

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Dr. h. c. Peter Malfertheiner)

Expressionsanalyse der Leukotrienrezeptoren
im Plattenepithelkarzinom
des Ösophagus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von	Christoph Helmke
aus	Behnsdorf
Magdeburg	2015

Dokumentationsblatt

bibliografische Beschreibung:

Helmke, Christoph:

Expressionsanalyse der Leukotrienrezeptoren im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. -2015. 90Bl. -: 9 Abb., 5 Tbl., 2 Anl.

Kurzreferat

Leukotrien-B4-Rezeptoren (BLT-1 und BLT-2) und Cysteinyl-Leukotrienrezeptoren (CysLT-1 und CysLT-2) sind mit der Entstehung maligner Tumoren assoziiert. Im Rahmen der vorliegenden Studie beabsichtigten wir die Expression des Leukotrienrezeptorsystems im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (PEK) mittels Immunhistochemie (IHC) und „realtime“-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) von BLT-1, BLT-2, CysLT-1 und CysLT-2 abzuklären. Es wurden Biopsien aus Karzinom und tumorfreier Ösophagusk Mukosa (TF) von Patienten mit PEK (N=19) sowie Biopsien aus dem distalen Ösophagus von Patienten mit funktioneller Dyspepsie (N=9, K) untersucht. Eine Expression von BLT-1/-2 und CysLT-1/-2 konnte für das PEK nachgewiesen werden. Diese bestand auch für die nichttransformierte Mukosa in TF und K. Für die Blt-1 und Cyslt-2 Genexpression offenbarte die RT-PCR bereits eine Dysregulation in der TF Ösophagusk Mukosa von Patienten mit PEK. In Zusammenschau der Befunde stützt der Nachweis der Leukotrienrezeptoren im PEK eine Rolle dieser an Entstehung und Verlauf des Malignoms. Eine Dysregulation der Blt-1 und Cyslt-2 Genexpression in TF von Patienten mit PEK des Ösophagus kann als Nachweis für frühzeitige Veränderungen der Mukosa im Rahmen der Ösophaguskarzinogenese angesehen werden.

Schlüsselwörter: Plattenepithelkarzinom, Leukotrienrezeptoren

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungen	6
2.	Einleitung	8
2.1.	Das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	8
2.1.1.	Epidemiologie	8
2.1.2.	Ätiologie	8
2.1.3.	Symptomatik	12
2.1.4.	Diagnostik/„Staging“	13
2.1.5.	Therapie	16
2.1.6.	Prognose	18
2.2.	Der Arachidonsäurestoffwechselweg	20
2.3.	Die Leukotriene	23
2.4.	Charakterisierung des Leukotrienrezeptoren	24
2.4.1.	Die Leukotrien-B ₄ -Rezeptoren	24
2.4.2.	Cysteinyl-Leukotrienrezeptoren	26
2.5.	Ziel der Studie	28
3.	Patienten und Methoden	29
3.1.	Studiendesign	29
3.2.	Ösophagogastroduodenoskopie	29
3.3.	Klinische Datenerhebung	30
3.4.	Extraktion der RNA	30
3.5.	Quantitative RT-PCR-Analyse von Blt-1, Blt-2, Cysl1 und Cysl2	31
3.6.	Immunhistochemischer Nachweis von BLT-1, BLT-2, CysLT-1 und CysLT-2	31
3.7.	Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung	33
3.8.	Statistische Analyse	34
4.	Ergebnisse	36
4.1.	Ergebnisse der klinischen Datenerhebung	36
4.2.	Allgemeine Erläuterungen zur Auswertung	39
4.2.1.	Immunhistochemische Expression von BLT-1	39

4.2.2.	Immunhistochemische Expression von BLT-2	41
4.3.1.	Immunhistochemische Expression von CysLT-1	43
4.3.2.	Immunhistochemische Expression von CysLT-2	45
4.4.	Ergebnisse der explorativen Analyse sekundärer Fragestellungen	47
4.4.1.	Leukotrienrezeptorexpression und Tumorstadium	47
4.4.2.	Immunhistochemischer Nachweis von BLT-1 in der tumorfreien Mukosa der Patienten mit Plattenepithelkarzinom und der Kontrolle	47
4.4.3.	Immunhistochemischer Nachweis von BLT-2 in der tumorfreien Mukosa der Patienten mit Plattenepithelkarzinom und der Kontrolle	47
4.4.4.	Immunhistochemischer Nachweis von CysLT-1 in der tumorfreien Mukosa der Patienten mit Plattenepithelkarzinom und der Kontrolle	48
4.4.5.	Immunhistochemischer Nachweis von CysLT-2 in der tumorfreien Mukosa der Patienten mit Plattenepithelkarzinom und der Kontrolle	48
4.4.6.	Expressionsanalyse von Blt-1/-2 auf mRNA-Ebene im Karzinom, der tumorfreien Schleimhaut und der Kontrolle	50
4.4.7.	Expressionsanalyse von Cyslt-1/-2 auf mRNA-Ebene im Karzinom, der tumorfreien Schleimhaut und der Kontrolle	50
5.	Diskussion	52
5.1.	Bedeutung der BLT-1 Expression im PEK des Ösophagus und in der nichttransformierten Ösophagusschleimhaut	52
5.2.	Bedeutung der BLT-2 Expression im PEK des Ösophagus und in der nichttransformierten Ösophagusschleimhaut	55
5.3.	Bedeutung der CysLT-1 Expression im PEK des Ösophagus und in der nichttransformierten Ösophagusschleimhaut	59

5.4.	Bedeutung der CysLT-2 Expression im PEK des Ösophagus und in der nichttransformierten Ösophagusschleimhaut	63
6.	Schlussfolgerung	66
7.	Zusammenfassung	67
8.	Literaturverzeichnis	68
9.	Danksagung	82
10.	Erklärung	83
11.	Darstellung des Bildungsweges	84
12.	Anhang	85

1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
a.u.	„arbitrary units“
BLT-1/-2	B-Leukotrienrezeptor-1/-2
bzw.	beziehungsweise
cDNA	„complementary DNA“
CI	„confidence interval“
COPD	„chronic obstructive pulmonary disease“
COX-1/-2	Cyclooxygenase-1/-2
CT	Computertomographie
CysLT-1/-2	Cysteinyl Leukotrienrezeptor-1/-2
DMBA	Dimethylbenzathracene
DNA	„deoxyribonucleic acid“
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	„desoxyribonucleic triphosphate“
DP	Prostaglandin-D ₂ -Rezeptor
DS	„downstream“
EP ₁₋₄	Prostaglandin-E ₂ -Rezeptor 1-4
EMT	epitheliale-mesenchymale-Transition
FLAP	„five lox activating protein“
FP	Prostaglandin-F _{2α} -Rezeptor
GPCR	„G-protein coupled receptor“
HETE	„Hydroxyeicosatetraenoic acid“
HPETE	„Hydroxyperoxyeicosatetraenoic acid“
HR	„hazard ratio“
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IP	Prostaglandin-I ₂ -Rezeptor
IPMN	intraepitheliale papillär muzinöse Neoplasie
IRS	„Immunoreactivity score“
K	Kontrolle

Lk	Lymphknoten
LOX	Lipoxygenase
LTA ₄ -E ₄	Leukotrien A ₄ -E ₄
MDR	„multidrug resistance gene“
mRNA	„messenger RNA“
OR	„odds ratio“
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
PEK	Plattenepithelkarzinom
PET	Positronenemissionstomographie
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PMN	polymorph-nukleäre
qRT-PCR	„quantitative realtime PCR“
RCX	Radiochemotherapie
RNA	„ribonucleic acid“
RR	relatives Risiko
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	„realtime PCR“
RT	„reverse transcriptase“
siRNA	„small-interfering RNA“
TGF	„transforming growth factor“
Tis	Tumor <i>in situ</i>
TF	tumorfremie Schleimhaut
TNM	Tumor, <i>Nodus</i> , (Fern)Metastase
TP	Thromboxan-A ₂ -Rezeptor
u.a.	unter anderem
UICC	<i>Union International Contre le Cancer</i>
US	„upstream“
UV	ultraviolett
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
WHO	<i>World Health Organization</i>
Z.n.	Zustand nach

2. Einleitung

2.1. Das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

2.1.1. Epidemiologie

Am Ösophaguskarzinom verstarben im Jahre 2012 weltweit rund 400.000 Menschen. Unter den Malignomen weist es global die sechst höchste Mortalitätsrate auf (Ferlay *et al.* 2013). Man unterscheidet grundsätzlich zwei verschiedene histologische Formen des Ösophaguskarzinoms, das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom. Das Plattenepithelkarzinom ist als histologischer Subtyp weltweit dominierend. Zu den Hochrisikogebieten für die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms gehören Teile Südostafrikas, Südamerikas und dem sogenannten asiatischen „esophageal cancer belt“. Dieser erstreckt sich vom Nordiran über Zentralasien bis nach Nordchina und wies zur Jahrtausendwende regional jährliche Neuerkrankungsraten von 200/100.000 Einwohner auf (Parkin *et al.* 2001). Für Westeuropa war hingegen im Jahre 2012 eine Inzidenzrate von 3,4/100.000 bei starken regionalen Schwankungen feststellbar. Innerhalb Europas zeigt sich die höchste Inzidenzrate im Vereinigten Königreich (Männer 10,0/100.000; Frauen 3,5/100.000), die niedrigste in Griechenland (Männer 1,6/100.000; Frauen 0,2/100.000). In Deutschland beträgt die jährliche Neuerkrankungsrate 6,9/100.000 für Männer und 1,4/100.000 für Frauen (Ferlay *et al.* 2013). Dabei lässt sich für die histologische Subform des Plattenepithelkarzinoms eine Inzidenzrate von 3,5-5/100.000 für Männer und 0,4-0,8/100.000 für Frauen beobachten (Bareiß *et al.* 2002).

2.1.2. Ätiologie

Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms sind Tabak- und übermäßiger (schädlicher) Alkoholkonsum. Die häufigste Form des Tabakkonsums stellt gegenwärtig mit 82% weltweit das Zigarettenrauchen dar (Giovino *et al.* 2012). Die Frequenz und Dauer des Zigarettenkonsums sowie die Anzahl der „packyears“ korrelierten in verschiedenen Studien mit dem individuellen Erkrankungsrisiko (Hashibe *et al.* 2007, Ishiguro *et al.* 2008, Steevens *et al.* 2010). In einer gebündelten Analyse von 12 Fallkontrollstudien mit 915 Patienten mit Plattenepithelkarzinom (PEK) des Ösophagus bestand für aktive Raucher mit > 60 „packyears“ eine mehr als 5,5-fache Zunahme des Risikos gegenüber Nichtrauchern (Odds Ratio (OR) 5,63; CI 2,7 -

11,7; Lubin *et al.* 2012). Verschiedene Studien konnten diesbezüglich nach Beendigung des Rauchens eine Abnahme der Assoziation im Verlauf aufzeigen, jedoch blieb diese gegenüber lebenslangen Nichtrauchern weiterhin erhöht (Freedman *et al.* 2007, Hashibe *et al.* 2007, Bosetti *et al.* 2008). Beispielhaft war in einer multizentrischen Fallkontrollstudie aus Osteuropa das Hazard Ratio (HR) für die Entwicklung eines PEK des Ösophagus 7,41 (CI 3,98 – 13,79) für aktive Raucher und 2,40 (CI 1,18 – 4,89) für ehemalige Tabakkonsumenten (Hashibe *et al.* 2007). Für aktive Raucher besteht wiederum ein kumulatives Lebenszeitrisiko von 1,0 % (CI 0,9 – 1,1), bis zum fünfundsiebzigsten Lebensjahr an einem PEK des Ösophagus zu erkranken, wie Bosetti *et al.* (2008) in einer italienischen Fallkontrollstudie zeigen konnten.

Ein übermäßiger Alkoholkonsum führt ebenfalls zu einer Zunahme des Erkrankungsrisikos. Ist ein täglicher Konsum von 25g Alkohol noch mit einer 1,5-fachen (Relatives Risiko (RR) 1,51; CI 1,48 – 1,55) Risikosteigerung assoziiert, so steigt dieses bei 100g täglich bereits auf das Vierfache an (RR 4,23; CI 3,91 – 4,59), wie eine italienische Metaanalyse aus 187 Fallkontroll- und 87 Kohortenstudien zeigen konnte (Bagnardi *et al.* 2001). Ein Konsum geringerer Alkoholmengen wird gegenwärtig unterschiedlich beurteilt. Islami *et al.* (2011) konnten in einer anderen italienischen Metaanalyse aus acht Fallkontroll- und einer prospektiven Kohortenstudie für Nichtraucher keine Auswirkung auf das Erkrankungsrisiko bei einem täglichen Konsum von $\leq 12,5$ g Alkohol nachweisen (RR 0,74; CI 0,47 – 1,16). Freedman *et al.* (2007) diskutierten hingegen an einer prospektiven amerikanischen Kohortenstudie einen protektiven Effekt. Abstinenz zeigte sich im Vergleich zum täglichen Konsum geringer Alkoholmengen (≤ 13 g) mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert (RR 2,06; CI 1,16 – 3,68). In Einklang hierzu beschrieben Jin *et al.* (2012) in einer Metaanalyse an 18 prospektiven Kohortenstudien eine Assoziation zwischen dem Konsum täglicher Alkoholmengen von $\leq 12,5$ g und einer Reduktion der Mortalität an Karzinomen allgemein (RR 0,91; CI 0,89 – 0,94).

Diskutiert wird weiterhin eine Interaktion beim Tabak- und Alkoholkonsum. So zeigte die kombinierte Analyse zweier prospektiver japanischer Kohortenstudien eine neunfache Risikozunahme bei Vorliegen beider Einzelrisikofaktoren (HR 9,23; CI 2,10 – 40,60; Ishikawa *et al.* 2006). Hashibe *et al.* (2007) beobachteten in einer multizentrischen Fallkontrollstudie aus Osteuropa eine ähnliche Interaktion (OR 9,41;

CI 0,88 – 100,27).

Eine Rolle weiterer Ernährungsfaktoren wird insbesondere für die hohen Inzidenzraten in den Schwellen- und Entwicklungsländern diskutiert. In unterschiedlichen Studien konnte eine Assoziation mit dem unzureichenden Verzehr von rohem Gemüse oder Obst und einem erhöhten Erkrankungsrisiko für das Ösophaguskarzinom aufgezeigt werden (Steinmetz *et al.* 1991).

Als begünstigend wird außerdem eine unzureichende Ernährung mit den Antioxidantien Vitamin E und Selen diskutiert. Eine Bedeutung wird hier für Hochinzidenzregionen gesehen, in denen die lokale Bevölkerung häufig schwere Ernährungsdefizite aufweist. Beispielsweise untersuchten Jessri *et al.* (2011) in einer iranischen Fallkontrollstudie die Assoziation zwischen dem Risiko für ein PEK des Ösophagus und der Konsummenge unterschiedlicher Makronährstoffe, Vitamine und Spurenelemente in der Hochrisikoregion Kurdistan. Es konnte mit steigender Selen- bzw. Vitamin E Zufuhr eine Abnahme des OR auf 0,15 (CI 0,01 – 0,76) bzw. 0,11 (CI 0,03 – 0,74; jeweils niedrigste *versus* höchste Terzile) beobachtet werden. Bei guter Ernährungssituation ist aktuell hingegen von keinem Nutzen einer zusätzlichen Supplementation auszugehen. In einer dänischen Metaanalyse mehrerer randomisierter, kontrollierter Studien wurde die Assoziation zwischen der Einnahme verschiedener Antioxidantien, u.a. Vitamin E und Selen, und dem Erkrankungsrisiko für gastrointestinale Tumoren untersucht. Die Mehrzahl der Einzelstudien war in Ländern mit mittlerem und hohem Einkommen durchgeführt worden. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Verum- und Placebogruppe beobachtet werden (RR 1,04; CI 0,96 – 1,13; Bjelakovic *et al.* 2008). Zudem existieren gegenwärtig Hinweise auf ein erhöhtes Morbiditätsrisiko durch die Supplementation von Vitamin E und Selen bei Fehlen eines Mangelzustandes (Jayaprakash *et al.* 2011).

