentnahme durch.

Die Biopsien wurden aus dem Tumorgewebe und dem tumorfernen Normalgewebe entnommen (im Mittel 5,5mal, das entsprechen 4-7 Biopsien pro Patient).

Danach wurden diese Biopsien wie die postoperativen Gewebe aufgearbeitet, wie alle anderen perioperativ entnommenen Gewebe immunhistochemisch gefärbt und einem analogen Scoringssystem zur Auswertung unterzogen.

In der Gruppe dieser 12 Patienten mit dem Mittel von 5,5 Biopsien pro Patient zeigte sich eine signifikante Korrelation (Pearson) zwischen den Färbescores des postoperativen Tumorgewebes mit den Scores der präoperativen Biopsien:

Es ergab sich für u-PA (p=0,019), u-PAR (p=0,043) und PAI-1 (p=0,022) jeweils eine signifikante Korrelation (Tabelle 29).

Damit erzielten die präoperativen Biopsien im Vergleich zu den postoperativen Gewebeproben ein vergleichbares Ergebnis.

| | $\mu \pm \sigma$ | Pearson (p) |
|-------|------------------------------------|-------------|
| u-PA | 1,78 \pm 0,89 1,58 \pm 0,79 | 0,019 |
| u-PAR | 1,41 \pm 0,79 1,38 \pm 0,79 | 0,043 |
| PAI 1 | 1,66 \pm 0,9 1,50 \pm 1,0 | 0,022 |

Tab. 29: Pearsonverteilung im Vergleich Biopsie versus postoperatives Gewebe

3.7. Bedeutung der intestinalen Metaplasie im tumornahen Normalgewebe

Eine weitere Auffälligkeit in diesem Kollektiv kristallisierte sich bei der Untersuchung der 98 tumorfernen Normalgewebeproben der 102 Gesamtpatienten heraus. Bei dieser Untersuchung fand sich im tumorfernen Normalgewebe in 31 Fällen eine ausgeprägte intestinale Metaplasie.

In der Differenzierung nach der Laurenklassifikation ergab sich beim intestinalen Typ in 17 von 31 Fällen (53,1%) eine intestinale Metaplasie, beim diffusen Typ in 11 von 30 (37,5%), und beim Mischtyp 3 von 5 Fällen (37,5%). Bei einer Gesamtzahl von 31 positiven Fällen (31,7%) und fanden sich in 67 (68,3%) der Fälle keine intestinale Metaplasie.

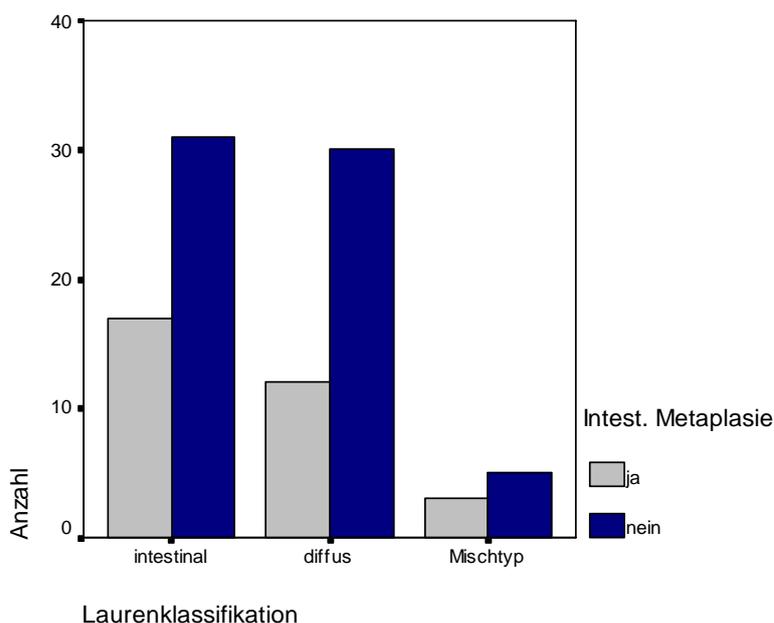
(siehe Graphik und Tabellenaufschlüsselung 30, 31)

Diese Gewebe wurden ebenfalls einer immunhistochemischen Untersuchung auf die Faktoren des Urokinasesystems (u-PA, u-PAR und PAI-1) unterzogen.

(siehe Bild 6 im Anhang)

| Laurenklassifikation | Intestinale Metaplasie im tumorfreien Normalgewebe | |
|---------------------------------------|--|-----------|
| | Ja | Nein |
| Intestinaler Typ (n) | 17 | 31 |
| a) bezogen auf Lauren (%) | 35,4 | 64,6 |
| b) bezogen auf intest. Metaplasie (%) | 53,1 | 47,0 |
| c) bezogen auf Gesamt (%) | 17,3 | 31,6 |
| Diffuser Typ (n) | 11 | 31 |
| a) bezogen auf Lauren (%) | 28,6 | 71,4 |
| b) bezogen auf intest. Metaplasie (%) | 37,5 | 45,5 |
| c) bezogen auf Gesamt (%) | 12,2 | 30,6 |
| Mischtyp (n) | 3 | 5 |
| a) bezogen auf Lauren (%) | 37,5 | 62,5 |
| b) bezogen auf intest. Metaplasie (%) | 9,4 | 7,6 |
| c) bezogen auf Gesamt (%) | 3,1 | 5,1 |
| Gesamtzahl (n) / (%) | 31 / 31,7 | 67 / 68,3 |

Tab. 30: Verteilung von intestinalen Metaplasien im korrespondierenden Normalgewebe im Kollektiv bezogen auf die Laurenklassifikation



Tab. 31: Graphische Darstellung des Auftretens der intestinalen Metaplasie innerhalb von Subtypen der Laurenklassifikation

3.7.1. Korrelation der intestinalen Metaplasie mit etablierten Tumor-Charakteristika

Vergleicht man das Vorkommen der intestinalen Metaplasie im tumorfernen Normalgewebe mit den etablierten Tumorcharakteristika, so zeigt sich der Phänotyp des Adenokarzinoms als signifikant assoziiert ($p=0,003$, chi-square), ebenso der intestinale Typ der Laurenklassifikation ($p<0,001$, chi-square). Weiterhin zeigt sich eine signifikante Assoziation zwischen der intestinalen Metaplasie im tumorfernen Normalgewebe mit fortgeschrittenen pT-Studien ($p=0,026$, chi-square) und der Radikalität der Operation R ($p=0,046$, chi-square) (Tabelle 32).

| Tumor-charakteristika | P (chi-square) Intestinale Metaplasie |
|--------------------------------------|--|
| T | 0,026 |
| N | n.s |
| M | n.s |
| G | n.s |
| R | 0,046 |
| UICC | n.s |
| Lauren (intestinaler Typ) | 0,001 |
| Lauren (diffuser, Mischtyp) | n.s |
| Bormann | n.s. |
| Histopathologie (Adenokarzinom) | 0,003 |
| Histopathologie (alle anderen Typen) | n.s. |

Tab. 32: Chi-square für die Korrelation etablierter Tumorcharakteristika mit der intestinalen Metaplasie

3.7.2. Korrelation der intestinalen Metaplasie dieses Kollektives mit dem u-PA-System, der Helicobacter pylori Infektion und den disseminierten Tumorzellen im Knochenmark

Die Gegenwart einer intestinalen Metaplasie im tumorfernen Normalgewebe war korrelierte signifikant mit einer positiven Färbung für u-PA ($p=0,013$, chi-square), u-PAR ($p=0,006$, chi-square) und PAI-1 ($p=0,030$, chi-square) im resezierten primären Tumorgewebe.

Außerdem zeigt sich eine Assoziation zwischen der intestinalen Metaplasie und der Präsenz von Helicobacter pylori in diesem Kollektiv ($p<0,001$, chi-square).

Eine Assoziation von Metaplasien mit den disseminierten Tumorzellen im Knochenmark oder der u-PAR Präsentation auf diesen Zellen ließ sich jedoch nicht zeigen (Tabelle 33).

| Charakteristika | P (chi-square) Intestinale Metaplasie |
|----------------------------------|--|
| u-PA | 0,013. |
| u-PAR | 0,006 |
| PAI-1 | 0,030 |
| Präsenz von HP | 0,001 |
| CK 18 pos. Zellen im KM | n.s |
| u-PAR auf CK18 pos. Zellen im KM | n.s. |

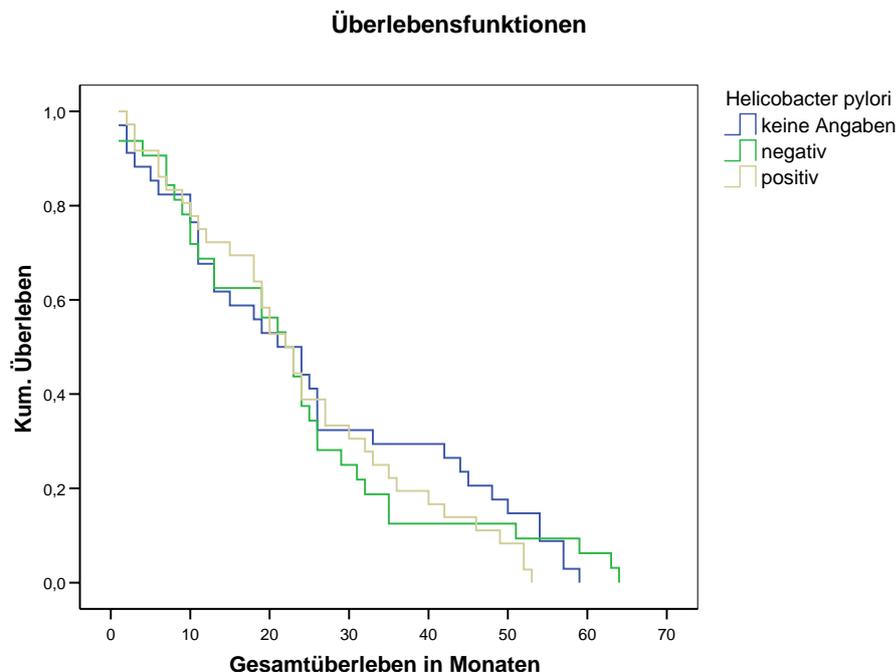
Tab. 33: Korrelation der intestinalen Metaplasie mit dem u-PA-System, HP und den disseminierten Tumorzellen im Knochenmark

3.7.3. Prognostische Bedeutung des Auftretens von helicobacter pylori und intestinalen Metaplasien

In der Kaplan-Meier Analyse (Mantel-Cox log-rank Test) zeigte sich für den Nachweis von Helicobacter pylori keine Assoziation mit dem rezidivfreien ($p=0,959$) oder dem Gesamtüberleben ($p=0,773$).

Ähnliches gilt für den Nachweis einer intestinalen Metaplasie im tumorfernen Normalgewebe.

Hier fand sich weder für das rezidivfreie Überleben ($p=0,855$) noch für das Gesamtüberleben ($p=0,595$) eine signifikante Korrelation.



Überlebensfunktionen

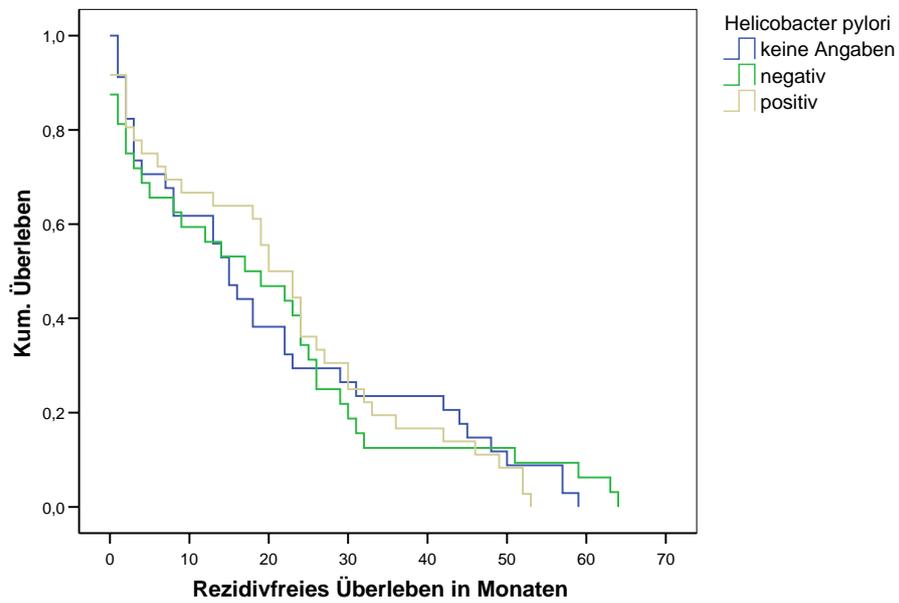
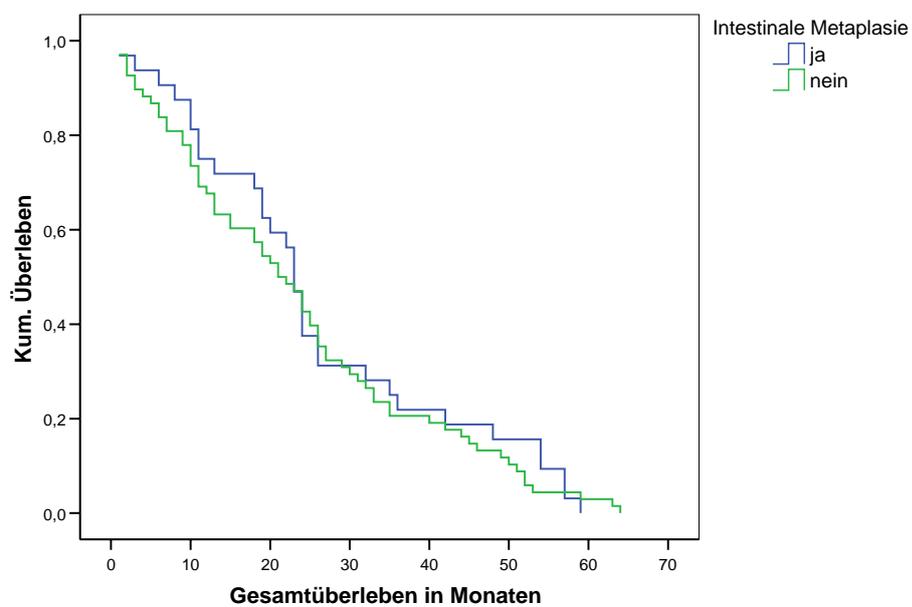


Abb. 14: Kaplan-Meier Analyse für den Nachweis von HP für das rezidivfreie und Gesamtüberleben