Das thermische Trauma des Ösophagus repräsentiert einen weiteren Risikofaktor. Die Mehrzahl der publizierten Studien zeigt diesbezüglich eine positive Assoziation zwischen einer hohen Trinktemperatur von Getränken und dem individuellen Risiko am PEK des Ösophagus zu erkranken auf (Islami *et al.* 2009a). In einer iranischen Fallkontrollstudie mit 300 ösophagealen Plattenepithelkarzinomen stieg das Risiko für die Entwicklung eines PEK des Ösophagus um das Zweifache (OR 2,07; CI 1,28 – 3,35) für Konsumenten heißen Tees an. Bei Konsum subjektiv sehr heißen Tees konnte

bereits ein achtfach erhöhtes Risiko beobachtet werden (OR 8,16; CI 3,93 – 16,91; Islami *et al.* 2009a).

In Südamerika ist der Genuss von Mate als fördernder Faktor für die Entwicklung des PEK des Ösophagus in der Diskussion. Hierzu konnten Castellsague *et al.* (2000) in einer Metaanalyse mehrerer Fallkontrollstudien für den Konsum von > 1l Mate täglich (OR 1,57; CI 1,22 – 2,03) eine erhöhte Assoziation mit einem ösophagealen Plattenepithelkarzinom aufzeigen. Der Genuss subjektiv sehr heißen Mates war ebenfalls mit einer Risikosteigerung assoziiert (OR 1,57; CI 1,22 – 2,03). Die Kombination aus sehr hoher Trinktemperatur und hoher Konsummenge (> 1,5l täglich) bewirkte eine Zunahme des OR auf 4,14 (CI 2,24 – 7,67) für ein PEK des Ösophagus. Kamangar *et al.* (2008) konnten weiterhin eine erhöhte Belastung kommerziell erhältlicher Matesorten mit polyzyklisch aromatischen Kohlenwasserstoffen nachweisen. Letztere werden als humane Kanzerogene klassifiziert und haben für exponierte Individuen in verschiedenen Studien ein exzessives Erkrankungsrisiko für ein PEK des Ösophagus gezeigt (Roshandel *et al.* 2012). Als Indikatoren einer Exposition gelten u.a. polyzyklisch aromatische Kohlenwasserstoff-Desoxyribonukleinsäureaddukte (DNS-Addukte). Diese werden in direkten Zusammenhang mit genetischen Alterationen gebracht (Roshandel *et al.* 2012). Eine iranische Fallkontrollstudie untersuchte in 93 Patienten diesbezüglich immunhistochemisch PEK des Ösophagus sowie nichtmaligne ösophageale Mukosa. Zwischen dem ösophagealen Plattenepithelkarzinom und der nichtmalignen Schleimhaut erkrankter Individuen bestand ein OR von 12,6 (CI 2,31 – 63,8) hinsichtlich dieser DNS-Addukte. Gegenüber der Mukosa einer gesunden Kontrollpopulation betrug das OR 24,26 (CI 2,89 – 203,48; Marjani *et al.* 2010).

Diskutiert wird weiterhin der Einfluss sozioökonomischer Faktoren auf das individuelle Erkrankungsrisiko. Islami *et al.* (2009b) konnten in einer Fallkontrollstudie aus dem Iran zeigen, dass Bevölkerungsteile mit einem niedrigeren sozioökonomischen Status eine erhöhte Morbidität im Hinblick auf die Entwicklung eines Ösophaguskarzinoms aufwiesen. Bedeutendster Einzelrisikofaktor war das Bildungsniveau, das sich invers mit dem Risiko für Speiseröhrenkrebs korreliert zeigte. So reduzierte sich das Erkrankungsrisiko bei Besuch einer Grundschule um fast 50 % (OR 0,52; CI 0,27 – 0,98). Bei höhergradiger Schulbildung sank das OR weiter auf 0,2 (CI 0,06 – 0,65).

Daneben erhöht das Vorliegen einer Achalasie, eines Plummer-Vinson Syndroms oder einer Tylosis *palmaris et plantaris* das Risiko für die Entstehung eines PEK des Ösophagus. Die Achalasie repräsentiert eine Motilitätsstörung der Speiseröhre, für welche durch Leeuwenburgh *et al.* (2010) in einer prospektiven klinischen Studie aus den Niederlanden ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines PEK des Ösophagus beobachtet werden konnte (HR 28; CI 17 - 46). Das Plummer-Vinson Syndrom stellt eine seltene Erkrankung dar, die hauptsächlich Frauen mittleren Alters betrifft und durch die Trias Eisenmangelanämie, ösophageale Schleimhautnetze und Dysphagie gekennzeichnet ist. Die Ätiologie ist unklar, das kumulative Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines Ösophagus- oder Pharynxkarzinoms wird auf 3 – 15% geschätzt (Novacek *et al.* 2006). Die Tylosis *palmaris et plantaris* ist eine seltene autosomal dominant vererbte Erkrankung, die mit palmaren und plantaren Hyperkeratosen einhergeht. Es wird zwischen Typ A und B unterschieden. Die Tylosis vom Typ B wird als benigne angesehen und manifestiert sich frühzeitig (< 5 Lebensjahre). Typ A wird klinisch erst später apparent (5 – 15 Lebensjahr), wobei schätzungsweise 60 - 90% der betroffenen Individuen im Verlauf des Lebens an einem PEK des Ösophagus erkranken (Varela *et al.* 2011). Weiterhin diskutiert wird die akzidentelle Ingestion von Lauge als prädisponierender Faktor. In einer retrospektiven finnischen Kohortenstudie war in 63 von 2414 Patienten das Ösophaguskarzinom mit einer laugebedingten Strikturen der Speiseröhre assoziiert (Appelqvist *et al.* 1980).

2.1.3. Symptomatik

PEK des Ösophagus werden häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, da diese Karzinome in einem Frühstadium selten zu Symptomen führen (Bird-Lieberman *et al.* 2009). Die Dysphagie und der Gewichtsverlust werden als Alarmsymptome für ein Malignom des Ösophagus angesehen und benötigen eine unverzügliche Diagnostik (Kapoor *et al.* 2005). In einer britischen Kohortenstudie konnte für die Dysphagie allgemein ein positiver prädiktiver Wert von 5,3% (CI 4,4 – 6,2) für Männer sowie 2,1% (CI 1,6 – 2,6) für Frauen für ein PEK des Ösophagus aufgezeigt werden (Jones *et al.* 2007). Dysphagie und Gewichtsverlust repräsentieren die häufigsten Symptome, die zu einer ärztlichen Vorstellung führen. So werden Dysphagie von mehr als 70% bzw. Gewichtsverlust von mehr als 60% der Patienten mit

PEK des Ösophagus angegeben, wobei in 2 von 3 Fällen sowohl Dysphagie als auch Gewichtsverlust in Kombination auftreten (Venerito *et al.* 2011; Gibbs *et al.* 2007). Weiterhin wurden in einer deutschen Fallkontrollstudie mit 75 PEK des Ösophagus Sodbrennen und Odynophagie als zusätzliche Symptome bei jedem vierten Patienten beobachtet (Venerito *et al.* 2011). Schmerzen beim Schluckvorgang stellen bereits ein Anzeichen für eine Invasion des Tumors in das periösophageale Gewebe dar (Bird-Lieberman *et al.* 2009).

2.1.4. Diagnostik/„staging“

Bei Verdacht auf Vorliegen eines Ösophaguskarzinoms stellt die Ösophagoskopie mit Biopsieentnahme zur histologischen Sicherung die wichtigste diagnostische Maßnahme dar (Mühr-Wilkenshoff *et al.* 2004). Das „staging“ erfolgt nach UICC (*Union International Contre le Cancer*) entsprechend der TNM-Klassifikation für maligne Tumoren (Tab. 1.; Wittekind *et al.* 2010, 7. Auflage). Die Endosonographie bietet die größte Sicherheit zur richtigen Beurteilung der muralen Infiltrationstiefe des Tumors (T1-3 Stadium), sowie des lokoregionären Lymphknotenstatus (N-Stadium) und bleibt somit für die korrekte Bestimmung des T- und N-Stadiums unabdingbar (Polkowski 2009). Weiterhin ist eine kontrastmittelverstärkte Computertomographie (CT) des Thorax und Abdomen zur Beurteilung möglicher Infiltrationen in Nachbarorgane (T4 Stadium), sowie zur genaueren Einschätzung des M-Stadiums notwendig (Quint *et al.* 2008). Hochsitzende zervikale Karzinome bedürfen einer Ausdehnung der CT-Untersuchung auf die Halsregion und einer zusätzlichen Untersuchung der Halspartie mittels Sonographie (Mühr-Wilkenshoff *et al.* 2004). Einen zunehmenden Stellenwert hat die Positronenemissionstomographie/Computertomographie (PET/CT), da sich die PET hilfreich bei der Beurteilung unklarer Lymphknotenbefunde und im Auffinden von Fernmetastasen der alleinigen CT als überlegen erwiesen hat (van Vliet *et al.* 2008). In einer prospektiven Kohortenstudie konnten Flamen *et al.* (2000) eine Änderung des „staging“ und der Therapie durch eine PET in 16 von 74 Patienten mit Karzinomen des Ösophagus beobachten. 11 Patienten wurden durch das Resultat der PET-Untersuchung von M0 auf M1 hochgestuft, in 5 Fällen war eine Herunterstufung möglich (M1 auf M0). Aufgrund der spät einsetzenden Klinik sind Früherkennungsmaßnahmen zum Auffinden von Risikoläsionen („high grade“ Dysplasie, *Carcinoma in situ*, Tumore

begrenzt auf die oberen zwei Drittel der Mukosa) besonders für Patienten in Hochrisikogebieten und/oder Risikofaktorexposition von klinischer Bedeutung. Hierbei kann ergänzend zur konventionellen Weißlichtendoskopie durch zusätzliche Anwendung von Lugol'scher Lösung, „narrow band imaging“ oder der Autofluoreszenzendoskopie eine verbesserter Nachweis frühneoplastischer Läsionen erreicht werden (Lopes *et al.* 2012).

Tabelle 1. TNM-Klassifikation für das PEK des Ösophagus nach UICC (7. Auflage) mit Therapie nach Tumorstadium.

T - Primärtumor: Tx Primärtumor nicht beurteilbar, T0 kein Anhalt für Primärtumor, Tis *Carcinoma in situ*, T1 Infiltration der *Lamina propria* bis *Muscularis mucosae* (T1a) oder Submukosa (T1b), T2 Infiltration der *Muscularis propria*, T3 Infiltration der Adventitia, T4 Infiltration der Nachbarstruktur (T4a Pleura, Perikard, Zwerchfell; T4b Aorta, Wirbelkörper, Trachea); N – regionäre Lymphknoten (Lk): Nx regionäre Lk nicht beurteilbar, N0 keine regionäre Lk-Metastase, N1 1-2 regionäre Lk-Metastasen, N2 3-6 regionäre Lk-Metastasen, N3 ≥ 7 regionäre Lk-Metastasen; M – Fernmetastasen: M0 keine Fernmetastasen, M1 Fernmetastasen. RCX Radiochemotherapie.

Stadium 0	Tis	N0	M0	Mukosektomie
Stadium IA	T1a			
	T1b			Ösophagektomie
Stadium IB	T2			
Stadium IIA	T3			
Stadium IIB	T1, T2	N1		neoadjuvante RCX mit Ösophagektomie/ definitive RCX
Stadium IIIA	T4a	N0		
	T3	N1		
	T1, T2	N2		
Stadium IIIB	T3	N2		
Stadium IIIC	T4a	N1, N2		
	T4b	Jedes N		
	Jedes T	N3		
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1	Palliation

2.1.5. Therapie

Die Therapie des Ösophaguskarzinoms ist abhängig vom Stadium, individuellem „performance status“ sowie dem Patientenwunsch (Tab. 1.). Der Ansatz der Behandlung kann kurativ oder palliativ sein. Für das auf die Mukosa beschränkte Frühkarzinom (T1a) ist die endoskopische Mukosaresektion dem chirurgischen Eingriff im Bezug auf die 5-Jahres-Überlebensrate ebenbürtig und weist eine geringere Morbidität und Mortalität auf (Jung 2005). Bereits ab dem Stadium T1b mit Infiltration der Submukosa kann eine Metastasierung in regionale Lymphknoten auftreten, die proportional zur Infiltrationstiefe zunimmt. Deshalb wird in diesem Stadium die *en-bloc*-Ösophagektomie mit Lymphknotendisektion und Rekonstruktion durch Magenhochzug für Ösophaguskarzinome im Bereich des mittleren und unteren Ösophagus als kurative Maßnahme empfohlen. Gleiches gilt für T3- und T4-Karzinome, wobei ab dem Stadium IIb nach Möglichkeit eine Kombination mit einer neoadjuvanten Radiochemotherapie empfohlen wird (Wolf *et al.* 2011). Die Kombination aus neoadjuvanter Radiochemotherapie mit chirurgischer Intervention hat sich gegenüber der alleinigen chirurgischen Behandlung als überlegen im Bezug auf die Gesamtmortalität herausgestellt, wie in einer Metaanalyse mehrerer kontrolliert randomisierter Studien gezeigt werden konnte (HR 0,8; CI 0,63-0,93; Sjoquist *et al.* 2011). Zudem erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit einer R0-Resektion nach neoadjuvanter Behandlung signifikant (HR 1,15; CI 1,00–1,32, Kranzfelder *et al.* 2011). Hinsichtlich der Chemotherapeutika sind 5-Fluoruracil/Cisplatin die am häufigsten zur Anwendung kommende Kombinationstherapie (Courrech Staal *et al.* 2010). Bei proximal gelegenen Karzinomen stellt die Radiochemotherapie die definitive Behandlung der Wahl dar (Allum *et al.* 2011), da aufgrund der anatomischen Nähe zum Kehlkopf und zur Trachea häufig eine Laryngektomie zum Erreichen einer lokalen Tumorfreiheit erwogen werden muss (Siewert *et al.* 2005). Im Falle multimorbider Patienten mit nicht vertretbarem Operationsrisiko ist die definitive Radiochemotherapie zur Behandlung der lokal fortgeschrittenen Tumorstadien hinsichtlich des Gesamtüberlebens der chirurgischen Behandlung ebenbürtig und stellt die therapeutische Methode der Wahl dar (Pöttgen *et al.* 2011). Der Nachweis von Fernmetastasen (Stadium IV), ein nichtresektabler Tumor sowie ein Tumorrezidiv bedingen hingegen eine palliative Situation. Hier umfassen die Bestrahlung bzw. die Radiochemotherapie sowie symptomkontrollierende Verfahren die

Behandlungsoptionen. Bei Patienten mit gutem „performance status“ und fehlenden Komorbiditäten wird eine palliative Radiochemotherapie angeboten. Wong *et al.* (2007) konnten in einer Fallkontrollstudie aus Hongkong beispielsweise bei 36 Patienten mit inoperablem PEK des Ösophagus eine signifikante Verbesserung des medianen Überlebens nach Radiochemotherapie beobachten (10,8 Monate *versus* 4,0 Monate bei alleiniger Stentimplantation). Bezüglich der Dysphagie war im Verlauf kein Unterschied zwischen Interventions- und Kontrollgruppe feststellbar. Ikeda *et al.* (2011) sahen ein ähnliches Resultat in einer retrospektiven Analyse einer Kohortenstudie mit 40 PEK des Ösophagus im UICC Stadium IV aus Japan. Nach Radiochemotherapie betrug das mediane Überleben 10,3 Monate, weiterhin war in 75% der Patienten die Regredienz einer bestehenden Dysphagie zu verzeichnen. 20 Patienten bedurften initial einer Nahrungssupplementation, diese konnte in 17 Fällen nach Besserung der Dysphagie vorübergehend eingestellt werden.

Die Behandlung der Dysphagie stellt bei niedrigem „performance status“ und geringer Lebenserwartung sowie begleitenden Komorbiditäten das primäre Behandlungsziel zur Sicherstellung der Nahrungsaufnahme dar. Zur zügigen Symptomkontrolle hat sich die Implantation selbstexpandierender Metallstents etabliert (Hindy *et al.* 2012), die in Patienten mit ausgeprägter Dysphagie bzw. bei kurzer Lebenserwartung und Tumorrezidiv Anwendung finden sollte (Homs *et al.* 2004). Bei günstigerer Prognose kann alternativ eine endoluminale Brachytherapie durchgeführt werden. Neben einer besseren Kontrolle der Dysphagie im Langzeitverlauf zeigt die Brachytherapie eine geringere Assoziation mit Komplikationen im Vergleich zur Stentinsertion, wie u.a. in einer multizentrisch randomisierten Studie aus den Niederlanden beobachtet werden konnte (Homs *et al.* 2004). Auch die Kombination beider Einzelverfahren hat sich in Studien als sicher erwiesen (Amdal *et al.* 2013; Bergquist *et al.* 2012). Als lokalablativ Verfahren zur Reduktion der Tumormasse kommen weiterhin eine endoluminale Laserbehandlung, photodynamische Therapie sowie Argonplasmakoagulation zur Anwendung. Nachteil dieser Verfahren ist die Notwendigkeit einer wiederholten Intervention (Javle *et al.* 2006). Eine mögliche Komplikation des Ösophaguskarzinoms, die als Folge einer Radiochemotherapie entstehen kann, ist die Entstehung von tracheoösophagealen Fisteln. Die Behandlungsmethode der Wahl für tracheoösophageale Fisteln sind hingegen beschichtete selbstexpandierende Stents.

Beispielsweise konnten Raijman *et al.* (1998) in einer amerikanischen Kohortenstudie bei 13 von 13 Patienten mit PEK des Ösophagus einen sicheren Verschluss der tracheoösophagealen Fistel durch Implantation eines beschichteten Metallstents erreichen. Problematisch ist hingegen die Stentimplantation bei PEK des Ösophagus, die in unmittelbarer Nähe des oberen Ösophagussphinkters lokalisiert sind, da betroffene Patienten diese meist schlecht tolerieren. Grilo *et al.* (2012) zeigten in einer portugiesischen Kohortenstudie, dass hier die Anlage einer perkutanen endoskopischen Gastrostomie eine Alternative zur Gewährleistung der Ernährung sein kann. So gelang eine sichere Anlage in 17/17 Fällen. 10 von 10 Patienten, die im mehrmonatigen Langzeitverlauf einer Reevaluation des Ernährungszustandes zugeführt werden konnten, zeigten u.a. einen stabilen „body-mass-index“ sowie ein stabiles Serumalbumin.

2.1.6. Prognose

Da das Ösophaguskarzinom lange asymptomatisch bleibt, liegt zum Zeitpunkt der Diagnose bei rund dreiviertel aller Patienten bereits ein UICC-Stadium III oder IV vor, wohingegen der Anteil der Frühkarzinome im Stadium I 10% beträgt (Bareiß *et al.* 2002). Das Vorliegen von Komorbiditäten in Patienten mit PEK des Ösophagus kann die Prognose von vornherein zusätzlich einschränken. Weiterhin sind häufig Malnutrition und eine mangelnde „compliance“ anzutreffen (Matuschek *et al.* 2011). Nach Abschluss des initialen „staging“ präsentiert sich darüber hinaus nur ein Drittel aller Patienten als chirurgisch resektabel (Matuschek *et al.* 2011). Allein „high-grade“ intraepitheliale Neoplasien und Frühkarzinome, die auf die Mukosa beschränkt bleiben (T1a), haben eine gute Prognose, deren 5-Jahres-Überlebensrate sich laut Jung (2005) nicht wesentlich von der Normalbevölkerung unterscheidet. Nach vollständiger chirurgischer Entfernung beträgt diese für das gesamte Stadium I hingegen nur 50-80%, in den darauf folgenden Stadien IIa und IIb jeweils 30-40% bzw. 10-30% und im Stadium III nur noch 10-15%. Beim Auftreten von Fernmetastasen (Stadium IV) überleben nur noch 1-5% der Patienten die nächsten fünf Jahre. Erfolgt eine alleinige chirurgische Behandlung, beträgt das mediane Überleben insgesamt betrachtet 13-19 Monate mit 2-Jahres und 5-Jahresüberlebensraten von jeweils 35-42% und 15-24% (Enzinger *et al.* 2003). Metaanalysen zu Studien mit neoadjuvanten Protokollen haben gezeigt, dass eine Prognoseverbesserung durch eine neoadjuvante Radiochemotherapie

herbeigeführt werden kann (Sjoquist *et al.* 2011, Kranzfelder *et al.* 2011). Als Einzelarbeit konnten Lv *et al.* (2010) im Langzeitverlauf ihrer prospektiv randomisierten Studie aus China in ihrem Patientenkollektiv aus 238 PEK des Ösophagus, bestehend aus Stadium II und III, eine Steigerung der 5-Jahres-Überlebensrate durch neoadjuvante Radiochemotherapie mit nachfolgender chirurgischer Behandlung auf 43% im Vergleich zu 33% bei alleiniger Chirurgie aufzeigen. Mit einem medianen Überleben von deutlich weniger als einem Jahr ist die Prognose nichtresektabler Karzinome weiterhin sehr schlecht (Pultrum *et al.* 2006). Auch nach Anwendung verschiedenster Chemotherapeutika als „single agent“ oder in Kombination ist im medianen Überleben eine nur geringfügige Verbesserung festzustellen, die jedoch weiterhin unter einem Jahr liegt (Grünberger *et al.* 2007). Allein die kombinierte Radiochemotherapie bei inoperablen Befunden kann bei gutem Ansprechen des Tumors eine Steigerung im 5-Jahres-Überleben auf bis zu 15% erreichen und gegebenenfalls eine chirurgische Resektion ermöglichen, obwohl das mediane Überleben auch hier weiterhin maximal ein Jahr beträgt (Wong *et al.* 2007).

2.2. Der Arachidonsäurestoffwechselweg

Die Arachidonsäure ist eine mehrfach ungesättigte Fettsäure. Sie repräsentiert die Ausgangssubstanz für die Stoffklasse der Eicosanoide, biologisch aktive Lipide. Diese vermitteln wesentliche Funktionen im Entzündungsgeschehen und der zellulären Homöostase (Martel-Pelletier *et al.* 2003). Eine Aufnahme der Arachidonsäure wird besonders durch den Verzehr von tierischen Produkten gewährleistet. Pflanzliche Lebensmittel enthalten hingegen Vorstufen, die auch zur Synthese herangezogen werden können (German *et al.* 1996). Eine Speicherung erfolgt in den Phospholipiden der Zellmembran, wo insbesondere die zytosolische Phospholipase A₂ eine Freisetzung mediiert. Deren Aktivität wird durch verschiedene Rezeptoren und das zelluläre Einwirken von Stressfaktoren reguliert (Kramer *et al.* 1997). Bei Aktivierung erfolgt die Metabolisierung der Arachidonsäure durch Lipoxygenasen (5-LOX, 12-LOX, 15-LOX) oder Cyclooxygenasen (COX-1, COX-2) (Martel-Pelletier *et al.* 2003). Ein Überblick zum Arachidonsäure- und Lipoxygenasereaktionsweg wird in Abbildung 1 gegeben. Das Schlüsselenzym in der Synthese der Leukotriene, einer Subklasse der Eicosanoide, ist die 5-Lipoxygenase (5-LOX), deren Expression in relevanter Menge auf Leukozyten beschränkt ist (Radmark *et al.* 2007). Bei Inaktivität ist die 5-LOX im Plasma lokalisiert, nach Aktivierung erfolgt die Translokation an die äußere Kernmembran, wo durch Oxygenierung und Dehydrierung die Biosynthese des Leukotrien LTA₄ aus Arachidonsäure stattfindet (Peters-Golden *et al.* 2003; Radmark *et al.* 2007). Essentiell hierfür ist die Präsenz des Kofaktors „5-LOX activating protein“ (FLAP) (Dixon *et al.* 1990). Die ubiquitär verbreitete LTA₄-Hydrolase ist zytosolisch lokalisiert und konvertiert LTA₄ zum Leukotrien LTB₄. Hingegen ist die LTC₄-Synthase ein kernmembranäres Enzym (hauptsächlich exprimiert in eosinophilen und basophilen Granulozyten, Mastzellen und Alveolarmakrophagen), das aus LTA₄ durch Konjugation mit Gluthation, das Cysteinyl-Leukotrien LTC₄ synthetisiert. (Singh *et al.* 2010; Peters-Golden *et al.* 2007). Die Leukotriene vermitteln und steuern Funktionen der Entzündungsreaktion und Immunabwehr (Nakamura *et al.* 2011). Klinisch relevant ist dies für chronisch entzündliche Erkrankungen von denen u.a. das Asthma bronchiale, die allergische Rhinitis, Atherosklerose und Rheumatoide Arthritis besonders gut hinsichtlich der Beteiligung des 5-LOX/Leukotriensignalweges charakterisiert sind (Nakamura *et al.* 2011; Singh *et al.* 2010; Peters-Golden *et al.* 2007). Eine Bedeutung

wird insbesondere auch für die Kanzerogenese gesehen. So ist die Expression der 5-LOX u.a. im Kolon-, Bronchial- und Prostatakarzinom beschrieben worden (Soumaora *et al.* 2006; Gupta *et al.* 2001; Avis *et al.* 1996). Zudem untersuchten Wasilewicz *et al.* (2010) Kolonadenome immunhistochemisch auf eine 5-LOX Expression. Für das villöse Adenom, das das höchste Risiko hinsichtlich der Entstehung eines invasiven Karzinoms birgt, war in 100% der Biopsien eine 5-LOX Expression nachweisbar. Tubulo-villöse und tubuläre Adenome, die ein abnehmendes Entartungsrisiko tragen, zeigten eine sich reduzierende Expression (79,6% bzw. 49,1%) auf. Pankreatische intraepitheliale neoplastische Läsionen stellen hingegen die Präkazerosen des duktales Pankreaskarzinoms dar. Hennig *et al.* (2002) wiesen immunhistochemisch eine 5-Lipoxygenaseexpression in 11/11 Pankreasbiopsaten für mehr als 90% dieser Vorläuferläsionen nach. Im unauffälligen duktales Pankreasepithel war demgegenüber keine Expression zu sehen. Die funktionelle Relevanz einer 5-LOX Expression konnten verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien belegen. So war durch pharmakologische Inhibition des 5-LOX Proteins in unterschiedlichen Tumorzellreihen eine Inhibition der Zellproliferation zu beobachten (Melstrom *et al.* 2008; Tong *et al.* 2002/I; Avis *et al.* 1996). Auch eine autokrine Stimulation des Tumorzellüberlebens durch den 5-LOX Reaktionsweg ist in der Diskussion, da wiederholt die Induktion einer Apoptose in diversen Karzinomzellenlinien durch selektive 5-LOX Blockade beobachtet wurde (Ihara *et al.* 2007; Tong *et al.* 2002; Ghosh *et al.* 1998). *In vitro* war zudem durch Applikation von 5-LOX Syntheseprodukten ein proliferationsfördernder Effekt auf Karzinomzellen nachzuweisen (Ihara *et al.* 2007; Avis *et al.* 1996). Die Wirksamkeit einer 5-LOX Hemmung *in vivo* wurde u.a. durch Melstrom *et al.* (2008) in einem Mausmodell beschrieben. Tiere, denen Kolonkarzinomzellen injiziert wurden, wiesen bei nachfolgender Blockierung der 5-Lipoxygenase durch Zeuliton ein geringeres Tumorwachstum auf als die unbehandelte Kontrolle. In einer weiteren Studie aus China verabreichten Li *et al.* (2005) hingegen Hamstern topisch das Induktionskarzinogen 7,12-Dimethylbenzathracene (DMBA) auf die Mundschleimhaut. 76,9 % der Tiere entwickelten hiernach Plattenepithelkarzinome im behandelten Bereich. Wurde nach initialer Behandlung mit DMBA zusätzlich lokal Zeuliton als 5-LOX Inhibitor appliziert, so war eine dosisabhängige Reduktion der Tumorinzidenz zu beobachten (45,8% bei 3% Zeuliton; 32,1% bei 6%). Aktuell wird auch für die Genese der beiden

histologischen Formen des Ösophaguskarzinoms eine Beteiligung des Lipoxygenasemetabolismus diskutiert. Konnten durch Chen *et al.* (2004) nicht nur eine 5-LOX Expression in 28 von 56 humanen Adenokarzinomen des Ösophagus immunhistochemisch nachgewiesen werden, so war in der gleichen Studie weiterhin in einem gastroösophagealen Refluxmodell der Maus nach 5-Lipoxygenaseinhibition durch Zeuliton eine Reduktion der Inzidenzrate von Adenokarzinomen von 68,8 % auf 31,3 % zu beobachten. Ein ähnliches Resultat zeigte die Blockierung der LTA₄-Hydrolase durch Bestatin im gleichen Tiermodell. Neben einer Verringerung der Inzidenzrate am ösophagealen Adenokarzinom (57,1% auf 26,1 %) war auch eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens feststellbar (0,34 cm³ versus 0,16 cm³; Chen *et al.* 2003). Zhi *et al.* (2003) konnten hingegen für das PEK des Ösophagus eine Überexpression der 5-Lipoxygenase beobachten. Hierbei war eine signifikante Erhöhung der 5-LOX Genexpression sowie immunhistochemisch in 20 von 26 Karzinomen eine gesteigerte Proteinexpression gegenüber dem unveränderten ösophagealen Plattenepithel zu sehen. Auch *in vitro* Studien am PEK des Ösophagus standen im Einklang zu den Ergebnissen an anderen Karzinomen. So zeigten Zelllinien des PEK des Ösophagus nach Exposition mit verschiedenen 5-LOX Hemmern eine Verringerung des Zellüberlebens durch Apoptoseinduktion auf. Die Verabreichung des Leukotrien LTB₄ führte hingegen zu einer Reversibilität des Effektes (Hoque *et al.* 2005). In Übereinstimmung zu den Ergebnissen anderer *in vivo* Studien stehen auch die Ergebnisse von Shi *et al.* (2011) aus China. In ihrem „xenograft“ Mausmodell wurden Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus in die Flanke der Tiere injiziert. Durch Gabe des 5-LOX Inhibitors Zeuliton war ein vermindertes Tumorwachstum zu beobachten.

Abgesehen davon kann die Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase-1 und -2 zu weiteren potenten Eicosanoiden, den Prostaglandinen E₂, -D₂, -F_{2α}, -I₂ und dem Thromboxan A₂, metabolisiert werden. Diese vermitteln ihr Wirkung im Zusammenspiel mit den Rezeptoren EP₁₋₄, DP, FP, IP und TP (Matsuoka *et al.* 2007). Eine genauere Erläuterung der biologischen Funktion der Prostanoiden, insbesondere deren Bedeutung für die Karzinogenese, geht über den Umfang dieser Arbeit hinaus. In der Literatur gibt es hierzu zahlreiche themenbezogene „reviews“ (Ghosh *et al.* 2010; Wang *et al.* 2010; Matsuoka *et al.* 2007).

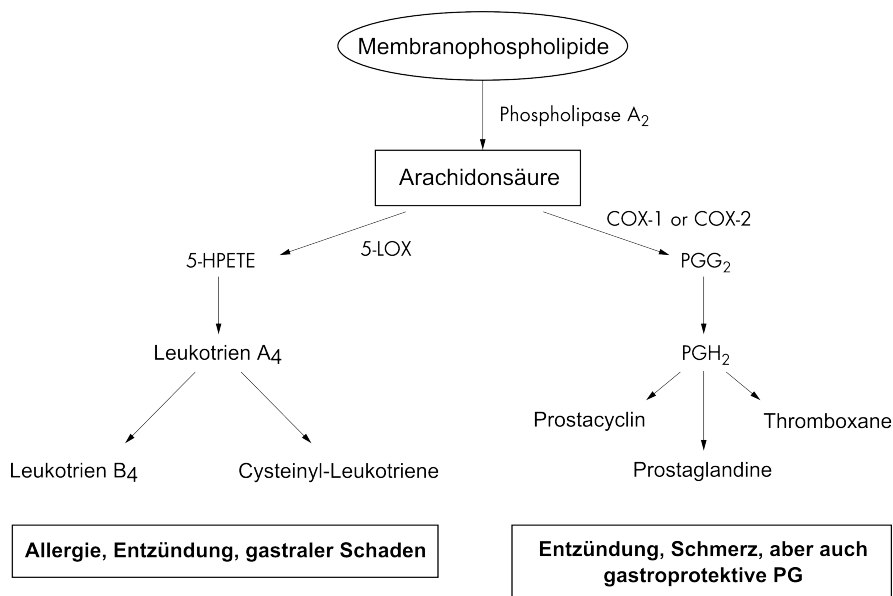


Abbildung 1. Der Arachidonsäurestoffwechsel im Hinblick auf den Lipoxygenase- und Cyclooxygenasemetabolismus. Zur Darstellung kommen die Enzyme und Reaktionsprodukte des 5-Lipoxygenase (5-LOX) sowie Cyclooxygenase-1/-2 (COX-1/-2) Stoffwechselweges (Abbildung entnommen aus Martell-Pelletier *et al.* 2003). PG = Prostaglandine; PGG₂ = Prostaglandin G₂; PGH₂ = Prostaglandin H₂; HPETE = Hydroxyperoxyeicosatetraensäure.