Überlebensfunktionen



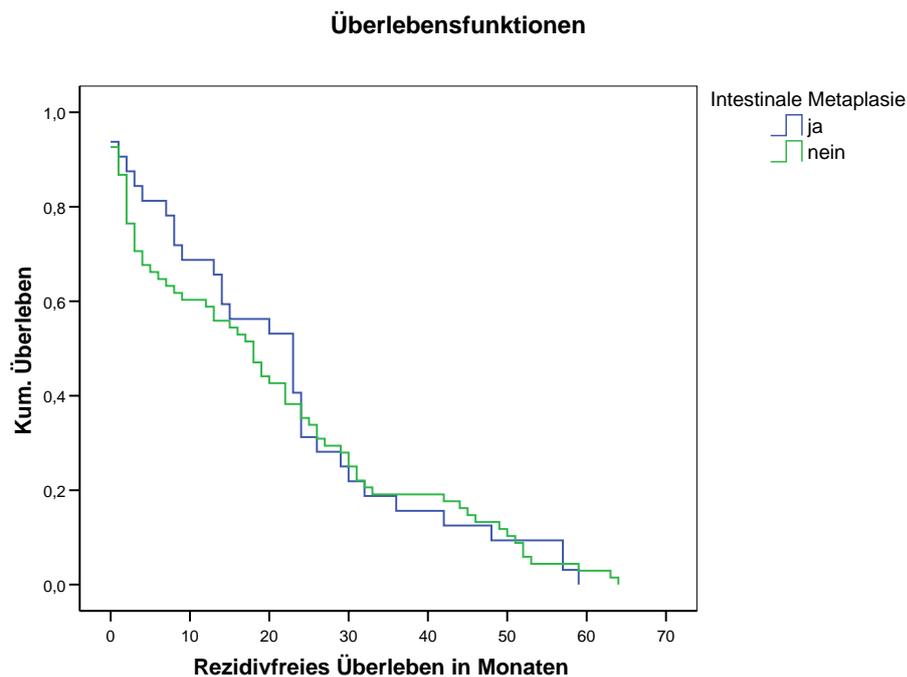


Abb. 15: Kaplan-Meier Analyse für den Nachweis einer intestinalen Metaplasie im tumorfernen Normalgewebe für das rezidivfreie und Gesamtüberleben

3.7.4. Die Korrelation und prognostische Bedeutung des u-PA-Systems in der intestinalen Metaplasie

Korreliert man die Faktoren des Urokinasesystems (u-PA, u-PAR und PAI-1) in der immunhistochemischen Färbung der intestinalen Metaplasie (Tabelle 34) mit etablierten Faktoren, wie der Präsenz einer *Helicobacter pylori*-Infektion, dem Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark, und der Expression von u-PAR auf den disseminierten Tumorzellen, ergeben sich einige weitere signifikante Assoziationen. In der Metaplasie (31 Fälle) korrelierte die u-PA Färbung signifikant mit dem Nachweis von u-PAR ($p=0,034$), nicht aber von PAI-1.

Dagegen ergab sich für eine starke u-PAR Färbung eine Assoziation mit einer hohen PAI-1 Expression in der intestinalen Metaplasie ($p=0,048$). Zusätzlich korrelierte eine starke u-PAR-Färbung in der intestinalen Metaplasie mit einem fortgeschrittenen pN- ($p=0,030$) und pT- ($p=0,048$) Status. Für die PAI-1 Expression in der intestinalen Metaplasie stellte sich eine signifikant positive Korrelation mit dem pT-Status ($p=0,025$) heraus.

Eine hohe Expression von u-PAR in der intestinalen Metaplasie korrelierte zusätzlich signifikant mit einer *Helicobacter pylori*-Infektion ($p=0,020$).

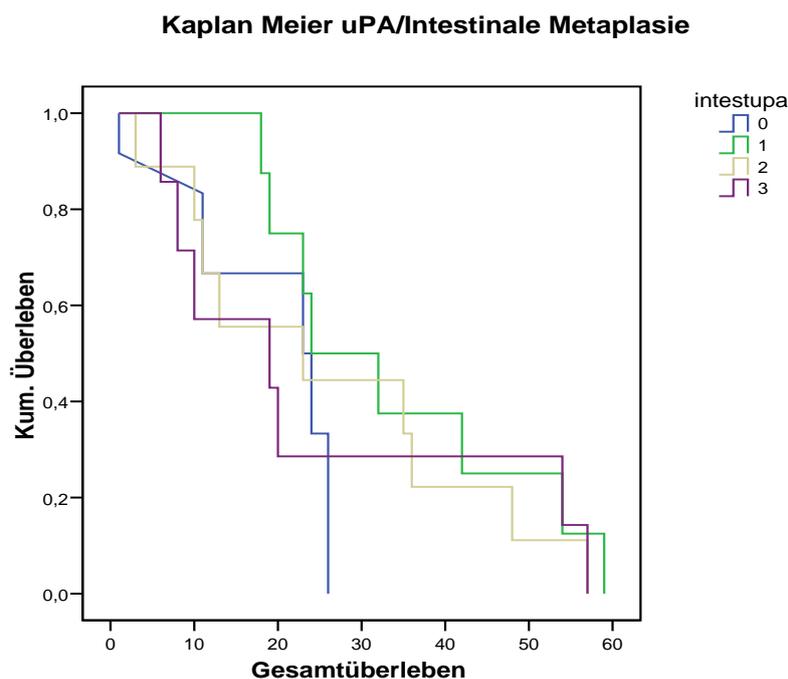
Für den Nachweis des Urokinasesystems (u-PA, u-PAR und PAI-1) in der intestinalen Metaplasie zeigte sich keinerlei Korrelation zum Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark, und ebenso keine Assoziation mit der Expression von u-PAR disseminierten Tumorzellen.

Die Laurenklassifikation war nicht mit dem Nachweis des u-PA-Systems in intestinalen Metaplasien assoziiert.

| Tumor- charakteristika | P (chi-square) u-PA in intestinale Metaplasie | P (chi-square) u-PAR in intestinale Metaplasie | P (chi-square) PAI-1 in intestinale Metaplasie |
|-------------------------------------|--|---|---|
| u-PA (intest. Met.) | - | 0,034 | n.s. |
| u-PAR (intest. Met.) | 0,034 | - | 0,048 |
| PAI-1 (intest. Met.) | n.s. | 0,048 | - |
| T | n.s. | 0,046 | 0,025 |
| N | n.s. | 0,030 | n.s. |
| M | n.s. | n.s. | n.s. |
| G | n.s. | n.s. | n.s. |
| UICC | n.s. | n.s. | n.s. |
| Lauren | n.s. | n.s. | n.s. |
| Bormann | n.s. | n.s. | n.s. |
| Präsenz von HP | n.s. | 0,020 | n.s. |
| Intestinale Metaplasie | n.s. | n.s. | n.s. |
| CK 18 pos. Zellen im KM | n.s. | n.s. | n.s. |
| u-PAR auf CK18 pos. Zellen im KM | n.s. | n.s. | n.s. |

Tab. 34: Überblick über die Korrelationen des Urokinase-systems (u-PA, u-PAR und PAI-1) in der Immunhistochemie mit der intestinalen Metaplasie

In der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse ergab sich keine signifikante Korrelation des u-PA-Systems in intestinalen Metaplasien und dem Überleben bzw. dem Auftreten eines Rezidivs (Abb. 16b.)



Kaplan Meier uPA/Intestinale Metaplasie

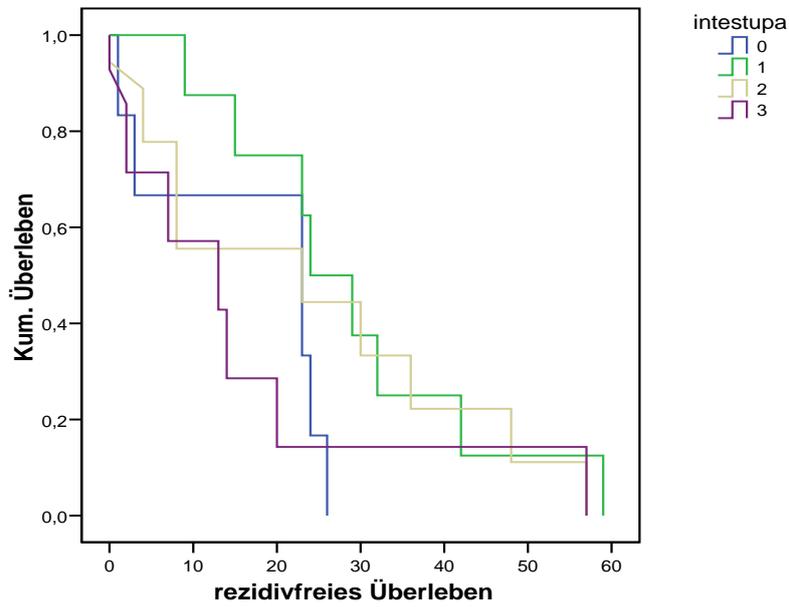
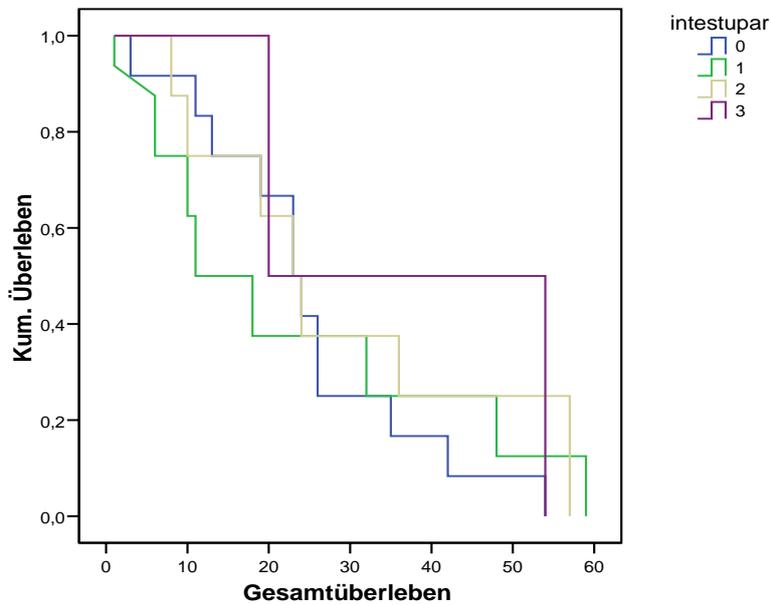


Abb. 16: Kaplan-Meier-Analyse für den Nachweis von u-PA in der intestinale Metaplasie im tumorfernen Normalgewebe in Bezug auf das rezidivfreie ($p=0,3535$) und Gesamtüberleben ($p=0,5375$)

Kaplan Meier uPAR/Intestinale Metaplasie



Kaplan Meier uPAR/Intestinale Metaplasie

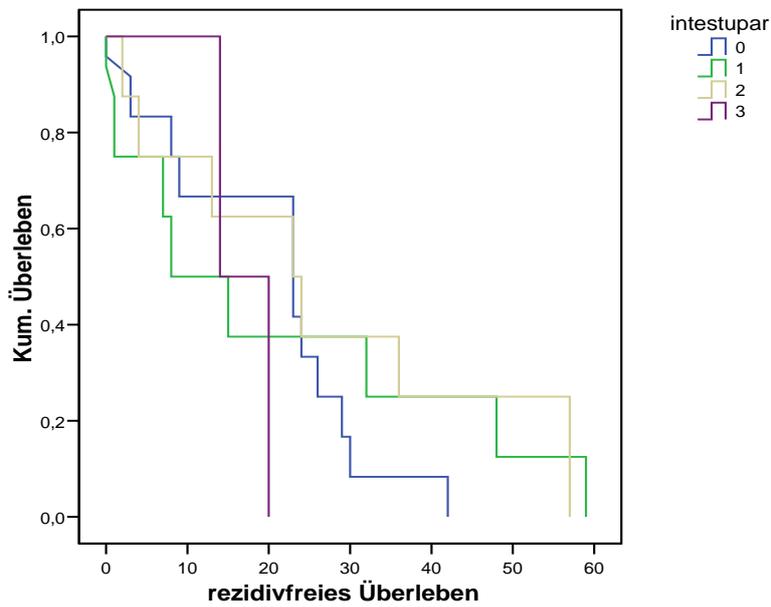
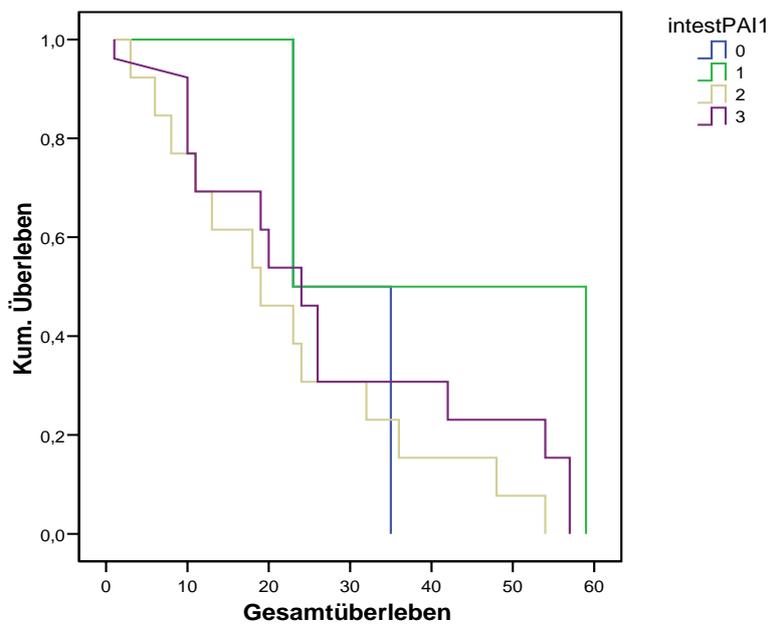


Abb. 17: Kaplan-Meier-Analyse für den Nachweis von u-PAR in der intestinale Metaplasie im tumorfernen Normalgewebe in Bezug auf das rezidivfreie ($p=0,6297$) und Gesamtüberleben ($p=0,8803$)

Kaplan Meier PAI1/Intestinale Metaplasie



Kaplan Meier PAI1/Intestinale Metaplasie

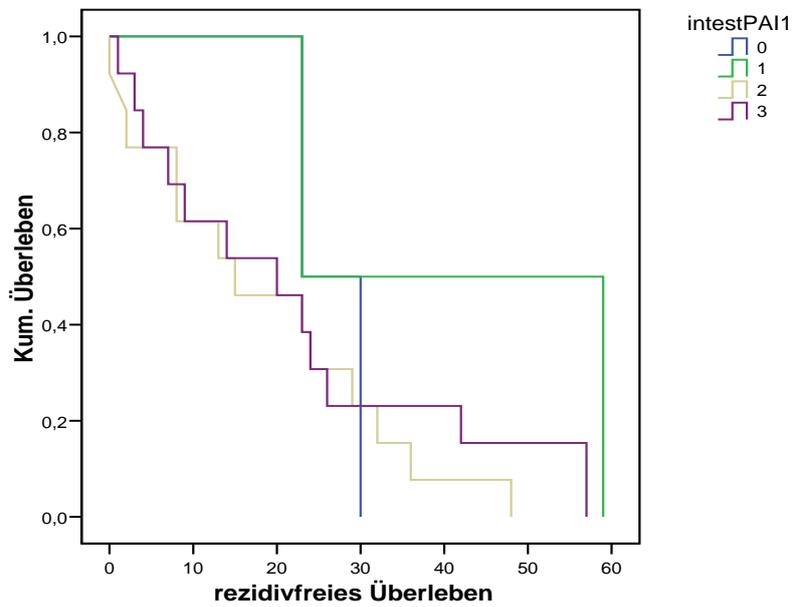


Abb. 18: Kaplan-Meier-Analyse für den Nachweis von PAI-1 in der intestinale Metaplasie im tumorfernen Normalgewebe in Bezug auf das rezidivfreie ($p=0,3536$) und Gesamtüberleben ($p=0,3224$)

4. Diskussion

Mit dieser Dissertation konnte erstmals in einer unabhängigen Serie von Patienten mit Magenkarzinom die diagnostische Bedeutung von u-PA und PAI-1 beim Magenkarzinom bestätigt werden.

Als weitere Besonderheit in dieser Arbeit ergab sich eine direkte Korrelation der immunhistochemischen Bestimmung des Urokinase-Systems an präoperativ gewonnenen Biopsien mit den Ergebnissen der später resezierten Gewebe derselben Patienten. Dies ist ein klinisch wichtiges Ergebnis, da es bereits eine präoperative Risikoeinschätzung durch das u-PA-System zulässt.

Eine Infektion mit dem *Helicobacter pylori* war in diesem Kollektiv signifikant mit dem Urokinasesystem assoziiert. Hier besteht also möglicherweise eine besondere Bedeutung des Bakteriums in der tumorassoziierten Proteolyse.

Zum ersten Mal konnte in dieser Dissertation eine Hoch-Regulation aller drei Parameter des Urokinasesystems (u-PA, u-PAR und PAI-1) in der intestinalen Metaplasie bei Patienten mit Magenkarzinom demonstriert werden. Es zeigte sich zumindest eine signifikante Korrelation der Expression des Urokinasesystems in der intestinalen Metaplasie mit fortgeschrittenem Status für pN und pT. Hieraus lässt sich möglicherweise eine biologische Assoziation mit dem Fortschreiten des Karzinomprozesses ableiten.

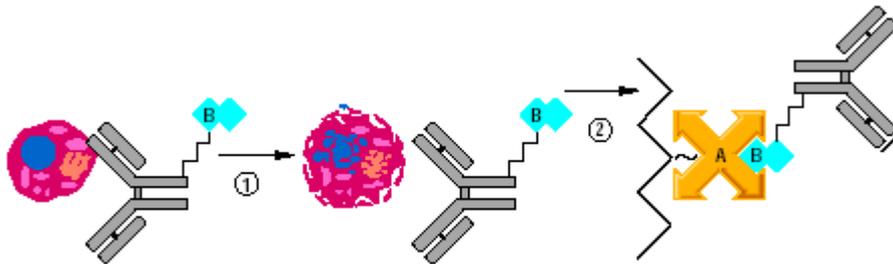
4.1. Diskussion methodischer Fragestellungen

Die Avidin – Biotin – Methode (Abb. 19) nützt die starke Affinität von Avidin oder Streptavidin für Biotin (Dissoziationskonstante 10^{-19}M). Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin.

Aufgrund der molekularen Konfiguration binden jedoch in der Regel weniger als vier Biotinmoleküle (Heggeness M.H. et al 1977).

In der Immunhistochemie finden aktuell zwei verschiedenen Arten der Avidin – Biotin – Färbung Verwendung: 1. die „Avidin – Biotin – Komplexmethode“ auch ABC – Methode genannt (in dieser Arbeit verwendet) oder 2. die „markierte Avidin – Biotin – Komplexmethode“ auch LAB – Methode (= labelled avidin-biotin technique) genannt. Beide Verfahren benötigen einen biotinylierten Zweitantikörper. Die Biotinylierung ist ein schonender Vorgang, wobei Biotin kovalent an den Antikörper gebunden wird. Freie Bindungsstellen am Avidin des Avidin – Biotin – Komplex oder enzymgekoppelten Avidin binden sich an das Biotin des Brückenantikörpers. Dieser muss nicht im Überschuss zugesetzt werden, da freie Fab- Arme zur Bindung nicht benötigt werden. Die Reihenfolge der Reagenzienapplikation ist abhängig von der verwendeten Technik, entweder Primärantikörper, biotinylierter Zweitantikörper, vorgeformter Avidin – Biotin – Enzymkomplex (ABC), oder enzym-markiertes Avidin (LAB), Substratlösung.

Die überaus starke Affinität von Avidin gegenüber Biotin sowie der chemisch milde Biotinylierungsprozess verschafft den Avidin – Biotin – Techniken eine höhere Sensitivität im Vergleich zu den anderen direkten und indirekten Färbemethoden (APAAP, PAP, usw.).



Avidin/Biotin Komplex

Abbildung 19.: Avidin/Biotin Komplex

Die Färbung über den ABC – Komplex wurde erstmals von Su-Ming Hsu und L. Raine (Hsu S.M., Raine L. et al 1981) eingeführt. Die Sensitivität und Spezifität wurde in verschiedensten Studien im Vergleich zu anderen Färbetechniken (auf unterschiedlichsten Geweberegionen) evaluiert (Hsu S.M., Raine L. et al 1981, Hsu S.M., Raine L. et al 1982, Bergroth V. 1983). Die Verwendung der ABC – Methode ist inzwischen wie im Falle des Immunkomplex – Verfahrens sowohl bei frisch gefrorenen, länger asservierten (bei -70° C gefrorenen) als auch bei paraffin-eingebetteten Proben möglich. Bei allen Gewebearten sind hierbei hervorragende Ergebnisse beschrieben (Bergroth V. 1983, Müller-Hermelink et al 1984, Miettinen M. et al 1990).

Beim Avidin - Biotin - Komplex ist jedoch darauf zu achten, dass gewisse Gewebe endogenes Biotin enthalten und daher eine unspezifische Färbung oder eine verstärkte Hintergrundfärbung bewirken können. Diese „Unspezifität“, wie sie z.B. vermehrt durch die endogene Biotinproduktion (EABA) bei Leber oder Nierengewebe, aber ebenso bei jeder Art von Kryostatschnitten auftritt, kann problemlos durch einen Blockierungsschritt mit einem Blockierungssystem (Hinzufügen von Avidin) behoben werden. In dieser Arbeit wurde zur Sicherstellung, dass keine Hintergrundfärbung durch endogenes Biotin auftritt, ein Inkubationsschritt der Präparate mit 0,1% Avidin und 0,01% Biotin gewählt (Guesdon J.L. et al 1983, Bussolati G. et al 1983).

Die ABC Methode wurde in dieser Arbeit noch mit den herkömmlichen Färbemethoden angewendet, die diese Methode relativ langwierig machten (Färbedauer ca. 6-7 Stunden). Aus diesem Grund ist diese Methode nicht für den intraoperativen Schnellschnitt geeignet. Es werden aber zunehmend ABC Schnellfärbetechniken entwickelt, die so im intraoperativen Gebrauch eingegliedert werden können. Bei diesen Methoden sind aktuell noch einige Probleme zu beheben, wie z.B. verstärkte Hintergrundfärbung oder Kreuzreaktionen mit nicht komplett blockierten oder ausgewaschenen Antisera. Die weiter vorangetriebenen Entwicklungen werden auch hierfür Lösungen finden.

4.2. Untermauerung des Stellenwertes des Urokinasesystems als prognostischer Parameter

Tumorprogression und Metastasierung sind Hauptursachen für den Tod von Krebspatienten. Die Entwicklung einer Metastase ist das Ergebnis einer Serie von Interaktionen der Tumorzellen mit ihrer Umgebung, und entsteht auch auf der Basis von genetischen Veränderungen. So durchlaufen genetisch entsprechend vorgeschädigte Zellen ein prämalignes Stadium um nach weiteren entscheidenden Veränderungen maligne zu transformieren (Lehrbach et al 2003). Diese Hypothese entwickelt das Konzept einer „Multi-Step-Theory“. Die Theorie beschreibt nach Vogelstein et al 1988 die Notwendigkeit der Akkumulation verschiedener Störungen auf molekularer und zellulärer Ebene. Die daraus entstandenen, invasiven Krebszellen müssen Gewebsbarrieren abbauen (wie z.B. die Basalmembran der Gefäße), um dann die Zirkulation zu erreichen und damit systemisch in Form von Metastasen wirksam zu werden. Hierzu ist v.a. die Fähigkeit zur Proliferation, Differenzierung, Anti-Apoptose, Invasion, Internalisation und Metastasierungsetablierung notwendig. Dieses invasive Verhalten hängt von der Sekretion und Aktivierung einer Vielzahl von abbauenden Enzymkomplexen ab. Der Plasminaktivierung wird eine zentrale Rolle in der tumor-assoziierten Proteolyse und dem Matrixabbau zugewiesen (Johnsen et al 1998). Die Urokinase (u-PA) kanalisiert die Konversion von inaktivem Plasminogen zum proteolytisch aktiven Plasmin. Eine Bindung von Urokinase (u-PA) an den Urokinaserezeptor (u-PAR) auf der Zelloberfläche verstärkt die Plasmingenerierung. Die Oberfläche von u-PAR stellt das entscheidende Areal der Plasminaktivierung dar (Roldan et al 1990).

In klinischen Vorstudien zeigte sich die Expression von Faktoren des Urokinasesystems bestehend aus u-PA, u-PAR und PAI 1 (Plasminogeninhibitor) als einer der Schlüsselfaktoren für das Outcome von Tumorpatienten (Heiss et al 1995, Konno et al 1999). Dies ist abhängig von der Expression der verschiedenen Faktoren des Systems im Primärtumor, sowie der Expression von u-PAR auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark (Gerber M. et al 2001, Jänicke et al 1993).

Die prognostische Bedeutung des Urokinasesystems zeigte sich in den verschiedensten unterschiedlichen Primärtumoren aus der eigenen Arbeitsgruppe und vielen weiteren Gruppen (Pedersen H. et al 1994, Jaenicke F. et al 1993, usw. siehe Tabelle 35).

| Studie | N | Sig. Gesamtüberleben | Multivarianz | Zusätzliche Methoden |
|---------------------------------------|-----|---|-------------------------------|---|
| Eigene (Magen) | 102 | u-PA p=0,0017 u-PAR p=0,0988 PAI-1 p=0,0000 | p=0,040 p=0,254 p=0,026 | Immuncytochemische Färbung auf u-PAR |
| Papadopoulou S. et al (Colorectal) | 64 | u-PA p=0,0001 PAI-1 p=0,007 | p=0,002 p=0,018 | ELISA |
| Kaneko et al | 101 | u-PA p=0,007 | p=0,008 | Zusätzlich IH auf |

| | | | | |
|-----------------------------|------|--|------------------------------------|------------------------|
| (Magen) | | u-PAR p=0,0221 PAI-1 n.s. | n.s. n.s. | VEGF |
| Konecny et al (Ovar) | 103 | u-PA p=0,002 PAI-1 p=0,007 | p=0,037 p=0,006 | ELISA |
| Konno et al (Colorectal) | 71 | u-PA n.s. u-PAR p=0,0076 PAI-1 n.s. PAI2 n.s. | n.s. p=0,0176 n.s. n.s. | VEGF |
| Yang et al (Colorectal) | 59 | u-PA p=0,031 u-PAR p=0,004 PAI-1 p=0,809 PAI2 p=0,131 | p=0,005 p=0,001 n.s. n.s. | ELISA Flowcytometry |
| Kuhn et al (Ovar) | 86 | u-PA p=0,001 u-PAR p=0,001 | n.s. p=0,001 | ELISA |
| Takai et al (Magen) | 42 | u-PA p=0,01 | p=0,03 | ELISA |
| Look et al (Brust) | 8377 | u-PA p=0,001 u-PAR p=0,001 | p=0,001 p=0,001 | ELISA |
| De Petro et al (HCC) | 25 | u-PA p=0,02 | p=0,05 | PCR |
| Dubuisson et al (HCC) | 26 | u-PA p=0,05 u-PAR p=0,025 | n.d. | PCR |
| Zheng et al (HCC) | 22 | u-PA p=0,01 u-PAR p=0,01 PAI-1 p=0,05 | p=0,01 n.s. n.s. | Northern Blot |
| Salden et al (Lunge) | 88 | u-PA n.s. u-PAR n.s. PAI-1 n.s. PAI2 n.s. | / | ELISA |
| Pedersen et al (Lunge) | 84 | u-PA n.s. u-PAR p=0,008 PAI-1 p=0,008 | n.s. p=0,01 n.s. | ELISA |

Tab. 35: Literaturüberblick der prognostischen Relevanz der Faktoren des Urokinasesystems bei unterschiedlichen Tumoren

Bisher hatte jedoch noch keine Arbeitsgruppe ihre prognostischen Ergebnisse zum u-PA-System in einer unabhängigen Patientenserie bestätigt. Dies erfolgte nun erstmals hier. In dieser Arbeit wurden die bisherigen Daten und Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe anhand eines neuen unabhängigen Kollektives reevaluiert.

Es bestätigte sich die unabhängige Assoziation zwischen u-PA und PAI-1 mit dem Rezidiv und Überleben. Das Urokinasesystem zeigte ferner eine signifikante Korrelation im

Primärtumor mit der Expression von u-PAR auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark dieser Patienten. (siehe Tabelle 26) Dies unterstreicht die Relevanz des uPA-Systems für den invasiven Phänotyp, sowie die systemische Dissemination (Heiss et al 2002). Im Rahmen einer Tumorthherapie kommt der effektiven Risikoabschätzung einer Neuerkrankung oder Tumorprogression nach einer chirurgischen Entfernung eines Karzinoms große Bedeutung zu. Auf ihrer Grundlage findet die Entscheidung über eine weitere Nachbehandlung statt (Chemotherapie oder Bestrahlung), und dient so zur Minimierung der Belastung für den Patienten in Korrelation zu dem maximal erzielbaren Erfolg.

Das Urokinasesystem wird inzwischen seit Jahren in diesem Zusammenhang als mögliche Entscheidungshilfe für adjuvante Therapien diskutiert. Seit der Entdeckung des Enzyms u-PA von White et al 1966 hat sich das Interesse an diesem System stark entwickelt, vor allem seit Alstedt et al 1976 erstmals die starke Expression von u-PA auf den Zellen von menschlichen Ovarialkarzinomen darstellen konnte. In dieser und in vorangegangenen Arbeiten (Tabelle 35) sind bei den verschiedensten Tumorarten hohe Werte von u-PA mit einem geringeren, rezidivfreien Intervall und Gesamtüberleben (Abb 12/13 mit $p=0,002$ und $p<0,001$ Kaplan Meier) assoziiert, was aufgrund der proteolytischen Relevanz des Urokinasesystems durchaus verständlich ist. Primär scheinbar überraschend findet sich auch für den Urokinaseinhibitor PAI-1 eine ähnliche hohe, prognostische Aussagekraft (Abb 14/15 mit $p<0,001$ und $p<0,001$ Kaplan Meier für das rezidivfreie und Gesamtüberleben), wobei dieser zusammen mit u-PA sogar den größten prognostischen Wert aufweist.