2.3. Die Leukotriene

Als Leukotriene werden die terminalen Reaktionsprodukte des 5-LOX Stoffwechselweges bezeichnet, die das Leukotrien B₄ (LTB₄) und die Cysteinyl-Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄ umfassen. Intrazellulär wird LTB₄ durch die katalytische Aktivität der LTA₄-Hydrolase aus LTA₄ synthetisiert, durch die LTC₄ Synthese ist auch eine Konjugation mit Gluthation zum LTC₄ möglich. LTB₄ und LTC₄ werden anschließend nach extrazellulär transportiert, es erfolgt die Umwandlung von LTC₄ zu LTD₄ und LTE₄ durch sequenzielle Spaltung von Peptidbindungen (Peters-Golden *et al.* 2007). Synthetisiert wird LTB₄ hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Dendritischen Zellen. Cysteinyl-Leukotriene werden vorrangig in eosinophilen und basophilen Granulozyten, sowie Mastzellen gebildet (Peters-Golden *et al.* 2007). Darüber hinaus können Zellen, die nur über die LTA₄-Hydrolase und LTC₄-Synthase verfügen, die Vorstufe LTA₄ aus Leukozyten aufnehmen und in die finalen Metabolite umwandeln. Dieser Vorgang wird als transzelluläre Biosynthese bezeichnet (Folco *et al.* 2006). Extrazellulär erfolgt die Bindung von LTB₄ an die Rezeptoren BLT-1 und BLT-2, die Cysteinyl-Leukotriene binden hingegen an die Rezeptoren CysLT-1 und CysLT-2 (Peters-Golden *et al.* 2007).

2.4. Charakterisierung der Leukotrienrezeptoren

2.4.1. Leukotrien-B₄ Rezeptoren

BLT-1 und BLT-2 gehören zur Familie der heptahelikalen Transmembranproteine (Yokomizo *et al.* 1997, 2000). Beide Rezeptoren transduzieren Signale über heterotrimere G-Proteine. Diese bewirken eine intrazelluläre Calciumfreisetzung, Aktivierung der Phospholipase C und Inhibition der Adenylatzyklase. BLT-1 bindet LTB₄ mit hoher Affinität, BLT-2 hingegen mit niedriger. Der BLT-1 Rezeptor wird hauptsächlich in Leukozyten exprimiert, BLT-2 ist hingegen ubiquitär im Organismus vorkommend (Yokomizo *et al.* 1997, 2000). Nach Aktivierung kann BLT-1 in Leukozyten eine Adhäsion, Aktivierung, Rekrutierung, Migration, Leukotrien- und Zytokinproduktion auslösen. Die Funktion des BLT-2 Rezeptors ist demgegenüber weitestgehend unklar (Nakamura *et al.* 2011).

Die Rezeptoren BLT-1 und BLT-2 sind hinsichtlich einer Expression und Funktionalität bisher in verschiedenen Karzinomen charakterisiert worden. Für BLT-1 war u.a. im Kolon-, Magen- und Pankreaskarzinom eine Expression nachweisbar (Ihara *et al.* 2007; Venerito *et al.* 2011; Tong *et al.* 2002). Funktionell wird eine Bedeutung des BLT-1 Rezeptors für das Tumorüberleben sowie die Proliferation gesehen. So war beispielsweise durch LTB₄ vermittelte BLT-1 Stimulation eine Steigerung der Proliferationsrate von Pankreas- und Kolonkarzinomzellen *in vitro* zu beobachten (Tong *et al.* 2002; Ihara *et al.* 2007). Die selektive Blockade des BLT-1 Rezeptors mittels LY293111 (Tong *et al.* 2002) bzw. Rezeptordepletion durch *small-interfering* RNA (siRNA; Ihara *et al.* 2007) führte hingegen zur Induktion von Apoptose. Neben einer Auswirkung auf das Tumorstadium wird auch eine Rolle der BLT-1 Signalkaskade für die Entwicklung einer adäquaten Immunreaktion gegenüber malignen Tumoren diskutiert. Eine Bedeutung kann dies für die Entwicklung von Tumorstadien haben. So wiesen in einem Tiermodell BLT-1 „knock-out“ Mäuse bzw. der entsprechende „wild-type“ nach initialer Stimulation mit „granulocyte macrophage colony stimulating factor“ sezernierenden transgenen Leukämiezellen jeweils eine Abstoßungsreaktion gegenüber letzteren auf. Nach erneuter Exposition mit nativen Leukämiezellen überlebte die „knock-out“ Subpopulation signifikant länger bei verstärkter adaptiver Immunantwort gegenüber dem Malignom (Yokata *et al.* 2012).

Der BLT-2 Rezeptor konnte hingegen im Magen-, Pankreas, Ovarial- und Harnblasenkarzinom nachgewiesen werden (Venerito *et al.* 2011; Hennig *et al.* 2008; Rocconi *et al.* 2008; Kim *et al.* 2010). Auch für BLT-2 sind verschiedene Aspekte der Karzinogenese untersucht worden. Ähnlich dem BLT-1 Rezeptor ist für BLT-2 eine fördernde Wirkung auf Proliferation und Tumorzellüberleben beschrieben (Hennig *et al.* 2008; Seo *et al.* 2011). Diskutiert wird darüber hinaus eine Bedeutung des BLT-2 Rezeptors für die Invasion und Metastasierung von Karzinomen. Kim *et al.* (2010) untersuchten in einer Zellstudie Fibroblasten, die durch eine konstitutionelle Aktivierung des Onkogens Ras u.a. ein erhöhtes Metastasierungspotential aufwiesen. BLT-2 war hierbei als Bestandteil der Ras-Signalkaskade identifizierbar. Eine Behandlung mit dem BLT-2 selektiven Antagonisten LY255283 bewirkte im Zellversuch sowie im Mausmodell eine reduzierte Metastasierung dieser transformierten Fibroblasten. Seo *et al.* (2012) fanden hingegen in einer weiteren Studie das BLT-2 Expressionsniveau verschiedener Ovarialkarzinomzelllinien positiv mit der Invasivität korreliert. Die Überexpression von BLT-2 nach Gentransfer führte zu einer Steigerung des Invasionspotentials des Ovarialkarzinoms im Zellversuch, eine Rezeptordepletion mittels siRNA hingegen zu einer Abnahme. Daneben wird für BLT-2 eine Bedeutung bei der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika diskutiert. Kim *et al.* (2013) führten hierzu eine Studie an paclitaxelresistenten Mammakarzinomzellen durch, deren Unempfindlichkeit gegenüber Zytostatika durch das „multidrug resistance gene 1“ (MDR 1) vermittelt wird. BLT-2 zeigte sich in der resistenten Zellpopulation im Vergleich zur sensitiven Form überexprimiert. Eine BLT-2 Blockade (selektiver Antagonist LY255283 bzw. siRNA) konnte diese Resistenz *in vitro* und im Tierversuch überwinden.

Die Fähigkeit zur Induktion der Angiogenese ist hingegen ein weiteres essentielles Charakteristikum maligner Tumoren. Diese wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren reguliert, worunter der proangiogene Faktor „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) der am besten charakterisierte ist. In einer Studie an humanen Endothelzellen konnte BLT-2 als Teil der VEGF-Signalkaskade identifiziert werden. Nach selektiver Rezeptoraktivierung im Zellversuch und Mausmodell konnte ein proangiogener Effekt beobachtet werden. Simultan injiziertes LY255283 (BLT-2 Antagonist) bewirkte hingegen eine Inhibition der Gefäßneubildung (Kim *et al.* 2009).

2.4.2. Cysteinyl-Leukotrienrezeptoren

CysLT-1 und CysLT-2 sind ebenfalls Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Die Signaltransduktion erfolgt über heterotrimere G-Proteine, die die Adenylatzyklase inhibieren und eine Zunahme des intrazellulären Calciums bewirken (Nakamura *et al.* 2011; Heise *et al.* 2000). Eine hohe Expression des CysLT-1 und CysLT-2 Rezeptors ist in Leukozyten und der Milz nachgewiesen. Hauptligand für CysLT-1 ist LTD₄. Für CysLT-2 stellen hingegen LTC₄ und LTD₄ äquipotente Agonisten dar (Lynch *et al.* 1999; Heise *et al.* 2000). Der CysLT-1 Rezeptor moduliert Funktionen der Entzündungsreaktion (Migration, Chemotaxis und Zytokinfreisetzung von Leukozyten; Steigerung der vaskulären Permeabilität). Weiterhin wurde für CysLT-1 im Respirationstrakt ein bronchokonstriktorischer Effekt sowie die Mediation einer vermehrten Schleimsekretion beschrieben. (Nakamura *et al.* 2011; Heise *et al.* 2000). Für CysLT-2 konnte ebenfalls eine immunmodulatorische Wirkung (Zytokinproduktion, Erhöhung der vaskulären Permeabilität) aufgezeigt werden. Daneben wird eine Förderung der entzündungsbedingten Gewebefibrose diskutiert (Peters-Golden *et al.* 2007). Eine CysLT-1 Expression ist bisher u.a. für das Magen-, Kolon- sowie verschiedene urologische Karzinome beschrieben worden, wobei seitens des Karzinoms eine Expressionssteigerung gegenüber dem nichtmalignen Epithel beobachtet werden konnte (Venerito *et al.* 2011; Öhd *et al.* 2003; Matsuyama *et al.* 2010). Öhd *et al.* (2003) fanden dabei diese Überexpression von CysLT-1 in Adenokarzinomen des Kolons direkt mit der Überexpression weiterer onkogener Proteine (COX-2, 5-LOX, Bcl-xl) assoziiert. Eine förderliche Wirkung auf Zellwachstum und –überleben konnte hingegen durch *in vitro* und *in vivo* Studien auch für den CysLT-1 Rezeptor aufgezeigt werden. Beispielsweise wies ein CysLT-1 exprimierendes Kolonkarzinom im Zellversuch nach Stimulation mit LTD₄ eine Steigerung der Proliferationsrate um 30% auf (Nielsen *et al.* 2005). Demgegenüber konnte durch rezeptorselektive CysLT-1 Blockade an verschiedenen urogenitalen Tumorzelllinien ebenfalls eine Wachstumsinhibition durch Auslösung von Apoptose beobachten werden (Matsuyama *et al.* 2010). Savari *et al.* (2013) untersuchten hingegen den CysLT-1 Rezeptor in einem Mausmodell *in vivo*. Dabei konnte gezeigt werden, dass Tiere, denen CysLT-1 exprimierende Kolonkarzinomzellen injiziert wurden bei zusätzlicher Gabe des selektiven Rezeptorantagonisten Montelukast eine geringere Tumorlast als eine unbehandelte

Kontrolle entwickelten. Daneben wird außerdem ein begünstigender Effekt einer CysLT-1 Rezeptorstimulation auf die Tumorzellmigration diskutiert. So konnten Massoumi *et al.* (2003) nach CysLT-1 Aktivierung die Induktion migratorischer Prozesse in Kolonkarzinomzellen *in vitro* beobachten. ZM198,615 ein CysLT-1 selektiver Antagonist, unterband die Zellmigration hingegen.

Der CysLT-2 Rezeptor wurde hingegen u.a. im Magen-, Kolon-, und Mammakarzinom nachgewiesen (Venerito *et al.* 2011; Magnusson *et al.* 2011; Magnusson *et al.* 2010). Im Gegensatz zu den Rezeptoren BLT-1/-2 und CysLT-1 ist nach bisherigen Ergebnissen der CysLT-2 Rezeptor mit einer antineoplastischen Wirkung assoziiert. Diskutiert werden eine Beteiligung des CysLT-2 Rezeptors an Prozessen der Zelldifferenzierung sowie die Inhibition der Zellmigration. So konnten Magnusson *et al.* (2011) im Mammakarzinom immunhistochemisch eine Korrelation zwischen CysLT-2 Expression und dem Differenzierungsgrad des Malignoms beobachten. Eine zunehmende Entdifferenzierung war mit einer Abnahme der CysLT-2 Expression im Karzinom assoziiert. Direkte Hinweise erbrachten auch *in vitro* Studien. Beispielsweise wurden Kolonkarzinomzellen der Zelllinie Caco-2, die eine endogene CysLT-2 Expression zeigen, mit LTC₄ stimuliert. Eine Zunahme intestinaler Bürstensaumproteine, die allgemein als Differenzierungsmarker intestinaler Epithelzellen gelten, war nachfolgend zu beobachten (Magnusson *et al.* 2007). Bengtsson *et al.* (2013) führten hingegen in Caco-2 Zellen eine Differenzierung mittels „all-trans retinoic acid“ herbei, die ebenfalls durch eine Aktivitätszunahme des Bürstensaumproteins alkalische Phosphatase messbar war. Wurde AP-100984, ein selektiver CysLT-2 Inhibitor, zuvor appliziert, war eine Aktivitätsreduktion der alkalischen Phosphatase zu verzeichnen. Weiterhin konnte nach CysLT-2 Rezeptorstimulation eine Inhibition der Migration maligner Zellen beobachtet werden. Hierbei wies die untersuchte Mammakarzinomzelllinie MDA-MB231 keine endogene Expression von CysLT-2 auf. Eine Stimulation mit LTC₄ ließ keine Auswirkung auf das Migrationspotential *in vitro* erkennen. Nach Transfektion von CysLT-2 war hingegen eine Reduktion der Migrationsrate zu verzeichnen, die durch LTC₄ verstärkt wurde. AP-100984, ein CysLT-2 selektiver Antagonist, inhibierte diese Wirkung wiederum (Magnusson *et al.* 2011).

2.5. Ziel der Studie

Das Ziel der Studie ist die Analyse des Expressionsstatus der Leukotrienrezeptoren BLT-1, BLT-2, CysLT-1 und CysLT-2 im PEK des Ösophagus. Primär soll eine Gegenüberstellung zum Stratum basale der ösophagealen Schleimhaut, dem Ursprungsort des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus im betroffenen Patienten und einer Kontrolle erfolgen. Neunzehn Erstdiagnosen mit einem PEK des Ösophagus wurden hierzu in die folgende Studie eingeschlossen. Zusätzlich wurden weitere neun Patienten in eine Kontrollgruppe rekrutiert. Es erfolgte die Entnahme von Biopsien mit anschließender Untersuchung durch Immunhistochemie (IHC) und „realtime“-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).

3. Patienten und Methoden

Die folgende Studie wurde von Prof. Dr. med. Dr. h.c. Peter Malfertheiner, Dr. med. Marino Venerito und Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Wex erdacht.

3.1. Studiendesign

Hierbei handelt es sich um eine „case-control“ Studie. Die eingeschlossenen Patienten waren entweder stationär in Behandlung oder ambulant an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Magdeburg vorstellig. Alle Patienten mit der Erstdiagnose eines Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus wurden nach Abgabe einer schriftlichen Einverständniserklärung prospektiv zwischen März 2009 und Januar 2010 eingeschlossen (14 männlich, 5 weiblich, Alter 62 ± 11 Jahre). Es war keiner der Patienten zu jener Zeit Teilnehmer an einer weiteren Studie. Ausschlusskriterium war eine bereits begonnene tumorspezifische Therapie des neu-diagnostizierten Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus. Als Kontrollgruppe wurden retrospektiv Patienten erfasst, die aufgrund dyspeptischer Beschwerden eine ÖGD erhalten hatten. Es handelte sich um Teilnehmer einer Studie (Mönkemüller *et al.* 2009) zur Charakterisierung der nichterosiven Refluxerkrankung (5 männlich, 4 weiblich, Alter 58 ± 15 Jahre). Diese wurden nach Geschlecht und Alter (± 4 Jahre) den Patienten der Studiengruppe zugeordnet. Die Einschlusskriterien waren wie folgt: Keine klinisch typischen Refluxbeschwerden bzw. endoskopischen Zeichen einer Refluxösophagitis, keine Protonenpumpenhemmereinnahme. Die Studie wurde von der örtlichen Ethikkommission bewilligt (Studie 34/08; Votum vom 16.06.2008).