Diese Entdeckung erschien früher auf den ersten Blick meist widersprüchlich, wird aber durch einige, inzwischen etablierte Theorien erklärt.

Zum Beispiel führt die hohe Konzentration von PAI-1 durch die Bindung an u-PA zu einer Internalisierung des PAI-1/u-PA/u-PAR Komplexes in die Zelle, was damit gleichzeitig zu einer gesteigerten Zellproliferation und ggf. Angiogenese führt (Dano et al 1994).

Ähnlich wichtig ist für die Etablierung von Metastasen, dass die Inhibition der proteolytischen Aktivität durch PAI-1 eine bessere Anheftung der Zelle an die extrazelluläre Matrix ermöglicht, sowie die Bildung eines Tumors und Angiogenese (Dano et al 1994).

Die besondere Bedeutung des Urokinaserezeptors wird in diesem Zusammenhang primär in einem Wechselspiel zwischen Zelladhäsion, Proteolyse und Proliferation gesehen. Hier wird eine weitere Komponente, nämlich das Vitronectin, in Diskussion gebracht, welches durch die Konkurrenz zwischen u-PAR und PAI-1 um die Bindung an sich, das Wechselspiel zwischen Adhäsion und Migration fördert.

In einer Studie von Foekens et al 2000 wird in einer Gruppe von Mammakarzinompatientinnen ($n=2780$) der prognostische Wert von u-PA und PAI-1 am bisher eindrucksvollsten belegt. Foekens hat in diesem riesigen Studienkollektiv u-PA und PAI-1 als unabhängige Marker für das individuelle rezidivfreie und Gesamtüberleben etabliert.

Dies wurde unterstrichen von zahlreichen weiteren Arbeiten (Duffy M.J. et al 1990, Harbeck N. et al 2002, Ganesh S. et al 1994, usw.) bei verschiedenen Tumortypen. Bei einigen Studien wie z.B. beim Mammakarzinom (Nekarda H. et al 1994, Harbeck N. et al 2004, Duffy M.J. et

al 2004) wiesen u-PA und PAI-1 jedoch eine deutlich größere Relevanz für die Prognose auf als u-PAR (Harbeck et al 2007). Ähnliche Ergebnisse veröffentlichte Papadopoulou S. in seiner Arbeit über kolorektale Tumore. Synonym ergaben sich für u-PA und PAI-1 signifikante Korrelationen für die Gesamtprognose, aber keine für den Urokinaserezeptor. In der Arbeit von Takai et al bei einem Kollektiv von 42 Patienten mit Magenkarzinomen konnte sogar nur u-PA als signifikanter Faktor isoliert werden.

Dieses Phänomen, dass der Urokinaserezeptor auf dem Primärtumor eine deutlich geringere prognostische Relevanz aufweist wie u-PA und PAI-1, könnte möglicherweise an den unterschiedlichen molekularen Formen von u-PAR (verschiedene Spaltungsprodukten), wie sie auf den verschiedenen Geweben exprimiert werden, liegen (Bohuslav J. et al 1995). Eine weitere Ursache könnte in den verschiedenen zusätzlichen biologischen Funktionen des Urokinaserezeptors bestehen, die er im Übergang zwischen der Zellproliferation und einem zwischenzeitlichen Ruhezustand (domancy) einnehmen kann (Jänicke F. et al 1993).

Trotz der nicht- signifikanten Assoziation von u-PAR im Primärtumor für die Gesamtprognose zeigt diese Studie, wie auch die bisherigen Studien (Heiss et al 1995, 1997) eine eindeutige Korrelation von u-PAR mit PAI-1 und u-PA. Dies bestätigt eindeutig, dass diese drei Faktoren eine ganz entscheidende gegenseitige Hochregulation erfahren und damit die funktionelle Bedeutung aller drei Faktoren vor allem in ihrer Interaktion bestehen (Aguirre-Ghiso J.A. et al 2001). Eine Entwicklung der verschiedenen Stufen der Tumorerkrankung in ihre Frühphase, ihre lokale Ausbreitung und der entscheidenden Phase der systemischen Ausbreitung findet wahrscheinlich in einer Interaktion dieser Faktoren statt. Dass u-PAR nicht nur bei der Invasion und Metastasierung eine entscheidene biologische Rolle spielt, sondern vor allem auch bei der Signaltransduktion in die Zelle, ist entscheidend für seine zusätzliche Funktion, die Tumorerkrankung zu aktivieren, aber auch eine Tumorzelle in einen sogenannten Ruhezustand zu überführen. Dazu treten einige weitere Faktoren, die Integrine, in Interaktion mit u-PAR (Aguirre-Ghiso et al 2001). Die Bedeutung dieser Funktion von u-PAR, zusätzlich zur Invasion wird weiter intensiv diskutiert und stellt einen zentralen Punkt in der Entwicklung von weiteren Tumorthérapien dar. Die Expression von hohen Serumkonzentrationen von u-PAR wird in einigen Tumorthérapien bereits als Marker zur Dokumentation eines Therapieerfolges verwendet (Ljuca et al 2007).

4.3. Aussagekraft präoperativ durchgeführter Biopsien

In dieser Arbeit wurden erstmals immunhistochemische Färbungen für das Urokinase-System vergleichend zwischen den präoperativen Biopsien und perioperativ entnommenen Präparaten durchgeführt. So sollte eine Aussage über Möglichkeiten einer bereits präoperativen Evaluation des Tumors gemacht werden. Der klinische Wert der Evaluierbarkeit von Biopsien ist vielfältig: So könnte z.B. mit dieser Methode eine mögliche Therapieplanung bei Patienten mit inoperablem Tumor mit entschieden werden. Zweitens wäre es ggf. eine Entscheidungshilfe für neoadjuvante Therapien.

Generell sollte auch im Rahmen der Arbeit untersucht werden, inwieweit das Urokinase-System bei so kleinen Biopsien eine Aussagekraft hat.

Die Auswertung im Vergleich zum intraoperativ gewonnenen Gewebe wurde ebenso wie beim Normalgewebe mit parametrischen und nicht-parametrischen Korrelationstests ausgewertet.

Bei den verwendeten Tests Pearson und Spearman-Rho zeigte das Urokinase-System (u-PA, u-PAR, PAI-1) im Vergleich der intraoperativ versus bioptisch gewonnenen Präparate eine signifikante Korrelation der Färbeergebnisse, dies trotz nicht vermeidbarer Qualitätsunterschiede der teilweise sehr inhomogenen Tumorpartikel. Dies unterstreicht die Einsatzbarkeit des u-PA-Systems als Diagnostikum invasiver Tumoren auch in präoperativen Biopsien.

Nur wenige Studien haben bisher eine Diagnostik der Faktoren des Urokinasesystem an präoperativen Gewebeproben untersucht. De Bruin et al 1989 führte erstmals eine Untersuchung von präoperativen, endoskopisch gewonnenen Biopsien hinsichtlich u-PA und gewebsspezifisches Plasminogen (t-PA) durch, jedoch nicht hinsichtlich u-PAR und PAI-1. Ebenfalls in einer Arbeit von Sier et al 1993 wurde eine Untersuchung der Expression von u-PA und tPA an gastrokopisch gewonnenem Probenmaterial angewandt. Hier wurde eine erhöhte Expression von u-PA und tPA im Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebeproben gefunden. Beide Arbeiten verglichen jedoch diese präoperativ gewonnenen Ergebnisse nicht mit der Expression der Faktoren an den Resektaten.

Die in dieser Arbeit beschriebene signifikante Korrelation der präoperativen Biopsiematerialien aus dem Tumor- wie Normalgewebe konnten daher erstmals für alle drei Faktoren des Urokinasesystems (u-PA, u-PAR und PAI-1) dokumentiert werden.

Damit erscheint es nun möglich, Patienten mit einem deutlich erhöhten Risiko für Metastasierung und Tumorprogress unabhängig von der primären Tumorresektion zu selektionieren. Die klinische Konsequenz aus diesen Ergebnissen ist vielleicht in Zukunft die Planung einer neoadjuvanten (Radio-)Chemotherapie bei den Patienten, die bereits in diesen präoperativen Biopsien erhöhte Expressionen aufweisen.

Dies sollte besonders auch deshalb in weiteren Studien überprüft werden, weil u-PA und PAI-1 auch Marker darstellen, die eine therapeutische Reaktion auf eine Chemotherapie anzeigen können (Harbeck et al 2002).

Da zudem eine Klassifikation in die verschiedenen Subtypen der intestinalen Metaplasie aus Biopsien heraus möglich ist, wäre es interessant, das Urokinase-system als prognostisch relevanten Faktor stets bei der Gastroskopie auch in dieser Situation mit zu färben.

Möglicherweise kann es dabei schon biologische Informationen vor einer Karzinommanifestation geben (Dinis-Ribiero M. et al 2003).

4.4. Mögliche Bedeutung der Helicobacter Infektion in der Karzinogenese

Nach Wiederentdeckung des Keimes *Helicobacter pylori* (zunächst *Campylobacter pylori* benannt) im Jahre 1982 durch Warren und Marshall wurde ein neuer, wichtiger pathogenetischer Kofaktor zur Entstehung des peptischen Ulcus gefunden. Die meisten Patienten mit einem Ulcus duodeni weisen eine *Helicobacter pylori*-assoziierte Gastritis auf (Marethreiner et al 2000). Die Infektion mit *Helicobacter pylori* bei Patienten mit Ulcus ventriculi ist seltener. Der letztendliche Beweis für die pathogenetische Rolle des Keims ist die Tatsache, dass nach Eradikationstherapie ein deutlicher Rückgang der Ulkusrezidive zu verzeichnen war (Ford et al 2003).

Es ist bekannt, dass die *Helicobacter pylori* Infektion mit einer chronisch atrophischen Gastritis und der Entwicklung einer intestinalen Metaplasie assoziierbar ist. Diese Korrelation kann in dem Kollektiv dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden. Im Kontrast zum mucosa-assoziierten Maltlymphom (Genta et al 2003) sind die Daten für die Kausalität und Prognose für ein Magenkarzinom bei weitem nicht geklärt (Uemura et al 2001). Auch dies konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, da die *Helicobacter pylori* Infektion hier keine prognostische Bedeutung hatte. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die *Helicobacter pylori* Infektion eine funktionelle Bedeutung eher in der Karzinogenese als in der Tumorprogression besitzt.

Eine bemerkenswerteste Beobachtung in diesem Kollektiv war die Korrelation zwischen der *Helicobacter pylori*-Infektion und den höhergradigen Färbescores für das u-PA System (vor allem u-PAR und PAI-1) im Primärtumor. Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der u-PAR Expression in der intestinalen Metaplasie und einer *Helicobacter* Infektion ($p=0,022$). Dieses Ergebnis passt in eine Reihe von Auswertungen anderer Studien, welche eine hohe Menge von u-PA, PAI-1 und Cathepsin bei *Helicobacter pylori*-positiven Patienten mit Duodenalulcerationen (Herszenyi et al 1997), und noch höhere Werte von u-PA bei Patienten mit einer *Helicobacter pylori* assoziierten Pangastritis beschrieben (Gotz et al 1996).

In einigen Studien wird vermutet, dass das Plasminogen an der Bakterienwand eine u-PA-vermittelte Plasminogenaktivierung (Ljungh et al 2000) bewirkt. Dieser Mechanismus induziert potenziell die u-PA-vermittelte Proteolyse.

So verursacht die *Helicobacter* Infektion eine Gastritis und Ulzerationen möglicherweise über die Induktion von u-PA-assoziierten Parametern. Damit ergibt sich möglicherweise eine Rolle von *Helicobacter pylori* in der hypothetischen Ulcus-Karzinom-Sequenz.

In den Ergebnissen dieser Studie zeigte sich eine eindeutige Assoziation zwischen der *Helicobacter*-Infektion und einer erhöhten Expression des u-PA-Systems im Magenkarzinomgewebe. Es ist interessant darüber zu spekulieren, ob der *Helicobacter pylori*-Infektion eine indirekte Rolle in der Karzinogenese zuzuschreiben ist (s.o.), oder ob sie eine entscheidende Rolle in der Progression des Magenkarzinoms durch die Induktion der u-PA-assoziierten Proteolyse bei bereits bestehendem Karzinom spielt.

4.5. Besonderheit der intestinalen Metaplasie

„Atrophy-metaplasia-dysplasia-carcinoma Sequence in the stomach: a reality or merely an hypothesis?“ ist die Frage, die bereits in einem Artikel aus dem Jahre 2001 um die Kollegen Meining und Morgner aus dem Klinikum rechts der Isar gestellt wurde.

Das Verständnis der Pathogenese des Magenkarzinoms hat in den letzten Jahren besonders für den intestinalen Subtyp nach Lauren zugenommen. Das Modell von Correa et al postuliert einen prolongierten präkanzerösen Mechanismus, bei dem die Magenschleimhaut sequenziell zunächst vom gesunden Ausgangszustand langsam in eine chronische Gastritis übergeht, dann über eine multifokale Atrophie in eine intestinale Metaplasie mündet, die zur Dysplasie führt und sich schließlich zu einem invasiven Karzinom entwickelt. Bei diesem langjährigen Prozess spielen chronische externe wie interne Noxen-beispielweise eine *Helicobacter pylori* Infektion (siehe 4.4)- als Risikofaktoren eine entscheidende Rolle.

In unserem Kollektiv fiel auch ein vermehrtes Auftreten von intestinalen Metaplasien im tumorfernen Normalgewebe auf, so dass diese erstmals wissenschaftlich in Hinblick auf die Faktoren des Urokinasesystems (hier u-PA, u-PAR und PAI-1) näher untersucht wurden.

Es fand sich in dem Kollektiv von 102 Patienten, von denen in 98 Fällen das Normalgewebe ausgewertet werden konnte, in insgesamt 31 Fällen eine intestinale Metaplasie. Eine Unterklassifikation in die seit 2002 beschriebenen Typen I-III der intestinalen Metaplasie erfolgte hierbei jedoch aufgrund der Fallzahl nicht.

Die Präsenz einer intestinalen Metaplasie im tumorfernen Normalgewebe in dieser Studie war kein Indikator für ein schlechtes Outcome der Patienten. Eine mögliche Begründung sehen wir hierfür in der bereits zuvor erwähnten, fehlenden Unterklassifikation der Metaplasie in ihre verschiedenen Dysplasiestadien, wie es die Sydney-Klassifikation empfiehlt. Leung et al 2004 beschreiben hier im Stadium III der Dysplasie in der Metaplasie ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms. Doch wird dies noch sehr kontrovers diskutiert. In den Ausführungen der Arbeitsgruppe von Conchillo et al 2001 wird beschrieben, dass sich die Stadieneinteilung der Metaplasie für die Risiko-Differenzierung zur Entstehung eines Magenkarzinoms als nicht hilfreich erwiesen hat.

Vergleicht man nun in unserer Studie das Auftreten der intestinalen Metaplasie mit den histologischen Tumortypen (AdenoCa, SiegelringCa, AdenosquamösesCa, PlattenepithelCa usw.) so zeigt sich zumindest eine signifikante Korrelation mit dem Auftreten des AdenoCa mit $p=0,003$. Diese hochsignifikante Korrelation der intestinalen Metaplasie mit dem Adenokarzinom des Magens wird ebenfalls bereits in Arbeiten wie z.B. von Mirza Z.K. et al 2003 vorbeschrieben.

Obzwar sich keine Assoziation zwischen der intestinalen Metaplasie und der Prognose beobachten lässt, ist es umso erstaunlicher, dass es eine signifikante Assoziation zwischen der Metaplasie und einer hohen Expression von u-PA, u-PAR und PAI-1 im Primärtumor gibt (siehe Tabelle 26; mit $p=0,013$ für u-PA, $p=0,006$ für u-PAR und $p=0,030$

für PAI-1). Das interessanteste Ergebnis ist in dieser Arbeit zusätzlich die positive Färbung auf das U-PA System in der Metaplasie selbst (Leung et al 2002).

In dieser Arbeit zeigt sich zum Einen eine signifikante Korrelation zwischen u-PA/u-PAR ($p=0,034$) und u-PAR/PAI-1 ($p=0,048$) in der Metaplasie, die eine gegenseitige Hochregulation der u-PA-Systemparameter nicht nur im Primärtumor, sondern auch auf der assoziierten Metaplasie impliziert. Zum Anderen besteht diese, bereits zuvor beschriebene signifikante Korrelation zwischen der u-PA Färbung in der intestinalen Metaplasie und der u-P- Färbung im korrespondierenden Primärtumorgewebe. Das zeigt, ähnlich wie in dem oben aufgeführten Beobachtungen für die endoskopisch-gewonnenen Biopsien, dass auch für die u-PA-Färbung in der präkanzerösen Metaplasie eine Aussage über die u-PA Expression im korrespondierenden Primärtumor möglich ist. Es wäre zu spekulieren, dass die intestinale Metaplasie und der korrespondierende Tumor sich möglicherweise aus einem gemeinsamen molekularen Ursprung entwickelt haben, der zu einer Überexpression des u-PA Systems führt. Alternativ wäre so auch die Entwicklung des Tumors aus der Metaplasie denkbar. Denn wenn man die beiden Formen der Entartung betrachtet, sind möglicherweise ähnliche molekulare Veränderungen im Gange, wie sie auch bei der Expression des u-PA Systems auftreten. Ähnliche Vermutungen äußerte Ureema 2003 für die Entwicklung des Magenkarzinoms bei japanischen Patienten.

Als weiteres Ergebnis fand sich zusätzlich zwar kein signifikanter, prognostischer Impact der u-PA-System Färbung in der Metaplasie selber (wahrscheinlich als Folge der geringen Patientenzahl im Kollektiv $n=31$). Dennoch zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen der u-PAR-und PAI-1-Färbung in der intestinalen Metaplasie und einem fortgeschrittenen Tumorstadium (pT) und einer lokalen Lymphknotenmetastasierung (pN). Diese Ergebnisse lassen erahnen, dass die u-PA-Expression in der assoziierten Metaplasie einen besonders aggressiven Tumorphänotyp markiert.

Es ist eine interessante Frage, ob bei einem Patienten mit der Diagnose einer Metaplasie ohne Karzinom sich ein Magenkarzinom von besonders aggressivem Typ entwickeln würde, wenn die u-PA Färbung in dieser intestinalen Metaplasie ein positives Ergebnis zeigte.

Bei Patienten mit verschiedenen Stadien der intestinalen Metaplasie oder Dysplasie könnte damit ein Managementprogramm zur Überwachung in den frühen Stadien Typ I-II in Assoziation zur immunhistochemischen Färbung mit den Faktoren des Urokinasesystems eingeführt werden. Hierzu muss natürlich in einer Reihe von weiteren Studien eine Optimierung der Auswertung, sowie eine genaue Differenzierung der Korrelationen in den Untergruppen etabliert werden.

Als weiteres interessantes Ergebnis zeigte sich in der U-PA-Systemanfärbung der intestinalen Metaplasie eine signifikante Korrelation von u-PAR mit der Helicobacter pylori-Infektion ($p<0,0001$). Dieses Ergebnis verstärkt die Vermutung weiter, dass es möglicherweise eine Interaktion zwischen einer Helicobacter pylori-Infektion mit dem Magengewebe gibt, die über die Stufe einer intestinalen Metaplasie möglicherweise zu einer direkten Karzinomentwicklung führt (Uemura et al 2001, Nomura et al 1991 Parsonnet et al 1996).

In der Arbeit von Bir et al 2007 wird ebenfalls beschrieben, dass die intestinale Metaplasie über einen noch unklaren, durch verschiedenste Proteine regulierten, apoptotischen Mechanismus zu einer Karzinomentwicklung im Magen führt.

Insgesamt stützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Vermutung, dass u-PA, u-PAR und PAI-1 an der Induktion eines Magenkarzinoms aus einer intestinalen Metaplasie heraus beteiligt sein könnten. Die genauen Mechanismen und Interaktionen bedürfen jedoch noch weiterer Abklärung.

4.6. Korrelation des u-PA-Systems im Primärtumor mit u-PAR auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark

Die Ergebnisse dieser Arbeit zu den immunhistochemischen Färbungen beim Magenkarzinom wurden mit den Ergebnissen der Arbeit von Erich Simon in Korrelation gebracht. Dieser untersuchte Patienten dieses Kollektivs hinsichtlich epithelialer Zellen im Knochenmark, und bestimmte darauf zusätzlich die uPAR-Expression.

Der Entwicklungsprozeß maligner Tumoren verläuft in mehreren Stufen. Der Zeitraum vor der klinischen Manifestation dauert je nach Tumorart einige Monate (z.B. Burkitt-Lymphom) bis hin zu vielen Jahren (z.B. Karzinome des Magens, des Kolon, der Lungen oder der Harnblase). Bei weiterem Tumorwachstum können sich einzelne Tumorzellen aus dem Gewebsverband lösen und benachbarte Gewebe invadieren (Invasion). Brechen Tumoren in das Gefäßsystem ein, so gelangen sie über Blut und Lymphe in fernliegende Gewebe und Organe (Metastasierung). Der Tumor wird vielfach erst in diesem Entwicklungsstadium klinisch diagnostiziert und einer Therapie zugänglich. Das Tumorausmaß bestimmt letztendlich die Prognose und die Art der differenzierten Therapie. Dazu müssen insbesondere Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko identifiziert werden, um sie einer individuell angepassten und gegebenenfalls multimodalen Therapie zuführen zu können. Neben dem makroskopisch visualisierbaren Tumor gibt es Mikrometastasen (Tumorzellansammlungen von 0,2 mm bis 2 mm Durchmesser) und die sogenannte Minimale Residuelle Erkrankung (MRD). Letztere wird charakterisiert durch einzelne Tumorzellen oder Tumorzellverbände mit einer Größe von weniger als 0,2 mm, welche in verschiedenen Organsystemen nachgewiesen werden können. Dazu zählen Lymphknoten, Blut, Aszites, Pleuraerguß und Knochenmark.

Der wichtigste prognostische Faktor hinsichtlich Rezidivgefahr und Überlebenszeit von Karzinompatienten ist die lokale und insbesondere die systemische Ausbreitung des Tumors. Über 30 Prozent der Patienten mit einem Adenokarzinom des Magens, die primär kurativ behandelt wurden und keine Anzeichen einer systemischen Tumorstreuung zeigten, entwickeln trotzdem ein frühes Rezidiv (Maruyama et al 1987, Roder et al 1993).

Es wird angenommen, dass eine der Ursachen für ein solches Tumorrezidiv im Vorliegen einer sogenannten Minimalen Resterkrankung oder auch „Minimal Residual Disease“ (MRD)

besteht. Disseminierte Tumorzellen stellen die eigentliche MRD dar und sind definitionsgemäß von Mikrometastasen abzugrenzen (Hermanek et al 1999).

Schon im 19. Jahrhundert wurden im Blut zirkulierende Tumorzellen beschrieben (Sanson et al 1995, Ashwort et al 1996).

Der Begriff „Micrometastasis“ wurde von vielen Autoren als Synonym für disseminierte Tumorzellen gebraucht. Da jedoch der Prozeß der Metastasierung wesentlich komplexer ist (Peckham et al 1995, Devita et al 2001) und nur 0,05% der im Blut zirkulierenden Tumorzellen überleben und einen Metastasenherd bilden (Abati et al 1996), ist laut Hermanek (1999) eine bewußte Abgrenzung der Termini „Isolated / Disseminated / Circulating Tumor Cells“ versus „Micrometastasis / Occult Metastasis“ angebracht.

Herr Simon verwendete zur Färbung der disseminierten Zellen im Knochenmark Cytokeratin (CK18) als Einfachfärbung und die von Frau Prof. H. Allgayer aus der eigenen Arbeitsgruppe weiterentwickelte und etablierte Doppelfärbung hinsichtlich u-PAR und CK18 mit der Immunogold/APAAP Färbung (Allgayer et al 1997).

Wie bereits unter 4.2. beschrieben, erfolgt der Nachweis des Urokinasesystems am Primärtumor über eine immunhistochemische Färbung auf u-PA, u-PAR und PAI-1. Diese Ergebnisse wurden dann mit der cytochemischen Einfach- und Doppelfärbungen aus der Arbeit von Herrn Simon korreliert.

In der immunhistochemischen Färbung am Primärtumor zeigten sich u-PA und PAI-1 in der Kaplan Meier Analyse signifikant assoziiert mit dem rezidivfreien Intervall (u-PA $p=0,002$, PAI-1 $p<0,001$) und dem Gesamtüberleben (u-PA $p<0,001$, PAI-1 $p<0,001$).

Beide Faktoren waren damit mit einem schlechten Outcome vergesellschaftet. Jedoch zeigte sich für u-PAR allenfalls eine Tendenz, aber kein signifikantes Ergebnis, weder für das rezidivfreie Intervall, noch das Gesamtüberleben.

In der Arbeit von Herrn Simon zeigte sich jedoch, dass die positive u-PAR-Färbung auf den disseminierten Zellen im Knochenmark mit einem schlechten Outcome für sowohl das rezidivfreie ($p=0,005$), wie Gesamtüberleben ($p<0,001$) assoziiert war.

Dieser Sachverhalt könnte verschiedentlich erklärt werden.

Es gibt bereits Studien am OvarialCA (z.B. Gong et al), die beschreiben, dass u-PAR in den frühen Stadien (Figo I-II) signifikant höher expremiert wird, als in den späten Stadien (Figo III-IV). Diese Beobachtungen werden damit erklärt, dass u-PAR wohl der entscheidende Faktor ist für das Anfangsstadium der Invasion und der Tumorprogression ist.

Die weiteren Faktoren des Urokinase-Systems und einige andere Faktoren wie z.B. VEGF, sind möglicherweise für die weitere Progression und Metastasierung zuständig (Gong et al 2000). Auch Kuhn et al (1999) beschreibt beim fortgeschrittenen OvarialCa FIGO IIIc primär eine prognostische Signifikanz von u-PA und PAI-1, nicht aber u-PAR.

Das Auftreten und die prognostische Signifikanz von u-PAR auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ist möglicherweise ein Indiz dafür, dass u-PAR insbesondere für das Stadium der frühen Dissemination wichtig ist.

Korreliert man die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung und die Ergebnisse der immuncytochemischen Färbungen mit den etablierten Tumorfaktoren, so zeigt sich eine

starke Assoziation zwischen u-PAR ($p=0,014$) und u-PA ($p=0,009$) im Primärtumor, und auch zusätzlich mit dem Auftreten der u-PAR Expression auf den disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ($p=0,009$).

Dies spricht wiederum für eine positive Selektion u-PAR-exprimierender Zellen bei der frühen Dissemination.

Somit findet sich die Möglichkeit mit beiden Methoden die Patientengruppen zu klassifizieren, die das höchste Risiko auf eine Tumorrezidiv und eine Metastasierung aufweisen (Cantero et al 1997, Heiss et al 1995, Jänicke et al 1993).

Über die Definition des jeweiligen Risikoprofils könnte hypothetisch für den einzelnen Patienten bereits ein therapeutisches Konzept erstellt werden. Gggf. könnten Patienten, die trotz kurativer Resektion eine erhöhte Expression von u-PAR im Knochenmark aufweisen, einer zusätzlichen Therapie zugeführt werden. Der Verlauf könnte dann weiter mittels disseminierter Tumorzellen im Knochenmark kontrolliert werden.

Andererseits könnte das u-PA-System in Biopsien die Verlaufskontrolle einer neoadjuvanten Therapie verbessern, die man an Hand der gastrokopischen Biopsien aus dem Tumor selbst durchführen könnte.

Die Expression von hohen Serumkonzentrationen von u-PAR wird in einigen Tumorthérapien bereits als Marker zur Dokumentation eines Therapieerfolges verwendet (Ljuca et al 2007). Hier würde sich der Ansatz für eine wirksame Überwachung einer präoperativen Chemo- oder Immuntherapie bieten, die frühzeitig vor der makroskopisch weiter zunehmenden Progression, eine systemische Progression erkennen würde.

4.7. Schlussfolgerung

In diesem Kollektiv einer unabhängigen Patientenserie konnte die prognostische Bedeutung von u-PA und PAI-1 für das Magenkarzinom neuerlich demonstriert werden.

Eine Helicobacter pylori Infektion konnte hier in Assoziation mit einer erhöhten u-PA Expression gebracht werden.

Die Möglichkeit der Voraussage über die Aggressivität des Tumors ist bereits in präoperativen endoskopisch gewonnenen Biopsien möglich und könnten damit auch für weitere Therapien und Therapieoptionen sinnvoll und effektiv nutzbar gemacht werden. Hier böte sich eine sinnvolle Überwachungsmöglichkeit für eine präoperative neoadjuvanten Chemotherapie an.

Die Erkennung einer erhöhten Expression des u-PA Systems in der intestinalen Metaplasie sollte ebenfalls eine klinische Konsequenz erfahren. Eine Verlaufskontrolle der Expression und ihre Veränderung sollte zumindest kontrolliert werden, und ggf. eine therapeutische Konsequenzen erfolgen, wenn zusätzlich zur Expression des u-PA-Systems eine Zunahme des Dyplasiestadiums zu verzeichnen ist.