3.2. Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD)

Jeder Patient erhielt eine ÖGD. Alle Endoskopien wurden von erfahrenen Endoskopikern durchgeführt. Diese erfolgten in der Endoskopieabteilung der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg. Bei den Patienten mit Plattenepithelkarzinom fand während der ÖGD die Entnahme von insgesamt acht Gewebeproben statt. Es wurden vier Biopsien aus dem Tumor entnommen, weitere vier aus der tumorfreien Schleimhaut oberhalb des Lokalbefundes. Aus jeder Lokalisation wurden jeweils zwei Biopsien für die Immunhistochemie und die RT-PCR verwendet. Es ergaben sich die Gruppen

Plattenepithelkarzinom (PEK) und tumorfreie Schleimhaut (TF). Die Lage des Tumors in der Speiseröhre wurde als Abstand von der Zahnreihe in cm erfasst. In der Kontrollgruppe wurden zwei Biopsien aus der optisch unauffälligen ösophagealen Schleimhaut (2cm oberhalb der Z-Linie, zwischen der 12 und 3 Uhr Position) für die Immunhistochemie und RT-PCR entnommen. Es entstand die Gruppe Kontrolle (K).

3.3. Klinische Datenerhebung

Die prospektiv eingeschlossenen Patienten wurden anhand eines Fragebogens zu demographischen Aspekten, Raucherstatus und Alkoholkonsum befragt. Das Rauchverhalten wurde wie folgt erfasst: Raucher/ehemaliger Raucher, Angabe der Packungsjahre/Zeitraum seit Beendigung des Nikotinkonsums, Nichtraucher. Der Alkoholkonsum wurde in Abstinenzler, niedriger Alkoholkonsum ($\leq 20\text{g/Tag}$ für Männer, $\leq 10\text{g/Tag}$ für Frauen), erhöhter Alkoholkonsum ($> 20\text{g/Tag}$ für Männer, $> 10\text{g/Tag}$ für Frauen) kategorisiert. Weiterhin wurde die Art der alkoholischen Getränke in Wein, Bier, Spirituosen unterschieden. Bei Abstinenzlern wurde der Zeitpunkt der letzten Alkoholaufnahme erfragt. In der retrospektiv erhobenen Kontrolle wurden bei Verfügbarkeit Rauch- und Alkoholkonsumgewohnheiten eruiert.

3.4. Extraktion der RNA

Alle Biopsien wurden aus dem Gebiet des Primärtumors, sowie aus der makroskopisch unauffälligen Speiseröhrenschleimhaut oberhalb der tumorösen Läsion entnommen. Im Anschluss wurden diese sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C verwahrt. Alle Schritte der Extraktion erfolgten im Eisbad. Die Zentrifugationsschritte fanden bei 4°C und bei 10.000xg statt. Zur Extraktion wurden die Proben nach Zugabe von $0,5\text{ml}$ TRIZOL-reagent™ (Life Technologies, USA) mittels *TissueRuptor* (Quagen, Hilden, Deutschland) zerkleinert und homogenisiert. Nach Überführung in $1,5\text{ml}$ Eppendorfgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und Zugabe von jeweils $0,2\text{ml}$ Chloroform (Rothipuran, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), wurde der Inhalt für 10 Minuten zentrifugiert. Vom Überstand fanden mindestens $100\mu\text{l}$ und maximal $200\mu\text{l}$ weitere Verwendung. Es wurde ein dem Überstand äquivalentes Volumen Isopropanol zugesetzt und 10 Minuten auf Eis ruhengelassen. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten) wurde der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet

wurde mit 100µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und mittels RNase *Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Verwendung des Herstellerprotokolls gereinigt. Eine Behandlung der Proben mit DNase (Qiagen, Hilden, Deutschland) fand während des Reinigungsprozesses entsprechend des Herstellerprotokolls Anwendung. Im Anschluss erfolgte ein Herauslösen der RNA in 70µl RNase-freiem Wasser. Hiervon wurden 5µl der RNA-Integritätsanalyse mittels Gelelektrophorese in 1% Agarosegel nach vorherigem Zusatz von 1µl Ethidiumbromid (Sigma Aldrich 500µg/ml, Stentheim) zugeführt. Weitere 5µl wurden zur RNA-Konzentrationsbestimmung am UV-Spektroskop Eppendorf BioPhotometer® (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) benutzt. Als Referenz diente RNase-freies Wasser. Alle Extraktionsschritte fanden im Labor der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie unter Anleitung von Marion Holley und Ursula Stolz unter Supervision von Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Wex statt.

3.5. Quantitative RT-PCR Analyse von Blt-1, Blt-2, Cyslt-1 und CysLT-2

Jede RNA-Probe wurde in „complementary DNA“ (cDNA) umgeschrieben. Es entstand eine Gesamtmenge von 250ng cDNA pro 40µl Ansatzvolumen. Hierfür wurde den RNA-Proben ein 250ng cDNA entsprechendes, äquivalentes Volumen entnommen. Dies wurde mit *Aqua dest* auf 25,4µl aufgefüllt und mit dem cDNA-Syntheseansatz auf 40µl Gesamtvolumen ergänzt. Der cDNA-Syntheseansatz (14,6µl) setzte sich aus 1,6µl dNTPs (Fermentas 4x100mM), 2,0µl „Random“ Primer (Roche, *1st Strand cDNA Synthesis Kit*, 2µg/µl), 8µl AMV-Puffer (AMV RT 5x *Reaction Buffer*, Promega), 2µl AMV Reverse Transcriptase (Promega, 10u/µl), 1µl rRNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, 40u/µl) zusammen. Der Gesamtansatz (40µl) wurde bei 42°C für 45 Minuten auf einem Eppendorf Thermomixer (Eppendorf Thermomixer® comfort) zur Synthese belassen. Nach anschließend 5 Minuten bei 95°C erfolgte eine Verwahrung der Ansätze bei -80°C bis zur Amplifikation. Die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) wurde mit dem Qiagen Multiplex PCR *Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Es erfolgte eine Anpassung der Ansätze für Volumina < 50µl. Der Einzelansatz für die qRT-PCR umfasste ein Gesamtvolumen von 30µl. Hiervon waren 13,4µl RNase-freies Wasser, jeweils 0,2µl (50µM) „upstream“(US) und „downstream“(DS) Primer des entsprechenden Rezeptors, die jeweilige cDNA im Volumen von 1,2µl und 15µl SYBR *Green PCR Master Mix* (QuantiTect SYBR *Green PCR-Kit*, Quiagen, Deutschland).

Als Primer US und DS fanden folgende Sequenzen Verwendung (Tab. 2.):

Tabelle 2. Verwendete Primerkonstrukte zur Amplifizierung der jeweiligen Rezeptorentranskripte.
cDNA = „complementary DNA“; US = „upstream“; DS = „downstream“; C = Cytosin; A = Adenosin; T = Thymidin; G = Guanodin.

cDNA Primer	Sequenz 5' nach 3'
β-Aktin US	CATGCCATCCTGCGTCTGGACC
β-Aktin DS	ACATGGTGGTGCCGCCAGACAG
Blt-1 US	TCAGCACCATCAGGGCAGTGAC
Blt-1 DS	CTGACCCTGGGATTGGCATCAG
Blt-2 US	GGGTGTAAAGGGACGTGCACAG
Blt-2 DS	GCTTGTGCTGTTTCCTGGCAAG
Cyslt-1 US	CAATAGTGTCATGGCATGTGGC
Cyslt-1 DS	GCTTGCTTCTGAGAACAAACGC
Cyslt-2 US	AGGATTGAAGCAGGCATTGGC
Cyslt-2 DS	AAAGTGGAGGTCCCAGAATCGG

Die Primer waren intronübergreifend, so dass ausschließlich eine spezifische Amplifikation der cDNA Fragmente erfolgte und genomische Amplifikate ausgeschlossen wurden. Der PCR-Vorgang erfolgte auf einer 96 Lochplatte in einem iCycler von Biorad (Biorad, München). Es wurde folgendes Protokoll verwendet: 92°C^{15min}; 40x (94°C^{30sec}; 55°C^{30sec}; 72°C^{30sec}); 72°C^{5min}. Die Bestimmung der mRNA Menge erfolgte durch Erfassung des Zeitpunktes, an dem eine lineare Zunahme des cDNA-Produktes zu verzeichnen war. Zur Normalisierung des mRNA-Gehaltes wurde β-Aktin als Referenz gewählt. Es erfolgte eine Überprüfung der Amplifikationsprodukte mittels Gelelektrophorese in 1,8% Agarosegel. Alle Extraktionsschritte wurden im Labor der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie unter Anleitung von Simone Phillipsen und Ingrid Bierwirt unter Supervision von Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Wex durchgeführt.

3.6. Immunhistochemischer Nachweis von BLT-1, BLT-2, CysLT-1, CysLT-2

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mittels Avidin-Biotin-Färbemethode durchgeführt. Alle Biopsien (Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet) wurden in 5µm starke Präparate geschnitten und auf Objektträgern platziert. Es erfolgte eine Entparaffinisierung und Dehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Die daraufhin folgende Epitopdemaskierung wurde mittels Pascal *Pressure Chamber* S2800 (Dako, Denmark) unter Verwendung des entsprechenden Herstellerprotokolls (Dako

Education Guide; Pressure Cooker Heating) durchgeführt. Als „retrieval solution“ zur Epitopdemaskierung wurde eine 1mM EDTA-Lösung verwendet, die aus einem 100mM Lösungsansatz (0,5M EDTA, pH=8, Merck, Deutschland) nach Verdünnung mit *Aqua dest* hergestellt wurde. Als Tris-Puffer kam *Ventana Reaction Buffer 1x* (10x, 1:10 Verdünnung mit *Aqua dest*, Ventana Medical Systems, USA) zur Anwendung. Die immunhistochemische Färbung erfolgte auf einem Automaten der Firma NEXES Ventana (Ventana Medical Systems, *Strasbourg, France*). Alle Waschschritte wurden mit dem *Ventana Reaction Buffer* in oben erwähnter Verdünnung durchgeführt. Die Präparate wurden vor Durchführung der spezifischen Immunreaktion zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität entsprechend vorbehandelt. Die Primärinkubation erfolgt bei 37°C für 32 Minuten. Zur Anwendung kamen die unten aufgeführten rezeptorspezifischen Primärantikörper in den jeweiligen Konzentrationen (Tab. 3.). Eine positive Immunreaktion wurde unter Verwendung des *iVIEW™ Detektion Kits* (Ventana, Deutschland) sichtbar gemacht. Es folgte eine Gegenfärbung mit Haematoxylin und anschließende Weiterbehandlung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Zuletzt wurden die Präparate unter Verwendung von Corbit-Balsam (I.Hecht, Kiel-Hassee, Deutschland) eingedeckelt.

Tabelle 3. Charakteristika der zur Immunhistochemie verwendeten Antikörper.
Kat. No = Katalognummer.

	Hersteller	Klonalität/„Host“	Verdünnung	Kat.No
BLT1	Cayman Chemicals	„Polyclonal/Rabbit“	1:100	120114
BLT2	Acris	„Polyclonal/Rabbit“	1:25	SP4368P
CysLT1	GeneTex Inc.	„Polyclonal/Rabbit“	1:100	GTX70519
CysLT2	Lifespan Biosciences	„Polyclonal/Rabbit“	1:100	LS-A2255

Alle Arbeitsschritte wurden von Carola Kügler und Claudia Miethke am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Magdeburg durchgeführt.

3.7. Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Das Färbeverhalten eines histologischen Präparates wurde in einem „Score“-Wert (IRS = „Immunoreactivity Score“) ausgedrückt. Hierzu wurde jeder Schnitt hinsichtlich

Färbeintensität und Anzahl der gefärbten Zellen (Färbeumfang) bewertet. Es erfolgte eine Einteilung der Färbeintensität in die Stufen negativ = 0, schwach = 1, mäßig = 2 und stark = 3. Der Färbeumfang wurde wie folgt kategorisiert: < 10% positive Zellen = 1; < 50% = 2; < 80% = 3; > 80% = 4. Die Multiplikation von Färbeintensität und Färbeumfang ergab den „Immunoreactivity Score“ (IRS). Es konnte eine maximale Punktzahl von 12 erreichen. In der ösophagealen Schleimhaut wurde eine Auswertung entsprechend des anatomischen Aufbaus durchgeführt. Es erfolgte eine Bewertung des Stratum basale, Stratum spinosum und Stratum superficiale. Für jede Schicht wurde ein separater IRS vergeben. Die Auswertung erfolgte entsprechend der Schnittrichtung des histologischen Präparates. In Abbildung 2 ist exemplarisch der Aufbau der ösophagealen Mukosa nach Schnittrichtung des histologischen Präparates zu sehen.

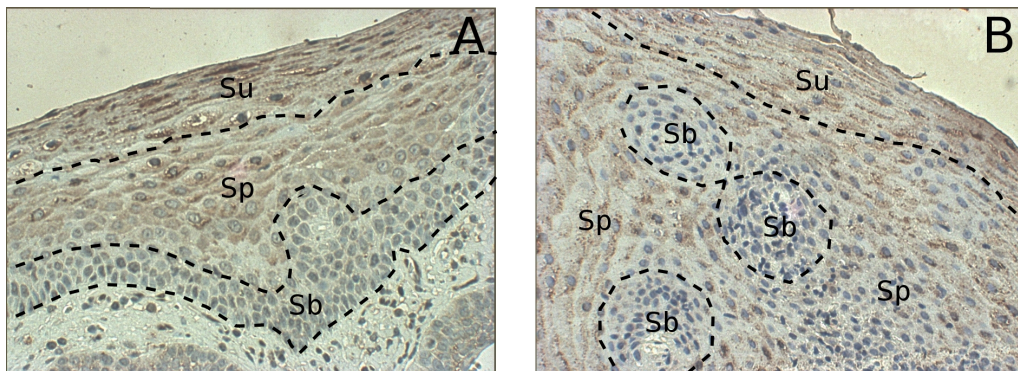


Abbildung 2. Lokalisation der einzelnen Strata des ösophagealen Plattenepithels entsprechend der Schnittrichtung.

Die diskontinuierlichen Linien repräsentieren den Übergang zwischen den einzelnen Strata der Mukosa. (A) zeigt exemplarisch einen vertikalen Schnittverlauf durch die ösophageale Schleimhaut. In (B) verläuft die Schnittrichtung horizontal. Zur Darstellung kommen drei Mukosapapillen mit zirkulärer Basalzellschicht (Mikroskop: Nikon F200 Kamera 990; x 200). Sb, Stratum basale; Sp, Stratum spinosum; Su, Stratum superficiale.

3.8. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung und Darstellung der Daten wurde mit Hilfe von Herrn Dipl.-Math. Dipl.-Biol. Kai Antweiler am Institut für Biometrie und Medizinische Informatik des Universitätsklinikums Magdeburg durchgeführt. Alle Daten wurden unter Verwendung der Statistiksoftware R - 2.15.0. analysiert. Korrelationsanalyse nach Spearman, Friedman-Test, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und Mann-Whitney U-Test kamen entsprechend zur Anwendung (2-seitig). Zur Verringerung des statistischen Fehlers bei multiplen Vergleichen fand für die Primärfragestellung ein Bonferroni

adjustiertes Signifikanzniveau für $k = 12$ Tests Verwendung. Hierzu wurden die erhaltenen p-Werte jeweils mit 12 multipliziert und als signifikant betrachtet, wenn diese Werte $\leq 0,05$ blieben. Sekundäre Fragestellungen wurden explorativ ohne Adjustierung gegen ein Niveau von 0,05 verglichen und dienen nur zur Theseindung. Für alle nicht-signifikanten Ergebnisse bei Anwendung des adjustierten p-Wertes erfolgte eine erneute Analyse ohne Adjustierung um Hinweise auf neue Thesen bei gegebenenfalls anzupassender Stichprobengröße einheitlich für alle betrachteten Fragestellungen darzustellen.