5. Zusammenfassung der Arbeit

Degradierung und Restrukturierung der extrazellulären Matrix einschließlich der Basalmembran durch proteolytisch wirksame Enzyme sind Vorgänge, die während den Prozessen der Invasion, Intra-, Extravasation und Metastasierung von Tumorzellen ablaufen (Dvorak et al 1986).

Als eines der wichtigsten Proteasesysteme, das verantwortlich ist für die Degradierung der extrazellulären Matrix, gilt das Plasminogenaktivierungssystem bestehend aus den Komponenten u-PA, u-PAR und PAI-1. Zahlreiche klinische und auch experimentelle Studien haben gezeigt, dass die Komponenten des Urokinasesystems eine wesentliche Rolle in der Tumordinvasion und Metastasierung spielen.

Der Nachweis einer Überexpression des u-PA-Systems korrelierte in einer ersten Serie von Patienten mit Magenkarzinom signifikant und unabhängig mit einer ungünstigen Prognose (Heiss et al 1995). Zusätzlich gelang der Beweis einer disseminierten Tumorkomponente mit Expression von u-PAR im Knochenmark, deren Auftreten ebenfalls eine deutlich schlechtere Überlebenschance für die Patienten anzeigt (Simon et al 2002).

Diese Bedeutung des Urokinasesystems für die Tumorphgnose beim Magenkarzinom sollte in dieser Arbeit an einem neuen unabhängigen Kollektiv überprüft werden.

Zweitens sollte untersucht werden, ob die diagnostische Aussagekraft des u-PA-Systems an präoperativ gewonnenen Biopsien gleichwertig ist, und ob sich eine Assoziation des u-PA-Systems mit einer Helicobacter pylori-Infektion zeigen lässt.

Drittens sollte erstmal eine Untersuchung des u-PA-Systems bei intestinalen Metaplasien des Normalgewebes bei Patienten mit Magenkarzinom erfolgen.

Es ergaben sich zusammengefasst folgende Ergebnisse aus dieser Dissertation:

- 1) Der immunhistochemische Nachweis von u-PA und PAI-1 wurde als unabhängiger Risikofaktor für die Prognose des rezidivfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens im Primärtumor (u-PA $p=0,002$ für Rezidivfreies und $p<0,0001$ für das Gesamtüberleben, PAI-1 $p<0,00001$ für beides) bestätigt.
- 2) Für u-PAR zeigte sich eine signifikante Korrelation mit pM ($p=0,020$) und pG ($p=0,022$), für PAI-1 eine für pT ($p=0,034$) und UICC ($p=0,001$)
- 3) Die Expression des Urokinase-Rezeptors auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark korrelierte signifikant ($p<0,0001$) mit dem u-PA-System im Primärtumor. Dies unterstreicht die Rolle des u-PAR bei der systemischen Dissemination.
- 4) Die Immunhistochemie für das u-PA-System an präoperativ durchgeführten gastrokopischen Biopsien korreliert signifikant mit intraoperativen Ergebnissen für die Faktoren des Urokinase-Systems. Damit könnte das u-PA-System ggf. als zusätzliche Entscheidungshilfe für eine neoadjuvante Therapie herangezogen werden.
- 5) Die Expression des u-PA-Systems im Primärtumor korreliert mit einer Helicobacter pylori-Infektion.

- 6) Die Expression des u-PA-Systems in intestinalen Metaplasien korreliert signifikant mit fortgeschrittenen Tumorstadien (pT, pN).

Mit der Untersuchung der Faktoren des Urokinase-Systems konnte in der vorliegenden Dissertation dessen komplexe Bedeutung in unterschiedlichen Kompartimenten und pathologischen Vorgängen (Tumorgewebe, Normalgewebe und Knochenmark) nachgewiesen werden. Die Expression von u-PA und PAI-1 als entscheidender Faktor für die Aggressivität des lokalen Primärtumors sowie u-PAR als entscheidende Komponente für die Entwicklung einer frühsystemischen Tumorerkrankung konnte bestätigt werden. Die zentrale Rolle des u-PA-Systems für das Outcome des Patienten beim Magenkarzinom wurde erstmals unabhängig nachgewiesen.

Diese neuen Ergebnisse schlagen eine weitere Optimierung der begleitenden Therapien (präoperativ neoadjuvant oder postoperativ) durch das u-PA-System vor. Die mit dieser Arbeit validierten Ergebnisse für die Bedeutung des u-PA-Systems beim Magenkarzinom, sowie die neuen Befunde zu u-PA und PAI-1 bei der intestinalen Metaplasie und bei einer *Helicobacter pylori*-Infektion, implementieren als Ziel die Durchführung weiterer funktionell-molekularer Studien zur genaueren Analyse der verschiedenen Interaktionen.

6. Abkürzungen

| | |
|---------|---|
| Abb | Abbildung |
| CK | Cytokeratin |
| CT | Computertomographie |
| DNA | Desoxyribonucleic acid |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |
| GPI | Glycolipidstruktur |
| HP | Helicobacter pylori |
| IGF | insulinähnlicher Wachstumsfaktor |
| IM | Intestinale Metaplasie |
| IORT | intraoperative Strahlentherapie |
| kDA | kilo Dalton |
| MMP | Matrixmetalloproteinase |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| PAI-1/2 | Plasminogenaktivatorinhibitor 1/1 |
| PBS | Phosphat buffer saline |
| PTT | partielle Thromboplastinzeit |
| TBS | Tris buffer saline |
| TMP | Metalloproteinaseninhibitor |
| TNM | tiefeninfiltration/Lymphknoten/Metastasierung |
| UICC | Uniquely to the global control of cancer |
| u-PA | Urokinase |
| u-PAR | Urokinaserezeptor |
| WHO | World Health Organization |

7. Literaturverzeichnis

- **Abati A**, Liotta L.A. Looking forward in diagnostic pathology: the molecular superhighway. *Cancer* 1996; 78:1-3.
- **Aguirre-Ghiso J.A.**, Liu D., Mignatti A., Kovalski K., Ossowski L.: Urokinase receptor and fibronectin regulate ERK to p38 activity ratios that determine carcinoma cell proliferation and dormancy in vivo; *Mol. Biol Cell* 2001; 12:863-879
- **Allgayer H**, Babic R, Gruetzner KU, Beyer BC, Tarabichi A, Schildberg FW, et al: Tumor-associated proteases and inhibitors in gastric cancer: analysis of prognostic impact and individual risk protease patterns. *Clin Exp Metastasis* 1998 (16):62-73
- **Allgayer H.**, Heiss.M.M., Babic R., Grütznert K.U., Jauch K.W., Löhns U., Schildberg F.W.: Expression of tumor-associated proteases and their inhibitors in gastric cancer: Impact on prognosis.; *AACR Proceeding* 36:93, 1995
- **Ashwort T.R.**, Cited by Abati A. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1896.
- **Astedt B.**, Holmberg L. *Nature* 1976; 261:595-597
- **Becker K.**, Böttcher K., Brumm R., Dittler H.J., Fink U., Janetschek P., Krämling H.J., Roder J.D., Sander R., Weber B.: Magenkarzinom; Tumorzentrum München: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Gastrointestinale Tumoren 116-140: 5., vollkommen neu bearbeitete Auflage 1997
- **Begum FD**, Høgdall CK, Kjaer SK, Christensen L, Blaakaer J, Bock JE, Glud E, Høyer-Hansen G, Ring-Larsen H, Høgdall EV. The prognostic value of plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor (su-PAR) levels in stage III ovarian cancer patients; *Anticancer Res.* 2004 May-Jun;24(3b):1981-5
- **Bergroth V.:** Comparison of various immunohistochemical methods.; *Histochemistry* 1983 77:177-184
- **Beyer BC**, Heiss MM, Simon EH, Gruetzner KU, Babic R, Jauch KW, Schildberg FW, Allgayer H. Urokinase system expression in gastric carcinoma: prognostic impact in an independent patient series and first evidence of predictive value in preoperative biopsy and intestinal metaplasia specimens. *Cancer.* 2006 Mar 1;106(5):1026-35.

- **Bir F.**, Calli-Demirkan N., Turfan A.C., Akbulut M, Satiroglu-Tufan N.L. Apoptotic cell death and its relationship to gastric carcinogenesis; *World J Gastroenterol* 2007; 13(23):3183-3188
- **Blasi F**, Behrendt N, Cubellis MV, Ellis V, Lund LR, Masucci MT, Moller LB, Olson DP, Pedersen N, Ploug M, et al.: The urokinase receptor and regulation of cell surface plasminogen activation.; *Cell Differ Dev.* 1990 Dec 2; 32(3):247-53. Review.
- **Blasi F.**: Surface receptors for urokinase activator.; *Fibrinolysis* 2:73-84, 1988
- **Blasi F.**: u-PA, u-PAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways?; *Immunology Today* Vol.18, No 9: 415-417, Sept. 1997
- **Blasi F.**: Urokinase and urokinase receptor: A paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness.; *BioEssays* 15:105-111; 1993
- **Bohuslav J.**, Horejsi V., Hansmann C. et al: Urokinase-plasminogen activator-receptor, β 2-integrins, and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes; *J EXP Med* 1995; 181:1381-1390
- **Bourne J.A.**: Book of immunochemistry staining methods; *Immunocytochemistry Laboratory*, Dako Corporation: 16-19, 1992
- **Bussolati G.**, Gugliotta P.: Nonspecific staining of mast cells by avidin-biotin-peroxidase complexes (ABC).; *J Histochem Cytochem* 1983 dec:31 (12):1419-1421
- **Cajot JF**, Kruithof EK, Schleuning WD, Sordat B, Bachmann F.: Plasminogen activators, plasminogen activator inhibitors and procoagulant analyzed in twenty human tumor cell lines; *Int J Cancer.* 1986 Nov 15;38(5):719-27.
- **Cantero D**, Friess H, Deflorin J, Zimmermann A, Bründler MA, Riesle E, et al: Enhanced expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in pancreatic carcinoma. *Brit J Cancer* 75(3) 1997:388 – 395
- **Carrell RW**, Stein PE.: The biostructural pathology of the serpins: critical function of sheet opening mechanism.; *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1996 Jan; 377(1):1-17. Review.
- **Cho JY.**, Rha SY., Ahn JB., Lee HR., Lee KH., Lee JI., Chung HC., Kim JH., Roh JK., Noh SH., Min JS., Kim BS. : High levels of urokinase-type plasminogen activator

(u-PA) and its inhibitor PAI-1 are poor prognostic factors in gastric cancer. ; AACR Proceedings 36: 96, 1995

- **Christopherson W.M.** Cancer Cells in the peripheral Blood: A second Look. Acta Cytol 1965; 86:169-174.
- **Conchillo J.M.,** Houben G., de Bruine A., Stockbrugger R. Is type III intestinal metaplasia an obligatory precancerous lesion in intestinal-type gastric carcinoma? Eur J Cancer Prev, 2001; 10:307-312
- **Conese M.,** Blasi F.: Urokinase/Urokinase Receptor System: Internalization/Degradation of Urokinase-Serpin Complexes: Mechanism and Regulation; Biol.Chem.Hoppe-Seyler. 376: 143-155, 1995
- **Conese M.,** Blasi F.: Urokinase/Urokinase Receptor System:Internalization /Degradation of Urokinase-Serpin Complexes: Mechanism and Regulation; Biol.Chem.Hoppe-Seyler. 376: 143-155, 1995
- **Cordell J.,** Fallini B., Erber W.N., Ghosh A.K., Abdulaziz Z., MacDonald S., Pulford K.A., Stein H., Mason D.Y.: Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAAP complexes). J Histochem Cytochem 32: 219-229, 1982
- **Cox D.R.:** Regressions models and life tables.; J Stat Soc 9: 1749-1756, 1972
- **Danó K.,** Andreasen P.A., Grøndahl-Hansen J., Kristensen P., Nielsen L.S, Skriver L.: Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer.; Adv.Cancer Res.44:13-266, 1985
- **Danó K.,** Behrendt N., Brünner N., Ellis V., Ploug M., Pyke C.: The urokinase receptor. Protein structure and role in plasminogen activation and cancer invasion.; Fibrinolysis 8:189-203, 1994
- **De Bruin P.A.,** Verspaget H.W.:, Griffieon G., Verheijen J.H., Dooijenaar Lamers C.B.: Plasminogen activators in endoscopic biopsies as indicators of gastrointestinal cancer: comparison with resection specimens.; Br J Cancer 1989, 60:397-400
- **De Petro G.,** Tavian D., Copeta A., Portolani N., Giulini S.M., Barlati S.: expression of urokinase-type plasminogen activator (u-PA), u-PAR receptor, and tissue-type PA messenger RNAs in human hepatocellular carcinoma; Cancer Res 58(10) 15 May 1998:2234-9

- **Devita V.T.**, Hellman S, Rosenberg S.A. Cancer: Principles and Practice of Oncology. Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2001.
- **Dinis-Ribiero M.**, et al: Magnifikation chromoendoscopy for the diagnosis of gastric intestinal metaplasia and dysplasia; Gastrointestinal Endosco 2003 Apr; 57(4): 498-504
- **Dubuisson L.**, Monvoison A., Nielsen B.S., Le Bail B., Bioulac-Sage P., Rosenbaum J. : Expressoin and cellular localization of the urokinase-type plasminogen activator and its receptor in human hepatocellular carcinoma; J. Pathol. 190(2) Feb 2000:190-5
- **Duffy M.J.:** Urokinase-type plasminogen activator: a potent marker of metastatic potential in human cancers. Biochem Soc Trans. 2002 Apr;30(2):207-10
- **Duffy M.J.**, Reilly D., o`Sullivan C., o`Higgins N., Fennelly J.J., Andreasen P.: Urokinase plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer; Cancer Res. 1990; 24:195-208
- **Egelund R**, Rodenburg KW, Andreasen PA, Rasmussen MS, Guldberg RE, Petersen TE.: An ester bond linking a fragment of a serine proteinase to its serpin inhibitor.; Biochemistry. 1998 May 5;37(18):6375-9.
- **Foekens JA**, The urokinase-type plasminogen actiator system in resected non small-cell lung cancer. Rotterdam Oncology Thoracic Group; Ann Oncol 11(3) Mar 2000:327-323
- **Foidart J.M.** : The meaning of PAI-1 in invasion and angiogenesis of cancer cells; J.Cell.Biol.128: 234-237, 1993
- **Ford A.**, Delaney, A., Forman, D., Moayyedi, P. (2003): Eradication therapy for peptic ulcer disease in Helicobacter pylori positive patients. Cochrane Database Syst Rev. 4, CD003840.
- **Ganesh S.**, Sier C.F.M., Heerding M.M, et al: Urokinase receptor and colorectal cancer survival; Lancet 1994; 344:583-584
- **Gardner MJ.**, Altmann DG.: Statistics with confidence.; The universities press (Belfast), 1989
- **Genta R.M.**, The gastritis connection: prevention and early detection of gastric neoplasms; J Clin Gastroenterol 2003; 36:44-49

- **Gerber B.**, Krause A., Müller H., Richter D., Reimer T., Makovitzky J., Herrnring C., Jeschke U., Kundt G., Friese K: Simultaneous Immunohistochemical detection of Tumor Cells in Lymph Nodes and Bone Marrow Aspirates in Breast Cancer and Ist Correlation With Other Prognostic Factors; *Journal of Clinical Oncology*, Feb. 2001 (19):960-971
- **Gils A**, Declerck PJ.: Modulation of plasminogen activator inhibitor 1 by Triton X-100--identification of two consecutive conformational transitions; *Thromb Haemost.* 1998 Aug;80(2):286-91.
- **Gong S.J.**, Chung H.C., et al: Tissue urokinase-type plasminogen activator receptor levels in breast cancer; *Int J Mol Med* (6) 2000:301-305
- **Gotz J.M.**, Vergouwe Y., Verspaget H.W., et al; Gastric mucosal plasminogen activators in *Helicobacter pylori* infection; *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1577-1582
- **Guesdon J.L.** et al: Endogene Biotin; *J Histochem Cytochem* 1983 27:1131-1139
- **Hamilton SR**, Vogelstein B. Point mutations in human neoplasia; *J Pathol.* 1988 Mar;154(3):205-6.
- **Harbeck N**, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost.* 2004 Mar 91(3):450-6.
- **Harbeck N.**, Kates R., Look M.P., et al: Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to u-PA and PAI-1 (n=3424); *Cancer research* 2002; 62:4617-4622
- **Harbeck N**, Schmitt M, Paepke S, Allgayer H, Kates RE. Tumor-associated proteolytic factors uPA and PAI-1: critical appraisal of their clinical relevance in breast cancer and their integration into decision-support algorithms. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2007;44(2):179-201
- **Heggeness MH**, Ash JF: Use of the avidin-biotin complex for the localization of actin and myosin with fluorescence microscopy.; *J Cell Biol.* 1977 Jun;73(3):783-8
- **Heiss MM.**, Babic R., Allgayer H., Grützner KU., Jauch KW., Löhrs U., Schildberg FW.: Tumor-associated proteolysis and prognosis: New functional risk factor in

gastric cancer defined by the urokinase-type plasminogen activator system.; J. Clin Oncol 13(8): 2084-2093; 1995

- **Heiss M.M.**, Allgayer H., Grützner KU., Jauch KW., Löhrs U., Schildberg Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer; Nat Med. 1995 Oct;1(10):1035-9.
- **Heiss MM**, Simon EH, Beyer BC, Gruetzner KU, Tarabichi A, Babic R, Schildberg FW, Allgayer H., Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow. J Clin Oncol. 2002 Apr 15;20(8):2005-16.
- **Hermanek P**, Hutter R.V., Sobin L.H., Wittekind C. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. Cancer 1999; 86:2668-2673.
- **Hermanek P**. Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. Anticancer Res 1999; 19:2771-2774.
- **Herszenyi L.**, Plebani M., Carraro P. et al: Impaired fibrinolysis and increased protease levels in gastric duodenal mucosa of patients with active duodenal ulcer; Am J Gastroenterol 1997; 92:843-847
- **Hsu SM.**, Raine L., Fanger H.: The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique – A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.; J Histochem Cytochem 29: 577, 1981
- **Hsu Su-Ming**, Raine L, Fanger H.: Use of anti-avidin antibody and Avidin-biotin-peroxidase in immunohistochemistry.; Am J Clin Pathol 1982 56: 845-56
- **Ichinose A.**, Fujikawa K., Suyama T.: The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin; J.Biol.Chem. 261: 3486-3489, 1986
- **Jänicke F**, Schmitt M, Pache L: Urokinase (u-PA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node negative breast cancer., Breast Cancer Res (Treat 24)1993:195-208
- **Japanese Research Society for Gastric Cancer (JRSGC)**: The general rules for gastric cancer study in surgery and pathology; Jpn J Surg: 11-127, 1981

- **Johnsen M.**, Lund L.R., Romer K., Almholt K., Dano K.: Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation; *Fibrinolysis*. 10:667-671, 1998
- **Kaneko T.**, Konno H., Baba M., Tanaka T., Nakamura S.: Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer; *Cancer Sci* (94) Jan 2003:43-49
- **Konecny G.**, Untch M., Pihan A., Kimming R., Gropp M., Stieber P., Hepp H., Slamon D., Pegram M.: Association of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor with Disease Progression and Prognosis in Ovarian Cancer; *Clinical Cancer Research* (7) Jun 2001:1743-1749
- **Konno H. et al.**: Urokinase Receptor and Vascular Endothelial Growth Factor Are Synergistically Associated with the Liver Metastasis of Colorectal Cancer; *Jpn J Cancer Res.* (92) May 2001:516-523
- **Kristensen P.**, Eriksen J, Blasi F, Dano K.: Two alternatively spliced mouse urokinase receptor mRNAs with different histological localization in the gastrointestinal tract.; *J Cell Biol.* 1991 Dec;115(6):1763-71.
- **Kruithof EK.**, Vassalli JD, Schleuning WD, Mattaliano RJ, Bachmann F.: Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937; *J Biol Chem.* 1986 Aug 25;261(24):11207-13.
- **Kuhn W.**, Schmalfeldt B., Reuning U., Pache L., Berger U., Ulm K., Harbeck N., Späthe K., Dettmar P., Höfler H., Jänicke F., Schmitt M., Graeff H.: Prognostic significance of urokinase (u-PA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc; *British Journal of Cancer* (79) 1999:1746-1751
- **Kuhn W.**, Schmalfeldt B., Reuning U., Pache L., Berger U., Ulm K., Harbeck N., Späthe K., Dettmar P., Höfler H., Jänicke F., Schmitt M., Graeff H.: Prognostic significance of urokinase (u-PA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc; *British Journal of Cancer* (79) 1999:1746-1751
- **Learmonth M.P.**, Namiranian S., Kakkar V.V., Scully M.F.: Modulation of cell binding property of single chain urokinase-type plasminogen activator by neutrophil cathepsin G; *Fibrinolysis*. 6: 113-116, 1992
- **Lehrbach D.M.**, Nita M.E., Cecconello I.: Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinogenesis.; *Arq. Gastroenterol* 2004; 40(4):256-261

- **Leung W.K.**, Lin S.R., Ching J.Y. et al: Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomised trial on Helicobacter pylori eradication; Gut 2004; 53:1217-1219
- **Liotta L.A.**, Steeg P.S., Stetler Stevenson W.G.: Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation.; Cell 64: 327-336, 1991
- **Ljuca D**, Fatusić Z, Iljazović E, Ahmetović B. Monitoring of chemotherapy successfulness of platina/taxol chemotherapy protocol by using determination of serum urokinase plasminogen activator (u-PA) and soluble urokinase plasminogen activator receptor (su-PAR) in patients with ovarian carcinoma FIGO II and III stage; Bosn J Basic Med Sci. 2007 May;7(2):111-6.
- **Ljungh A.** Helicobacter pylori interactions with plasminogen; Methods 2000; 21:151-157
- **Look M.** et al: Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients; Journal of the National Cancer Institute 94(2) Jan 2002:116-128
- **Malfertheiner, P.** (2000): Helicobacter pylori in der Ulkuserkrankung. Helicobacter pylori. Von der Grundlage zur Therapie. 2.Ed. S. 83-90. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- **Marcotte P.**, Henkin J.: Characterization of the activation of pro-urokinase by thermolysin; Biochem.Biophys.Acta. 1160: 105-112, 1993
- **Maruyama K**, Okabayashi K, Kinoshita T. Progress in gastric cancer surgery in Japan and its limits of radicality. World J Surg 1987; 11:418-425.
- **Meininger A.**, Morgner A., Miehle S., Bayerdorffer E., Stolte M.: Atrophy-metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in the stomach: reality or merely an hypothesis? Best Pract Res Clin Gastroenterol 2001 Dec; 15(6):983-98
- **Miettinen M.:** Immunohistochemistry of solid tumors: Brief review of selected problems.; APMIS 98 1990:191-199
- **Mirza Z.K.** et al: Gastric intestinal metaplasia as detected by a monoclonal antibody is highly associated with gastric adenocarcinoma; Gut 2003 Jun; 52(6): 807-12

- **Moll R.**, Franke W.W., Schiller D.L., Geiger B., Krepler R.: The catalogue of human cytokeratins: Pattern of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-24, 1982
- **Müller-Hermelink H.K.**, Hansmann M.L.: Immunohistochemical procedures: applications and problems; *J Clin Chem Clin Biochem.* Vol. 22 1984:953-958
- **Nomura A**, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez Blaser MJ. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; 325:1132-
- **Pantel K.**, Schlimok G., Braun S., Kutter D., Lindemann F., Schaller G., Funke I, Izbicki J., Riethmüller G.: Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Nat Cancer Inst* 85(17): 1419-1423, 1993
- **Papadopoulou S.**, Scorilas A., Yotis J., Arnogianaki N., Plataniotis G., Agnanti N., Talieri M. : Significance of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Expression in Human Colorectal Carcinomas; *TumorBiology* (23) 2002:170-178
- **Pappot H.**, Gårdsvoll H., Rómer J., Pedersen A.N., Gróndahl-Hansen J, Pyke Ch., Brúnner N.: Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 in Cancer: Threapeutic and Prognostic Implications.; *Biol.Chem.Hoppe-Seyler*, Vol.376:259-27, May 1995
- **Parsonnet J**, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman Orentreich N, Sibley RK. Helicobacter pylori infection and the gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325:1127-1131.
- **Peckham M.J.**, Pinedo H.M., Veronesi U. *Oxford Textbook of Oncology.* Oxford University Press; 1995.
- **Pedersen H.**, Brunner N., Francis D., Osterlind K., Ronne E., Hansen H., Dano K., Grondal-Hansen J.: Progostic impast of urokinase, urokinase receptor, and type plasminogen activator inhibitor in squamous large cell lung cancer tissue; *Cancer Res* 54(17) Sep 1994:4671-5
- **Plesner T**, Behrendt N, Ploug M. : Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, u-PAR; *Stem Cells.* 1997;15(6):398-408. Review.

- **Ploug M**, Behrendt N, Lober D, Dano K.: Protein structure and membrane anchorage of the cellular receptor for urokinase-type plasminogen activator; *Semin Thromb Hemost.* 1991 Jul;17(3):183-93
- **Pöllänen J.**, Stephens R.W., Vaheri A.: Directed plasminogen activation at the surface of normal and malignant cells.; *Adv.Cancer Res.* 37: 273-328, 1991
- **Pyke C**, Eriksen J, Solberg H, Nielsen BS, Kristensen P, Lund LR, Dano K.: An alternatively spliced variant of mRNA for the human receptor for urokinase plasminogen activator.; *FEBS Lett.* 1993 Jul 12;326(1-3):69-74.
- **Riede U.N.**, Schäfer E. : *Allgemeine und spezielle Pathologie.*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 697-702, 1993
- **Riesenberg R.**, Oberneder R., Kriegmair M., Epp M., Bitzer U., Hofstetter A., Braun S., Riethmüller G., Pantel K.: Immunocytochemical double staining of cytokeratin and prostate specific antigen in individual prostatic tumour cells. *Histochemistry* 99: 61-66, 1993
- **Riisbro R**, Stephens RW, Brünner N, Christensen IJ, Nielsen HJ, Heilmann L, von Tempelhoff GF. Soluble urokinase plasminogen activator receptor in preoperatively obtained plasma from patients with gynecological cancer or benign gynecological diseases. *Gynecol Oncol.* 2001 Sep;82(3):523-31.
- **Roder J.D.**, Bottcher K, Siewert J.R., Busch R, Hermanek P, Meyer H.J., Prognostic factors in gastric carcinoma. Results of the German Gastric Carcinoma Study 1992. *Cancer* 1993; 72:2089-2097.
- **Rohen J.W.**, Durst J. : *Operationstechniken in der Chirurgie*; Schattauer: 443-488, 1998
- **Roldan A.L.**, Cubellis M.V., Masucci M.T., Behrendt N., Lund L.R., Danó K., Blasi F.: Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell-surface plasmin-dependent proteolysis; *EMBO J.* 9: 467-474, 1990
- **Ryall A.** *Technique of Cancer Operations.* British Medical Journal 1908.
- **Salden M.**, Splinter T.A., Perters H.A., Look M.P. Timmermann M., van Meerbeeck J.P., Foekens J.A.: The urokinase-type plasminogen actiator system in resected non small-cell lung cancer. Rotterdam Oncology Thoracic Group; *Ann Oncol* 11(3) Mar 2000:327-323

- **Sanson M**, Cited by Papac R. Fait remarquable de diathèse cancéreuse. Gaz Med de Paris 1834.
- **Sier C.F.M.**, Verspaget H.W., Griffioen G., Ganesh S., Vloedgraven J.H., Lamers C.B.: Plasminogen activators in normal tissue and carcinomas of the human oesophagus and stomach.; GUT 1993; 34:80-85
- **Tajima Y.** et al: Gastric and intestinal phenotypic marker expression in gastric carcinomas and its prognostic significance: immunohistochemical analysis of 136 lesions; Oncology 2001; 61(3):212-220
- **Takai S.**, Yamamura M., et al: Plasminogen activators in human gastric cancers: correlation with DNA ploidy and immunohistochemical staining; Int J Cancer (48) 1991:20-27
- **Townsend C.M.** Sabiston Textbook of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice. W B Saunders Co; 2001.
- **Uemura N**, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med 2001; 345:784-789.
- **Uemura N.** (2003):H. pylori infection and the development of gastric cancer in Japan. Nippon Rinsho. 61, 9-25.
- **Uemura N.**, Okamoto, S., Yamamoto, S. (2002): H. pylori infection and the development of gastric cancer. Keio J. Med. 51 (suppl 2), 8-63.
- **Vassalli J.D.**, Baccino D., Belin D.: A cellular binding site for the Mr 55000 form of the human plasminogen activator, urokinase; J.Cell.Biol. 100: 86-92, 1985
- **White W.F.**, Barlow G.H., Mozen M.M. Biochemistry 1966; 5:2160-2169
- **Yang J.L.**, Seetoo D., et al.: Urokinase-type plasminogen activator and its receptor in colorectal cancer: independent prognostic factors of metastasis and cancer-specific survival and potential therapeutic targets; Int J Cancer (89) 2000:431-439
- **Zheng Q.**, Tang Z.Y., Xue Q., Shi D.R., Song H.Y., Tang H.B.: Invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma in relation to urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitor; J Cancer Res Clin Oncol 126(11) Nov 2000:641-6