Das Plattenepithelkarzinom (PEK) und die tumorfreie Schleimhaut (TF) repräsentieren aufgrund ihres Ursprungs im gleichen Patienten abhängige Daten. Die verwendete Zuordnung zwischen der TF-Gruppe und der K-Gruppe (Alter, Geschlecht \pm 4Jahre) führte zu keiner erkennbaren Korrelation in der Zielgröße. Deshalb wurde beschlossen diese Gruppen als unverbunden zu betrachten. Aufgrund der Zusammensetzung aus abhängigen und unabhängigen Gruppen war im Hinblick auf die Primärfragestellung keine Anwendung von multivariaten Tests möglich. Es wurde direkt auf paarweise Gruppenvergleiche zurückgegriffen. Abgesehen von der primären Fragestellung, die einen Unterschied zwischen PEK und dem Stratum basale untersucht ($p \leq 0,05$; Bonferroni Adjustierung), sind alle weiteren Tests explorativ ($p \leq 0,05^*$).

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der klinischen Datenerhebung

In unsere Studie konnten 19 Patienten mit PEK des Ösophagus eingeschlossen werden, davon waren 14 männlich (73,7%) und 5 weiblich (26,3%).

Die Hauptsymptome bei Aufnahme waren Dysphagie (89,5%, n=17) und Gewichtsverlust (89,5%, n=17). Sodbrennen und Odynophagie traten bei einem geringeren Teil der Patienten (26,3%, jeweils n=5) auf. Die häufigste Nebendiagnose war bei 12 Patienten (63,2%) die arterielle Hypertonie, gefolgt vom Diabetes mellitus bei 5 Personen (26,3%). Gefäßerkrankungen fanden sich mit absteigender Häufigkeit wie folgt: Die Koronare Herzkrankheit erhielt 5 Nennungen (26,3%). Die periphere arterielle Verschlusskrankheit bestand bei 2 Patienten (10,5%). Eine Nennung hatten jeweils der cerebrale Insult und die Carotisstenose (jeweils 5,3%). Weiterhin war eine Hyperurikämie bei 2 Patienten zu erheben (10,5%). Erkrankungen mit Einfachnennung waren die Hyperthyreose, Hypercholesterinämie, chronische Niereninsuffizienz, symptomatische Epilepsie, Cholecystolithiasis, COPD und ein Pemphigus vulgaris. Der Pemphigus vulgaris wurde ca. 6 Monate zuvor diagnostiziert. Eine Tumorsuche inklusive ÖGD war damals nicht wegweisend. Retrospektiv ist der Pemphigus vulgaris als paraneoplastisch zu bewerten. Bei 4 Patienten waren keine Nebendiagnosen zu verzeichnen (21,1%).

Malignome waren zuvor bereits in 15,8% der Patienten (3 von 19) diagnostiziert worden. Bei einem Patienten bestand ein Prostatakarzinom. Dies war bei Erstdiagnose 2008 metastasiert. Es erfolgte eine palliative Therapie durch chirurgische Kastration. Ein weiterer Patient gab ein Oropharynxkarzinom ED 1992 an. Es fand eine chirurgische Therapie einschließlich „neck dissection“ und nachfolgender *adjuvanter Radiatio* (54 Gray, fraktioniert) statt. Postoperativ ergab das „Staging“ ein pT3N2bM0 Karzinom. Ein dritter Patient litt zuvor bereits an einem Oropharynxkarzinom, sowie *metachron* an einem Mundbodenkarzinom. Ersteres wurde 2004 diagnostiziert und postoperativ als pT2N0M0 klassifiziert. Es erfolgte eine *adjuvante* Strahlentherapie (60 Gray, fraktioniert). Das Mundbodenkarzinom wurde nach Erstdiagnose 2007

chirurgisch behandelt (pT1N0M0).

In Tabelle 4 wird das Alkoholkonsumverhalten der Studiengruppe wiedergegeben. Ein „niedriger Alkoholkonsum“ entspricht einer reinen Alkoholmenge von $\leq 10\text{g/d}$ bei Frauen, sowie $\leq 20\text{g/d}$ bei Männern (10g Alkohol entsprechen jeweils 200ml Bier, 100ml Wein und 20-30ml (30-50%) Likör). Eine Klassifizierung als „erhöhter Alkoholkonsum“ erfolgte bei darüber hinausgehenden Alkoholmengen. 94,7% der Patienten (18 von 19) gaben an Alkohol zu konsumieren oder zeitlebens konsumiert zu haben. Bei 4/18 dieser Patienten (22,2%) wurde ausschließlich Bierkonsum angegeben. Die 14 weiteren Patienten (77,7%) konsumierten mehr als eine Art Alkohol.

Tabelle 4. Übersicht zur Demographie, Tabak- und Alkoholkonsum.

Die Patienten wurden als ehemaliger Raucher/vormaliger Alkoholkonsument erfasst, wenn seit mehr als einem Jahr kein Konsum stattfand. Niedriger Alkoholkonsum ist nach Geschlecht unterschiedlich klassifiziert. Eine Menge von bis zu 20 g/d für Männer und bis zu 10 g/d für Frauen entspricht dieser Kategorie. Darüber hinausgehende Konsummengen repräsentieren einen erhöhten Konsum. PEK = Plattenepithelkarzinom.

	PEK (N=19)	
männlich/weiblich	14/5	
Durchschnittsalter	62 \pm 11 Jahre	
Raucher oder ehemaliger Raucher (%)		
nie	0	
aktive Raucher	11	(57,9)
ehemalige Raucher > 1 Jahr	8	(42,1)
Alkoholkonsum oder vormaliger Alkoholkonsum (%)		
Abstinenz	1	(5,3)
aktiver Alkoholkonsum	12	(63,2)
vormaliger Alkoholkonsum > 1 Jahr	6	(31,6)
Alkoholkonsum (Menge) (%)		
Abstinenz		
niedriger Alkoholkonsum	5	(41,7)
erhöhter Alkoholkonsum	7	(58,3)

Für jeden Patienten wurde die Tumorlokalisierung erfasst. Es erfolgte eine Einteilung in oberes Ösophagusdrittel (ca. 15 – 23 cm *ab ore*), mittleres Drittel (ca. 23 - 32 cm *ab ore*) und unteres Drittel (ca. 32 – 40 cm *ab ore*). Eine Zuordnung des Tumors wurde entsprechend der Lokalisation der Tumormitte vorgenommen. Die Tumorlokalisierung, den histologischen Tumorgrad („Grading“) und das Tumorstadium nach der Klassifikation der *Union International Contre le Cancer* (7. Auflage, Wittekind *et al.* 2010) gibt Tabelle 5 wieder. Die Zuordnung des Tumorstadiums erfolgte entsprechend klinischer Diagnostik.

Tabelle 5. Übersicht zu den Tumorcharakteristika.

Die Tumorlokalisation wurde in oberes (ca. 15-23 cm *ab ore*), mittleres (ca. 23 – 32 cm *ab ore*) und unteres Drittel (ca. 32 – 40 cm *ab ore*) klassifiziert. Der histologische Tumorgrad („Grading“) wurde in G1 (gut differenziert), G2 (mittelgradig differenziert), G3 (schlecht differenziert) und G4 (anaplastisch) eingeteilt. Eine Zuordnung des Tumorstadiums I - IV erfolgte entsprechend klinischer Diagnostik nach UICC = *Union contre le cancer* (7. Auflage, Wittekind *et al.* 2010). PEK = Plattenepithelkarzinom.

		PEK (N=19)	
Tumorlokalisation (%)			
	oberes Drittel	3	(15,8)
	mittleres Drittel	8	(42,1)
	unteres Drittel	8	(42,1)
Tumorgrading (%)			
	G1	0	(0)
	G2	11	(57,9)
	G3	7	(36,8)
	G4	1	(5,3)
Tumorstadium nach UICC (%)			
	I	2	(10,5)
	II	2	(10,5)
	III	4	(21,1)
	IV	11	(57,9)

In der retrospektiv erfassten Kontrollgruppe konnten insgesamt 9 Patienten, 5 männlich (55,5%) und 4 weiblich (44,5%), eingeschlossen werden. Das Alter lag bei 61,6 Jahre (\pm 11,6 Jahre).

Das Nikotinkonsumverhalten war für insgesamt 6 Probanden ermittelbar: Keinen Nikotinkonsum wiesen 3 Personen auf (50%), ehemalige Raucher waren weitere 3 Patienten (50%). Ein Alkoholkonsum war bei 4 Personen zu verzeichnen (66,6%), keinen Alkoholkonsum wiesen 2 Patienten auf. Weitere klinische und demographische Daten lagen nicht vor.

4.2. Allgemeine Erläuterung zur Auswertung

Für die IHC konnten 19 von 19 PEK ausgewertet werden. Die IHC Auswertung der tumorfreien Schleimhaut war in 4/19 Fällen nicht möglich, da kein separates histologisches Material zur Verfügung stand. In der Gruppe K wurden Biopsien von allen 9 Patienten mittels IHC evaluiert.

4.2.1. Immunhistochemische Expression von BLT-1

Die Abbildung 3(A-C) stellt die BLT-1 Expression in den verschiedenen Gewebegruppen dar. Abbildung 3A veranschaulicht exemplarisch die zytosolische Lokalisation des Rezeptors im Karzinom, der eine mittlere Expressionsstärke (IRS 8) zeigte (Abb. 3D). Weitere Zellstrukturen kamen nicht zur Anfärbung. Die Abbildungen 3B und 3C stellen hingegen die BLT-1 Expression in TF und K dar. BLT-1 war sowohl im Stratum basale als auch im Stratum spinosum und superficiale exprimiert. Die BLT-1 Expression im Stratum basale zeigte einen IRS von 8 in den TF Biopsien und einen IRS von 4 in den K Biopsien (Abb. 3D). Stromal eingestreute Leukozyten, deren Morphologie derer von PMN entsprach, wiesen ein zellmembranäres Expressionsmuster auf. Makrophagen und Lymphozyten (Abb. 3A und B) zeigten hingegen beim BLT-1 Rezeptor eine zytosolische Immunreaktion. Zum Teil wiesen auch kapilläre Endothelzellen eine positive BLT-1 Färbung auf (Abb. 3A). Die statistische Analyse der BLT-1 Rezeptorexpression ließ keinen Unterschied zwischen PEK und Stratum basale von TF erkennen. Hingegen wies das PEK eine signifikante Steigerung der Expression gegenüber der Basalzellschicht von K auf ($p < 0,05$). Im Vergleich zur K-Gruppe war BLT-1 in der TF-Gruppe ebenfalls signifikant erhöht exprimiert ($p < 0,05$). Die explorative Betrachtung unter nicht-adjustiertem Signifikanzniveau fand zwischen der BLT-1 Expression im PEK und der Basalzellschicht von TF weiterhin keinen Unterschied.

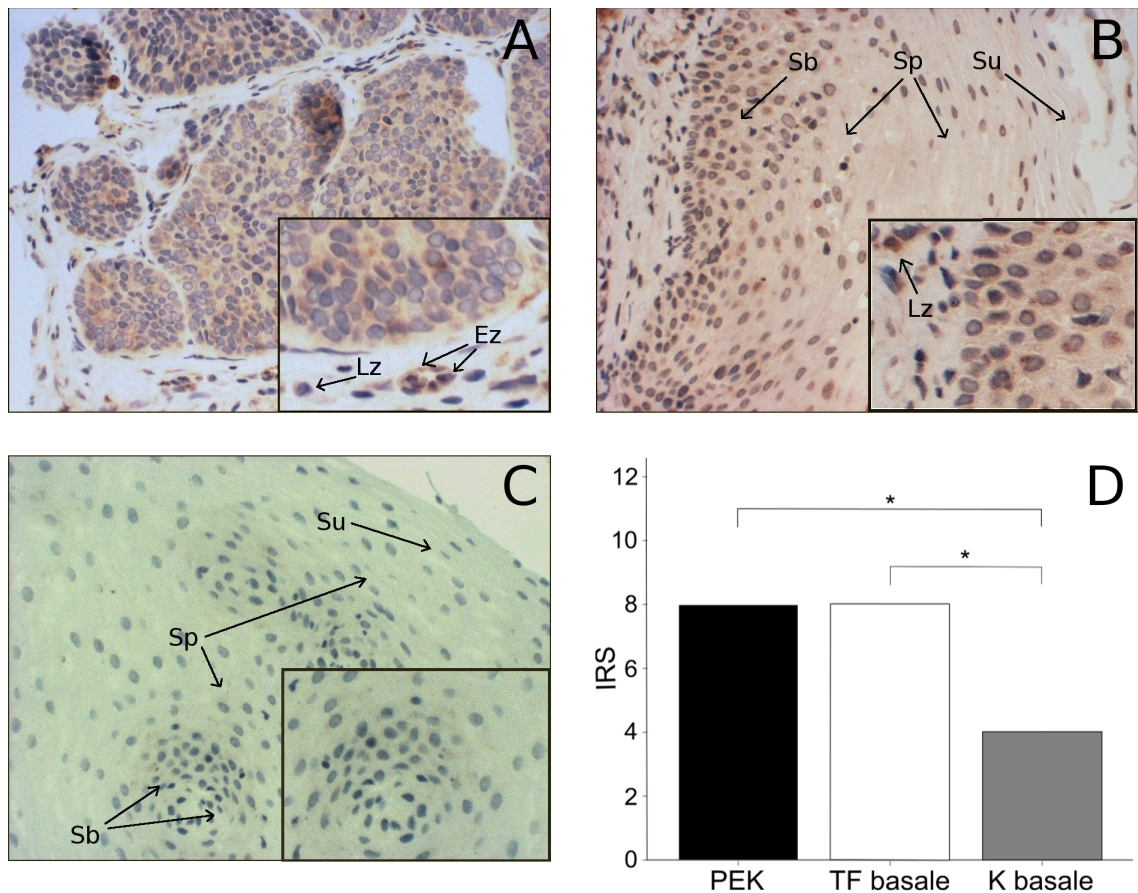


Abbildung 3. Immunhistochemische Lokalisation und Expression von BLT-1.

Im (A), (B) und (C) wird exemplarisch ein histologischer Schnitt mit niedriger (große Abbildung) und höherer (rechte untere Ecke) Magnifikation gezeigt. In (A) wird die BLT-1 Färbung im Plattenepithelkarzinom (PEK) wiedergegeben. Die Detailansicht zeigt eine zytosolische Lokalisation. In (B) wird exemplarisch die Expression von BLT-1 in der tumorfreien Ösophagusschleimhaut eines Patienten mit PEK (TF) veranschaulicht. Die Detailansicht zeigt einen Ausschnitt aus dem Stratum basale mit angrenzendem Stroma. Bild (C) zeigt exemplarisch die ösophageale Schleimhaut in der Kontrolle (K). In der Vergrößerung ist eine Mukosapapille mit zirkulärer Basalzellschicht dargestellt. Der positive Nachweis von BLT-1 wird als braune Färbung dargestellt (Mikroskop: Nikon F200 Kamera 990; x 200, x 300). Sb, Stratum basale; Sp, Stratum spinosum; Su, Stratum superficiale; Ez, Endothelzellen; Lz, Lymphozyten. In (D) wird die IHC-Expression von BLT-1 im PEK, TF basale und K basale dargestellt. Die Säulen repräsentieren den Median des IRS für das PEK (schwarze Säule), das TF Stratum basale, (TF basale, weiße Säule) und K Stratum basale (K basale, graue Säule). Eine Darstellung erfolgt aufgrund der Datenstruktur als Säulengraphik. BLT-1 zeigt im PEK gegenüber TF basale eine gleichwertige Expression. Hingegen ist zu K basale eine starke Zunahme des IRS im PEK erkennbar. IRS = „Immunoreactivity score“. (*) = $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test; Mann-Whitney U-Test; Bonferroni Adjustierung für $k=12$).

4.2.2. Immunhistochemische Expression von BLT-2

Die BLT-2 Expression der verschiedenen Gewebe wird exemplarisch in Abbildung 4(A-C) gezeigt. Das PEK (Abb. 4A) wies für BLT-2 eine mittlere Färbeintensität (IRS 8) im Zytosol auf (Abb. 4D). Die Abbildungen 4(B-C) repräsentieren beispielhaft die BLT-2 Rezeptorexpression in der ösophagealen Mukosa. Der Rezeptor zeigte sich hier in allen 3 Strata des Plattenepithels exprimiert. BLT-2 war in der TF-Gruppe und K-Gruppe im Zytosol nachweisbar. Das Statum spinosum und das Stratum superficiale hatten eine basalwärts gerichtete zytosolische BLT-2 Färbung (Abb. 4B-C). BLT-2 wies in den TF-Biopsien basal schwache Expressionswerte (IRS 4) auf, in den K-Biopsien war ebenfalls eine schwache Färbung (IRS von 4) zu finden (Abb. 4D). Stromal eingestreute Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen wiesen eine zytosolische Rezeptorexpression auf. Die statistische Analyse bei adjustiertem Signifikanzniveau erbrachte eine Steigerung der BLT-2 Expression im PEK gegenüber den Strata basale in TF und K ($p < 0,05$). Zwischen den beiden Basalzellschichten ließ sich hingegen kein Unterschied belegen. Bei erneuter explorativer Betrachtung (kein adjustiertes Signifikanzniveau) war eine erhöhte BLT-2 Expression in Stratum basale der K-Biopsien gegenüber den TF-Biopsien belegbar ($p < 0,05^*$).

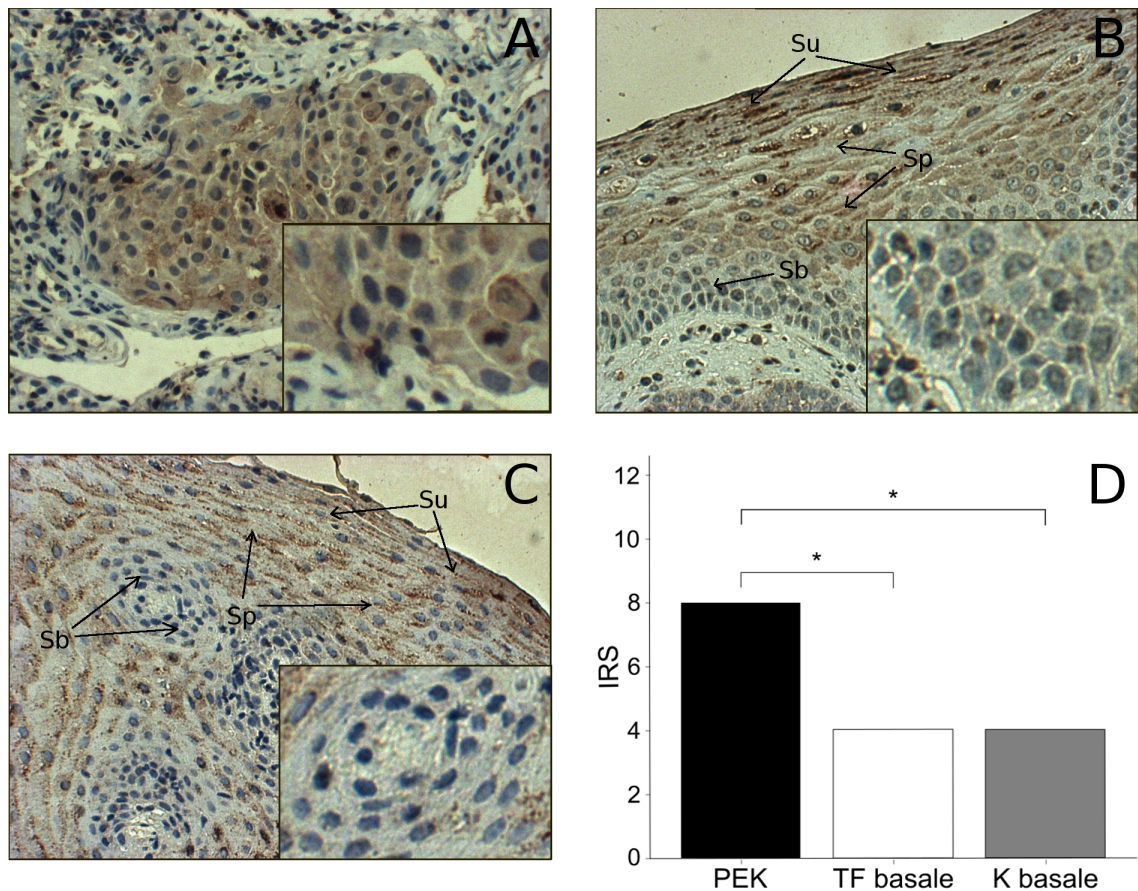


Abbildung 4. Immunhistochemische Lokalisation und Expression von BLT-2.

Die Abbildungen 4(A-C) zeigen beispielhaft Gewebeschnitte in niedriger (große Abbildung) und höherer (Detailansicht rechts unten) Vergrößerung. (A) zeigt die BLT-2 Färbung im Plattenepithelkarzinom (PEK). In der Detailansicht lässt sich eine zytosolische Expression erkennen. In (B) ist die BLT-2 Expression im normalen Plattenepithel eines Patienten mit Karzinom (TF) zu erkennen. Die Vergrößerung zeigt exemplarisch einen Ausschnitt des Stratum basale mit angrenzendem Stroma. Bild (C) zeigt die Ösophagusschleimhaut in der Kontrollgruppe (K). Die Detailansicht stellt eine Mukosapapille mit zirkulärer Basalzellschicht dar. Eine braune Färbung repräsentiert eine positive Rezeptorexpression (Mikroskop: Nikon F200 Kamera 990; x 200, x 300). Sb, Stratum basale; Sp, Stratum spinosum; Su, Stratum superficiale. Die immunhistochemische Expressionsstärke von BLT-2 in PEK, TF basale und K basale wird in (D) wiedergegeben. Die Säulen repräsentieren den Median des IRS für das PEK (schwarze Säule), das TF Stratum basale (TF basale, weiße Säule) und K Stratum basale (K basale, graue Säule). Eine Darstellung erfolgt aufgrund der Datenstruktur als Säulengraphik. Für den BLT-2 Rezeptor stellt sich das PEK wesentlich stärker exprimierend als in der TF- und K-Gruppe dar. TF basale und K basale zeigen eine ähnlich schwache Expression auf. IRS = „Immunoreactivity score“. (*) = $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test; Mann-Whitney U-Test; Bonferroni Adjustierung für $k=12$).

4.3.1. Immunhistochemische Expression von CysLT-1

Die Abbildung 5(A-C) zeigt exemplarisch die CysLT-1 Rezeptorexpression in den einzelnen Gewebegruppen. Der CysLT-1 Rezeptor wies im Karzinom eine zytosolische Lokalisation auf (Abb. 5A). Die Expressionsstärke erreichte einen IRS von 8 (Abb. 5D). In 74% der PEK-Biopsien (14 von 19) zeigte sich darüber hinaus eine nukleäre CysLT-1 Expression. Die Abbildung 6(A-B) gibt zur nukleären Färbung einen Überblick. In der Abbildung 5(B-C) wird exemplarisch die CysLT-1 Expression in den TF- und K-Biopsien gezeigt. Es war eine CysLT-1 Expression in den Strata basale, spinosum und superficiale feststellbar. Sowohl in TF als auch K zeigte sich der Rezeptor im Zytosol lokalisiert. In den Zellen des Stratum spinosum und superficiale war darüber hinaus eine basalwärts gerichtete zytosolische CysLT-1 Färbung vorzufinden. CysLT-1 war in 80% (12 von 15) der TF-Biopsien bzw. 66% (6 von 9) der K-Biopsien zusätzlich nukleär exprimiert (Abb. 6C-D). Der CysLT-1 Rezeptor zeigte sich in beiden Strata basale (TF und K) schwach exprimiert (IRS 4, Abb. 5D). Stromal verstreut vorzufindende Leukozyten, deren Form Granulo- und Lymphozyten, sowie Makrophagen erkennen ließ, wiesen eine zytosolische CysLT-1 Färbung auf. Die statistische Analyse ergab eine Steigerung der CysLT-1 Expression im PEK gegenüber dem Stratum basale in TF ($p < 0,05$). Zwischen PEK und K bestand hingegen kein Unterschied. Zwischen den Basalzellschichten von TF und K bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Bei nicht-adjustiertem Signifikanzniveau (explorative Analyse) war hingegen statistisch eine Steigerung der CysLT-1 Expression des PEK im Vergleich zur K-Gruppe nachweisbar ($p < 0,05^*$). Bei explorativer Analyse bestand weiterhin kein Unterschied zwischen der Basalzellschicht in der TF- und K-Gruppe.

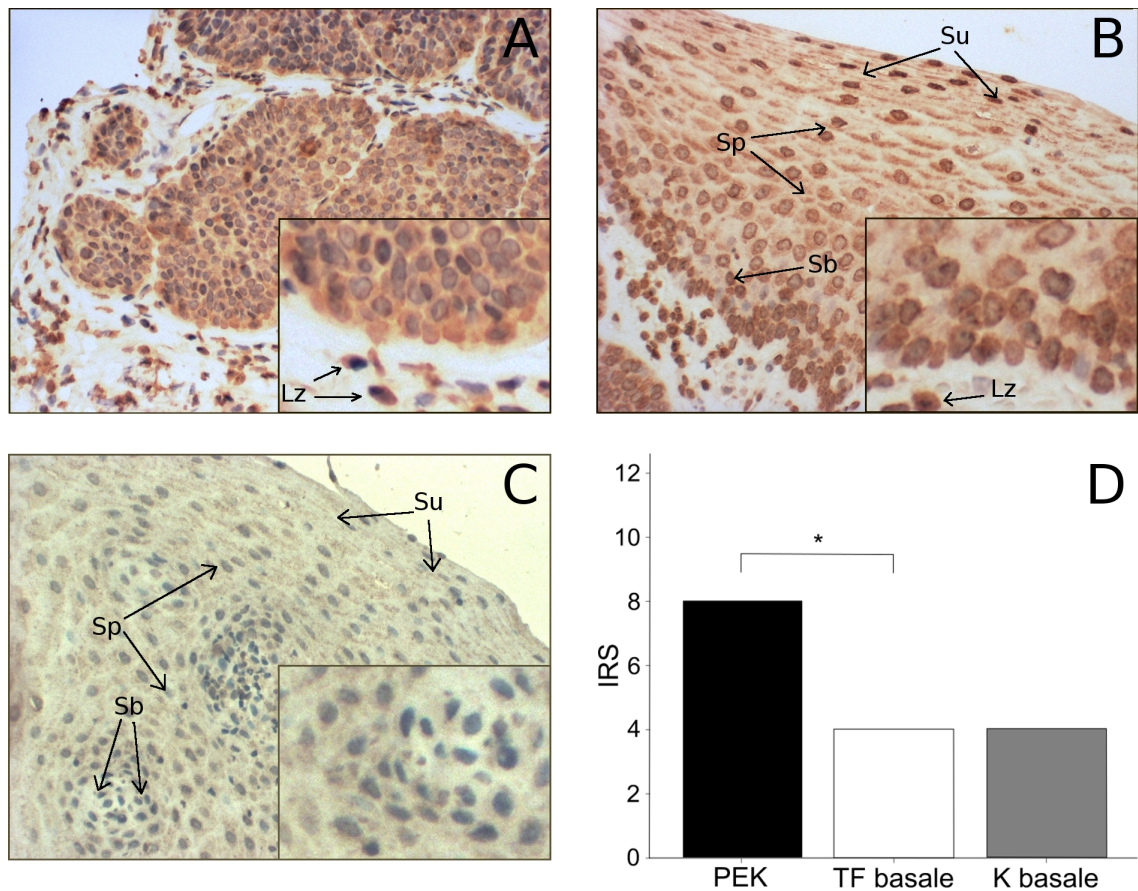


Abbildung 5. Immunhistochemische Lokalisation und Expression von CysLT-1.

In den Bildausschnitten (A-C) wird beispielhaft die CysLT-1 Rezeptorexpression für die einzelnen Gewebe veranschaulicht. Die Gewebeschnitte werden in niedriger (große Ansicht) und höherer Vergrößerung (kleine Ansicht, rechte untere Ecke) wiedergegeben. Eine Beispielabbildung für die CysLT-1 Expression im Plattenepithelkarzinom (PEK) ist in (A) zu sehen. In der Vergrößerung lässt sich eine zytosolische Lokalisation feststellen. Die CysLT-1 Expression in der tumorfreien Schleimhaut eines Patienten mit Plattenepithelkarzinom (TF) wird hingegen in (B) exemplarisch wiedergegeben. Zur detaillierten Ansicht kommt ein Ausschnitt aus dem Stratum basale mit angrenzendem Stroma. Es lässt sich neben der zytosolischen Expression eine nukleäre Lokalisation der Immunfärbung erkennen. (C) repräsentiert die ösophageale Schleimhaut in der Kontrolle (K). Es zeigt sich eine zytosolische CysLT-1 Expression. In der Detailansicht ist eine Schleimhautpapille mit zirkulärem Stratum basale zu sehen. CysLT-1 wird als braune Färbung dargestellt (Mikroskop: Nikon F200 Kamera 990; x 200, x 300). Sb, Stratum basale; Sp, Stratum spinosum; Su, Stratum superficiale. Lz, Lymphozyten. Die Abbildung (D) gibt die CysLT-1 Expressionsstärke in PEK, TF basale und K basale wieder. Die Säulen repräsentieren den Median des Färbintensitätsscores (IRS) für das PEK (schwarze Säule), das TF Stratum basale (TF basale, weiße Säule) und das K Stratum basale (K basale, graue Säule). Der Rezeptor CysLT-1 (D) wird im PEK wesentlich stärker exprimiert als in TF und K. Die Darstellung erfolgt aufgrund der Datenstruktur als Säulengraphik. IRS = „Immunoreactivity score“. (*) = $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test; Mann-Whitney U-Test; Bonferroni Adjustierung für $k=12$).

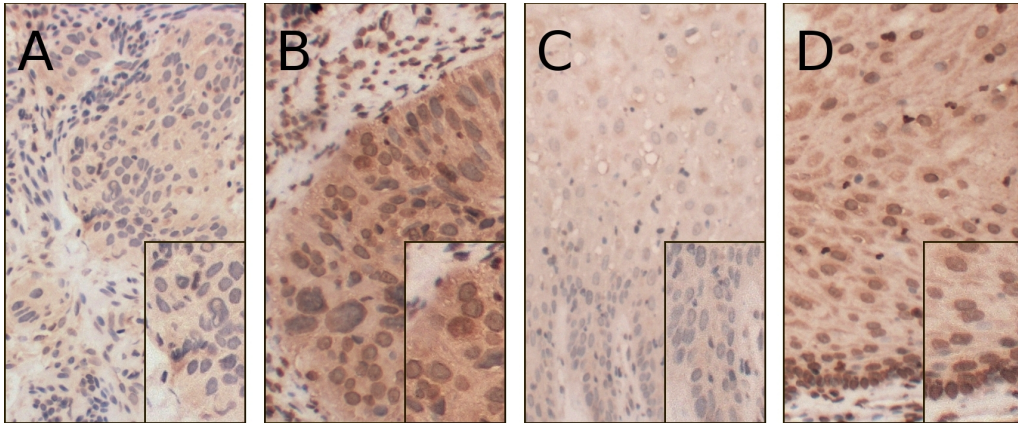


Abbildung 6. Nukleäre Expression von CysLT-1.

In der Abbildung 6(A-D) ist repräsentativ die Lokalisation der CysLT-1 immunhistochemischen Färbung dargestellt. (A) und (B) zeigen jeweils Anteile eines Plattenepithelkarzinoms (PEK). In beiden Detailansichten (A und B) ist eine zytosolische CysLT-1 Expression zu erkennen. Die Abbildung 6B zeigt exemplarisch zusätzlich eine nukleäre CysLT-1 Färbung. In 6(C-D) ist jeweils ein Ausschnitt aus dem nicht-malignen ösophagealen Plattenepithel zu sehen. (C) zeigt eine zytosolische CysLT-1 Expression. Bild (D) lässt eine zytosolische und nukleäre CysLT-1 Rezeptorlokalisierung erkennen. Die CysLT-1 Expression wird durch eine braune Färbung dargestellt (Mikroskop: Nikon F200 Kamera 990; x 100, x 150).