8. Anhang / Farbtafeln

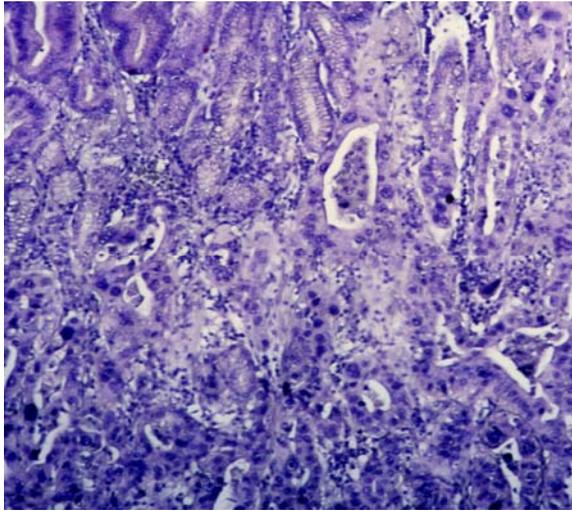


Bild 1.: Tumorgewebe, Karzinom vom Mischtyp nach Lauren, negativ, score0, keine Anfärbung (x400)

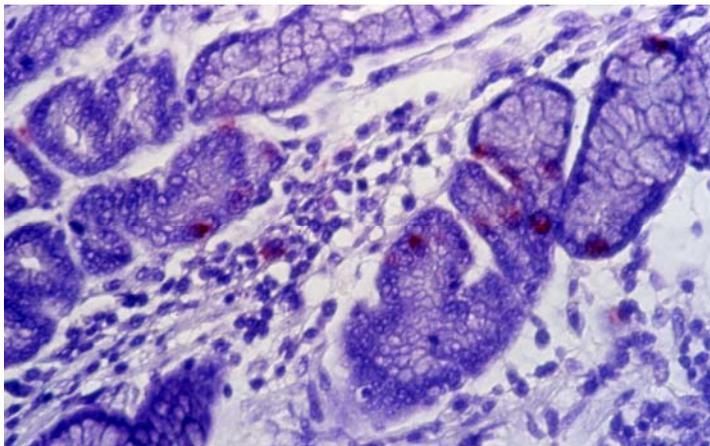


Bild 2.: Tumorgewebe, Karzinom vom intestinalen Typ nach Lauren, u-PA, score1 (< 30% Anfärbung) (x500)

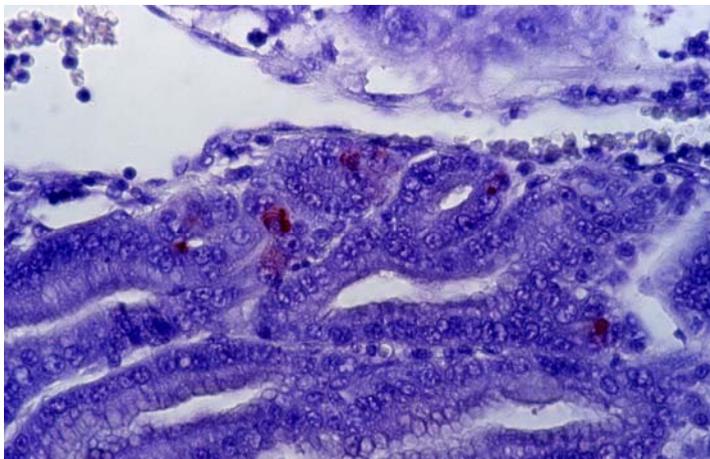


Bild 3.: Tumorgewebe, Karzinom vom intestinalen Typ nach Lauren, u-PA, score1 (< 30% Anfärbung) (x500)

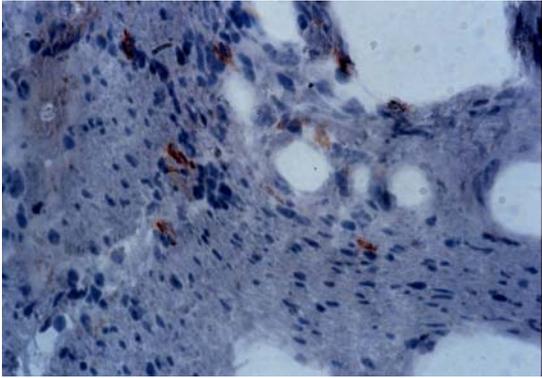


Bild 4.: Tumorgewebe, Karzinom vom diffusen Typ nach Lauren, u-PAR, score1 (<30% Anfärbung) (x400)

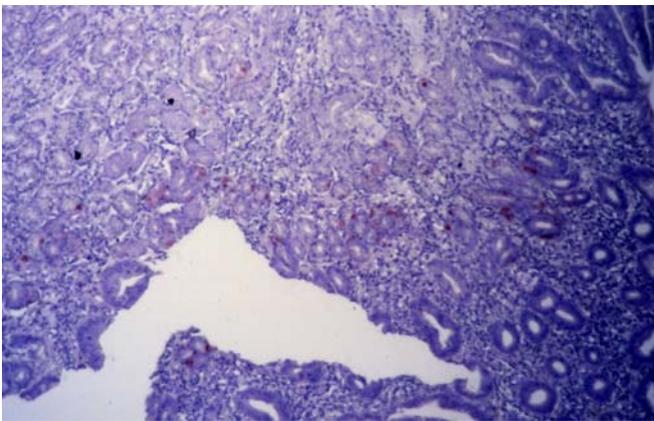


Bild 5.: Tumorgewebe, Karzinom vom intestinalen Typ nach Lauren, u-PAR, score1 (<30% Anfärbung) (x200)

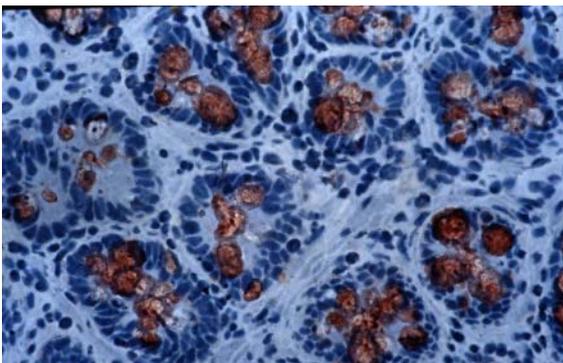


Bild 6.: Normalgewebe, Intestinale Metaplasie, PAI-1, score2 (zwischen 30-70% Anfärbung) (x500)

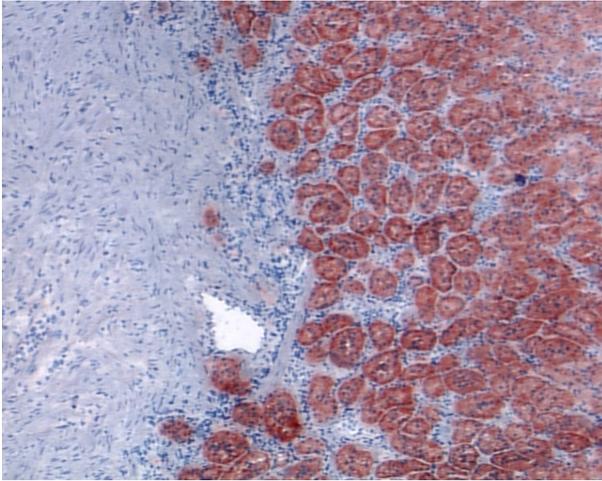


Bild 7.: Tumorgewebe, Karzinom vom intestinalen Typ nach Lauren, PAI-1, score3 (> 70% Anfärbung) (x200) Mucosa, bei praktisch negativer Stroma, assoziiertes OP-Präparat zu Bild 8.

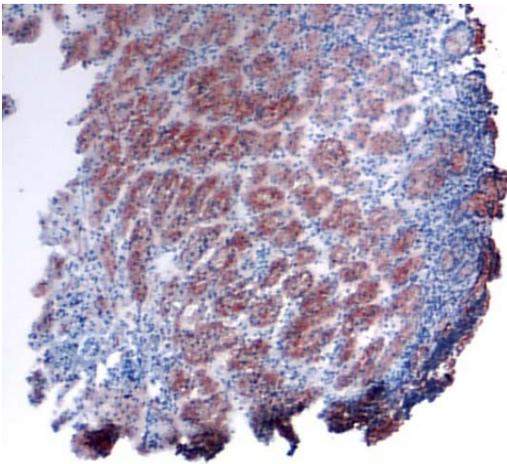


Bild 8.: Tumorgewebe, Karzinom vom intestinalen Typ nach Lauren, PAI-1, score3 (> 70% Anfärbung) (x200) Mucosa

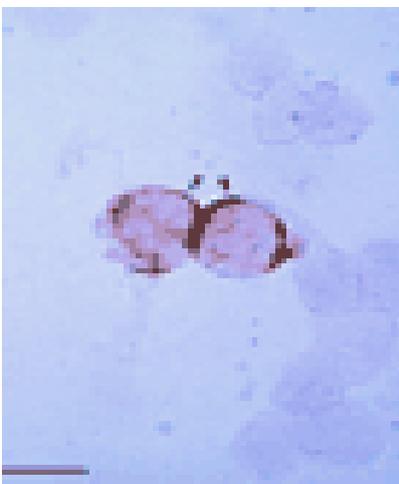


Bild 9.:Zwei Tumorzellen im Knochenmark mit positiver u-PAR-Färbung,(x1000)

9. Danksagung

Frau **Prof. H. Allgayer** danke ich sehr für die Möglichkeit, diese Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können. Und ganz besonders für ihre Freundschaft, ohne die ich es wahrscheinlich nie geschafft hätte.

Herzlichen Dank auch an **Dr. E. Simon** für eine hervorragende Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch **Herrn Prof. F:W. Schildberg** und **Prof. K.W. Jauch** für ihre Unterstützung innerhalb ihrer Abteilung

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei **Prof. M.M. Heiss** für die Mitbetreuung, und dafür dass er mir auch klinisch eine Basis gegeben hat, bedanken

Danke auch an **Dr. A. Tarabichi**, **Dr. M. Stöhlein** und natürlich **Dr. U. Grützner** für eine tolle Zeit im Labor.

Ganz besonders möchte ich meiner **Familie**, insbesondere meinen Eltern für ihr Vertrauen in mich und die Unterstützung, die mir diesen Weg erst ermöglicht hat, danken.

Mein größter Dank gilt **Hannes** – für alles

10. Curriculum Vitae

Angaben zur Person

Name: Bianka Beyer
Geburtsdatum: 27.09.1969
Geburtsort: Nabburg/Oberpfalz
Eltern: Josef und Christina Beyer, 92507 Nabburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1976-1980 Volksschule Nabburg
1980-1990 Johann Andreas Schmeller-Gymnasium
Humanistischer Zweig
Juni 1990 Abitur

Studium

November 1990 Beginn des Studiums der
Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians
Universität München
März 1993 Ärztliche Vorprüfung
August 1994 Erstes Staatsexamen
August 1996 Zweites Staatsexamen
28.November 1997 Drittes Staatsexamen

Dissertation

„Expression des Urokinase-Systems bei
Magenkarzinomen – Bestätigung der prognostischen
Bedeutung in einer unabhängigen Patientenserie und
erstmaliger Nachweis einer Relevanz in präoperativen
Biopsien und Metaplasien“
Beginn: Februar 1996

Arbeitsgruppe: Prof. Dr. med. Dipl. oec. H. Allgayer
PhD / Prof. Dr.med.M.M.Heiss,

Tumorimmunologie, Klin.Forsch.Chirurgie
Chirurgische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum
Großhadern

Experimentelle Chirurgie, Medizinische Fakultät
Mannheim der Universität Heidelberg

Beruf

15.01.1998 – 15.07.1999 Ärztin im Praktikum
(15.01.1998 – 1.05.1998 Chirurgische Poliklinik A)
(01.05.1998 – 30.07.1999 Gefäßchirurgie Prof. Lauterjung)
seit 15.07.1999 Assistenzärztin
(30.07.1999 – 05.04.2000 Chirurgische Poliklinik A)
(06.04.2000 – 03.06.2001 Intensivstation Prof. Inthorn)
(04.06.2001 – 20.11.2001 Viszeralchirurgie PD Dr Meyer)
(21.11.2001 – 30.09.2002 Chirurg.. Privatstation Prof Schildberg)
(01.10.2002 – 31.03.2003 Handchirurgie Prof. Baumeister)
(01.04.2003. – 28.01.2004 Traumatologie Prof. Lob)
seit 28.01.2004 Fachärztin für Chirurgie
(28.01.2004 – 31.10.2004 Traumatologie Prof. Lob)
(01.11.2004 – 30.04.2005 Intesivstation Prof. Hartl)
(01.05.2005 –15.10.2006 Traumatologie PD Dr Piltz)
(16.10.2007 – 02.04.2007 Chirurgische Poliklinik A Dr. Steitz)
(02.04.2007–10.05.2007 Traumatologie PD Dr Piltz)
seit 10.05.2007 Fachärztin für Unfallchirurgie
(10.05.2007 – aktuell Traumatologie PD Dr Piltz)

11. Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht unter 1. und 2.

- 1: [Beyer BC, Heiss MM, Simon EH, Gruetzner KU, Babic R, Jauch KW, Schildberg FW, Allgayer H.](#) [Related Articles,](#) [Links](#)
 Urokinase system expression in gastric carcinoma: prognostic impact in an independent patient series and first evidence of predictive value in preoperative biopsy and intestinal metaplasia specimens. Cancer. 2006 Mar 1;106(5):1026-35. PMID: 16435385 [PubMed - indexed for MEDLINE]

- 2: [Heiss MM, Simon EH, Beyer BC, Gruetzner KU, Tarabichi A, Babic R, Schildberg FW, Allgayer H.](#) [Related Articles,](#) [Links](#)
 Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow. J Clin Oncol. 2002 Apr 15;20(8):2005-16. PMID: 11956259 [PubMed - indexed for MEDLINE]

- 3: [Allgayer H, Babic R, Grutzner KU, Beyer BC, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM.](#) [Related Articles,](#) [Links](#)
 Tumor-associated proteases and inhibitors in gastric cancer: analysis of prognostic impact and individual risk protease patterns. Clin Exp Metastasis. 1998 Jan;16(1):62-73. PMID: 9502078 [PubMed - indexed for MEDLINE]

- 4: [Allgayer H, Babic R, Beyer BC, Grutzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM.](#) [Related Articles,](#) [Links](#)
 Prognostic relevance of MMP-2 (72-kD collagenase IV) in gastric cancer. Oncology. 1998 Mar-Apr;55(2):152-60. PMID: 9499190 [PubMed - indexed for MEDLINE]

- 5: [Allgayer H, Babic R, Grutzner KU, Beyer BC, Tarabichi A, Wilhelm Schildberg F, Heiss MM.](#) [Related Articles,](#) [Links](#)
 An immunohistochemical assessment of cathepsin D in gastric carcinoma: its impact on clinical prognosis. Cancer. 1997 Jul 15;80(2):179-87. PMID: 9217027 [PubMed - indexed for MEDLINE]

München, den 12.08.2007

Bianka Beyer