4.3.2. Immunhistochemische Expression von CysLT-2

Die immunhistochemische Färbung von CysLT-2 wird für die unterschiedlichen Gewebegruppen in Abbildung 7(A-C) dargestellt. Die CysLT-2 Rezeptorfärbung wies im PEK eine ausschließlich zytosolische Lokalisation auf (Abb. 7A). Es war ein mittelgradiger IRS von 8 zu beobachten (Abb. 7D). Abbildung 7(B-C) stellt hingegen exemplarisch die CysLT-2 Rezeptorexpression in den TF- und K-Biopsien dar. CysLT-2 zeigte sich im Stratum basale, spinosum und superficiale exprimiert. Es war eine zytosolische Lokalisation der Immunfärbung zu beobachten. Die Spinosalzellschicht und Superficialzellschicht wies in beiden Gruppen jeweils eine basalseitig gelegene CysLT-2 Rezeptorexpression im Zytosol auf. Sowohl in der TF-Gruppe als auch in der K-Gruppe fand sich im Stratum basale eine schwache Expression (IRS 4, Abb. 7D). Im Bindegewebe lokalisierte Lympho- und Granulozyten, sowie Makrophagen besaßen ein zytosolisches CysLT-2 Färbeverhalten. Das PEK zeigte gegenüber den Strata basale von TF und K eine Steigerung der CysLT-2 Expression ($p < 0,05$). Kein Unterschied war zwischen den Basalzellschichten der TF- und K-Biopsien zu finden. Bei Verwendung des nicht-adjustierten Signifikanzniveaus war weiterhin kein Unterschied in der CysLT-2 Expression zwischen TF und K nachweisbar.

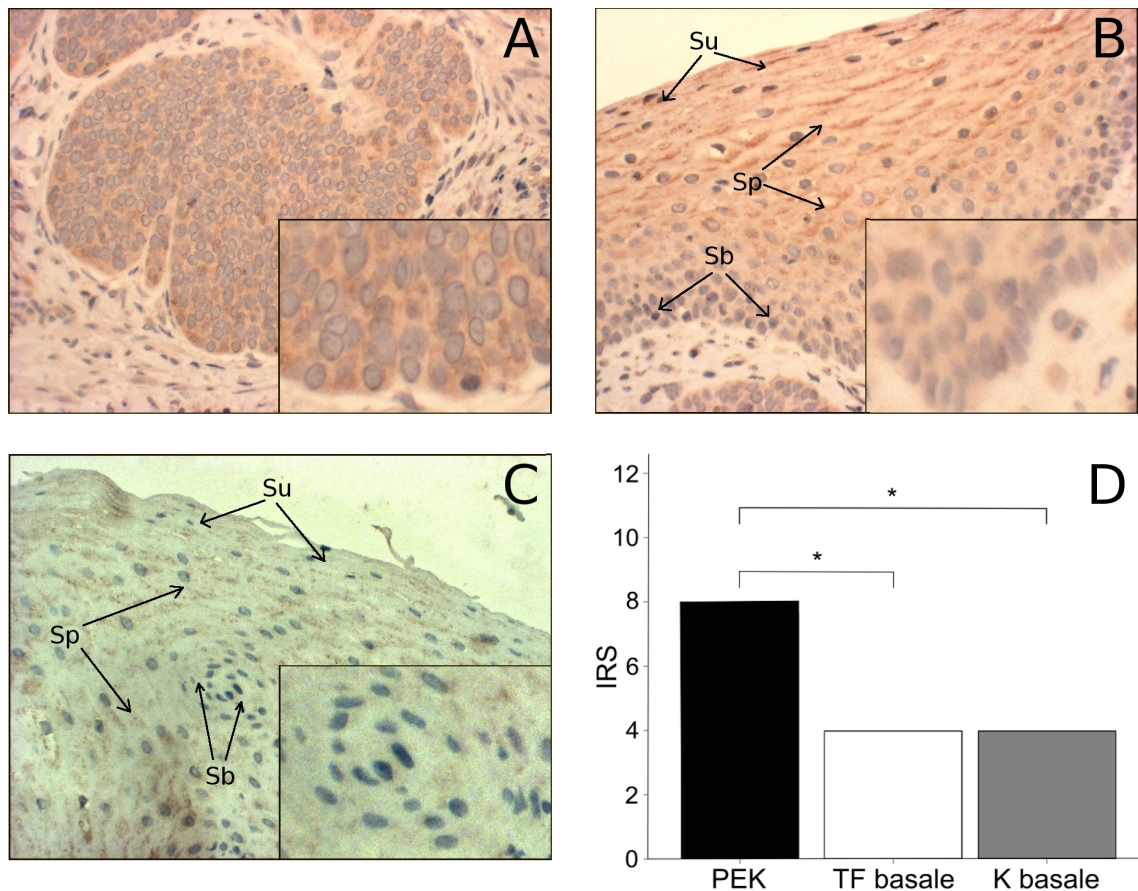


Abbildung 7. Immunhistochemische Lokalisation und Expression von CysLT-2.

In (A), (B) und (C) wird beispielhaft jeweils ein histologischer Schnitt zu den verschiedenen Geweben gezeigt. Die Darstellung umfasst eine niedrige (große Ansicht) und eine erhöhte (kleine Ansicht, rechte untere Ecke) Magnifikation. Im Plattenepithelkarzinom (PEK) (A) ist eine zytosolische Lokalisation der CysLT-2 Immunfärbung in der Detailansicht zu erkennen. (B) zeigt exemplarisch die Rezeptorexpression in der tumorfreien Schleimhaut eines Patienten mit PEK (TF). Das Detailbild veranschaulicht die zytosolische Anfärbung des Stratum basale mit angrenzendem Bindegewebe. (C) repräsentiert die ösophageale Schleimhaut in der Kontrollgruppe (K). In der Detaildarstellung ist eine Mukosapapille mit zirkulärer Basalzellschicht zu erkennen. CysLT-2 zeigt sich zytosolisch exprimiert. CysLT-2 wird durch eine braune Färbung repräsentiert (Mikroskop: Nikon F200 Kamera 990; x 200, x 300). Sb, Stratum basale; Sp, Stratum spinosum; Su, Stratum superficiale. In Abbildung D wird die Expression von CysLT-2 im PEK, TF basale und K basale dargestellt. Die Säulen repräsentieren den Median des IRS für das PEK (schwarze Säule), das TF Stratum basale (TF basale, weiße Säule) und K Stratum basale (K basale, graue Säule). Eine Darstellung erfolgt aufgrund der Datenstruktur als Säulengraphik. Die CysLT-2 Expression ist im PEK wesentlich stärker als in der TF- und K-Gruppe. IRS = „Immunoreactivity score“. (*) = $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test; Mann-Whitney U-Test; Bonferroni Adjustierung für $k=12$).

4.4. Ergebnisse der explorativen Analyse sekundärer Fragestellungen

Es erfolgte eine explorative Untersuchung sekundärer Fragestellungen. Dies umfasste eine Analyse der Leukotrien-B4- und CysLT-Rezeptorexpression im Bezug auf das Tumorstadium. Weiterhin wurde die Expression innerhalb der Mukosa der TF- und K-Gruppe untersucht. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich zwischen den korrespondierenden Strata der TF- und K-Biopsien. Zudem wurde eine Analyse der Blt-1, Blt-2 und Cyslt-1, Cyslt-2 Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene in den 3 Gewebegruppen (PEK, TF und K) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde hierzu nicht adjustiert (siehe Abschnitt 3.8.).

4.4.1. Leukotrienrezeptorexpression und Tumorstadium

Die klinische Einteilung der Tumorstadien erfolgte nach UICC (7. Auflage, Wittekind *et al.* 2010). Da sich in den Stadien I-III nur eine geringe Patientenzahl in jeder Gruppe ergab (Tab. 5), wurden Stadium I, II und III zusammengefasst und mit dem Stadium IV verglichen. Es war kein Unterschied in der Expression der Rezeptoren BLT-1, BLT-2, CysLT-1 und CysLT-2 zwischen den Gruppen zu beobachten (Mann-Whitney U-Test).

4.4.2. Immunhistochemischer Nachweis der Expression von BLT-1 in der tumorfreien Mukosa der Patienten mit Plattenepithelkarzinom und der Kontrolle

Die Abbildung 8A gibt einen Überblick zur BLT-1 Expression der TF- und K-Biopsien. BLT-1 war im Stratum basale und spinosum in TF mittelgradig (IRS 6-8) exprimiert. K wies hingegen eine schwache Expression (IRS 4) auf. Die Superficialzellschicht zeigte in den TF-Biopsien eine Abnahme der BLT-1 Expression (IRS 4). In den K-Biopsien war ebenfalls eine Verringerung der BLT-1 Rezeptorexpression im Stratum superficiale (IRS 0) beobachtbar. BLT-1 zeigte innerhalb von TF eine signifikante Abnahme des IRS von basal nach superficial ($p < 0,05^*$). Die statistische Analyse für K erbrachte keine Veränderung der BLT-1 Rezeptorexpression über die einzelnen Zellschichten hinweg. Alle Strata der TF-Gruppe wiesen gegenüber den korrespondierenden Schichten in der K-Gruppe eine signifikant gesteigerte Expression des BLT-1 Rezeptors auf ($p < 0,05^*$).

4.4.3. Immunhistochemischer Nachweis von BLT-2 in der tumorfreien Mukosa der Patienten mit Plattenepithelkarzinom und der Kontrolle

Der Nachweis der Expression von BLT-2 in TF und K ist in der Abbildung 8B zu sehen.

BLT-2 zeigte sich in TF basale schwach exprimiert (IRS von 4). In der Basalzellschicht von K war ebenfalls eine schwache Expression (IRS von 4) feststellbar. Die beiden Gruppen (TF und K) wiesen spinosal (IRS 9-11) und superficial eine starke Expression auf (IRS 12). Die beobachtete Zunahme der BLT-2 Expression vom Stratum basale zum Stratum superficiale in der Mukosa der TF-Gruppe und K-Gruppe war jeweils signifikant ($p < 0,05^*$). Die BLT-2 Expression der korrespondierenden Strata spinosum und superficiale von TF und K unterschied sich in der statistischen Analyse nicht.

4.4.4. Immunhistochemischer Nachweis von CysLT-1 in der tumorfreien Mukosa der Patienten mit Plattenepithelkarzinom und der Kontrolle

In Abbildung 8C ist das Expressionsmuster von CysLT-1 in der TF- und der K-Gruppe dargestellt. Der CysLT-1 Rezeptor war im Stratum basale von TF und K schwach exprimiert (IRS 4). In der TF-Gruppe zeigte sich im Stratum spinosum und Stratum superficiale gegenüber der Basalzellschicht eine Zunahme der CysLT-1 Expression (IRS 8). Demgegenüber blieb die CysLT-1 Expression in der K-Gruppe von basal nach superficial konstant (IRS 4). In TF war die CysLT-1 Expressionserhöhung vom Stratum basale zum Stratum spinosum und Stratum superficiale statistisch signifikant ($p < 0,05^*$). CysLT-1 war in der Spinosal- und Superficialzellschicht von TF stärker exprimiert als in den korrespondierenden Strata der K-Gruppe ($p < 0,05^*$).

4.4.5. Immunhistochemischer Nachweis von CysLT-2 in der tumorfreien Mukosa der Patienten mit Plattenepithelkarzinom und der Kontrolle

Einen Überblick zur Expression von CysLT-2 im ösophagealen Plattenepithel (TF und K) gibt Abbildung 8D. CysLT-2 war in der TF- und K-Gruppe basal schwach exprimiert (IRS 4). Der CysLT-2 Rezeptor wies in der Spinosal- und Superficialzellschicht der TF-Biopsien eine starke Expression auf (IRS 10-12). In K war hingegen in den gleichen Strata eine mittelgradige CysLT-2 Expression feststellbar (IRS 6-8). Die statistische Analyse erbrachte in der TF- und K-Gruppe eine signifikante Zunahme der CysLT-2 Expression von basal nach superficial ($p < 0,05^*$). CysLT-2 zeigte sich in der Spinosal- und Superficialzellschicht von TF gegenüber den entsprechenden Strata in K signifikant erhöht exprimiert ($p < 0,05^*$).

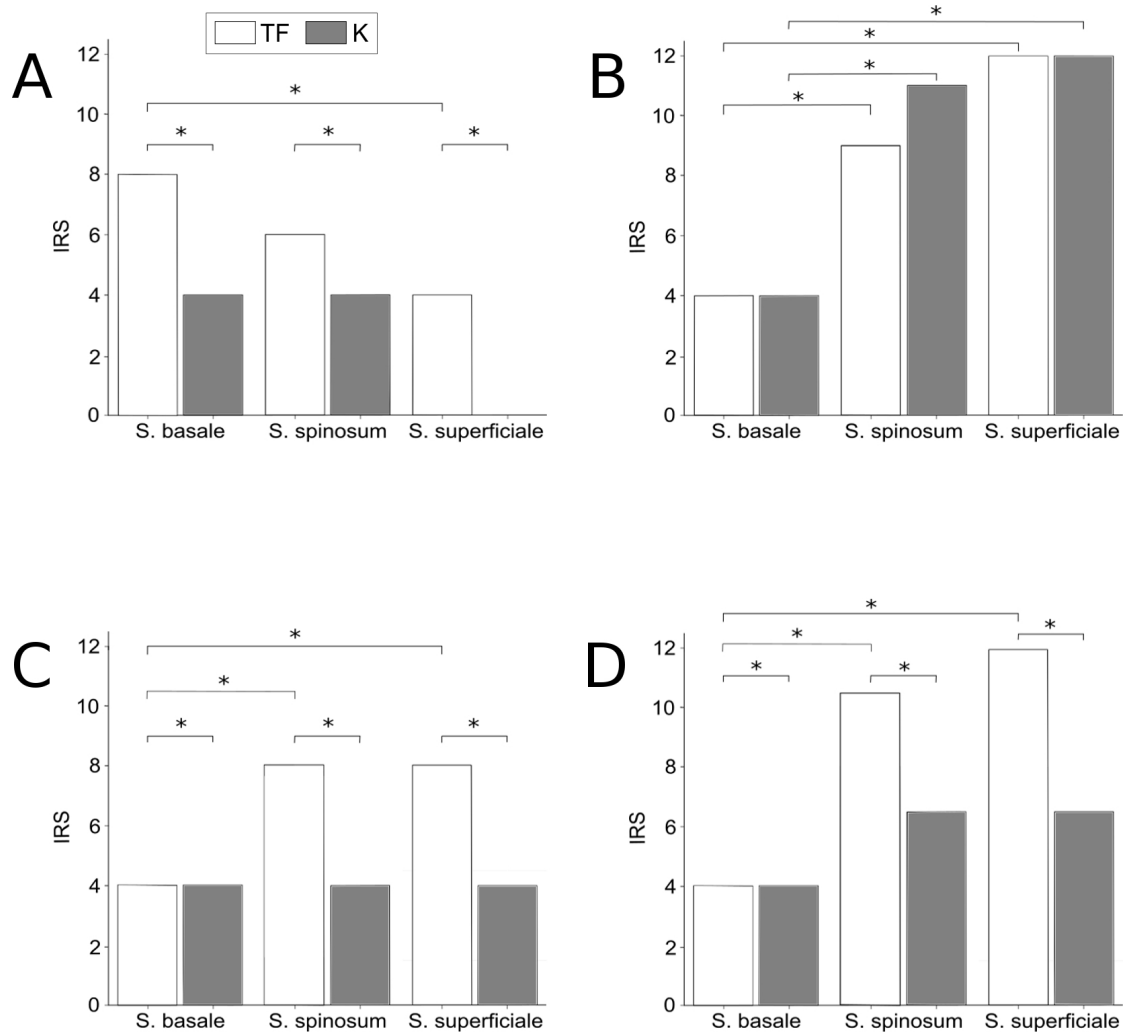


Abbildung 8. Immunhistochemischer Nachweis der Expression der Leukotrienrezeptoren in der tumorfreien Schleimhaut von Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und in Kontrollpatienten.

(A) veranschaulicht die BLT-1 Expression. Sowohl für TF als auch K lässt sich eine Abnahme des IRS von basal nach superficial beobachten. Zusätzlich weist TF in allen Schichten einen höheren IRS als K auf. Aufgrund der Datenstruktur ergibt sich für K im Stratum superficiale keine graphische Darstellung. Für den BLT-2 Rezeptor (B) steigt die Expression hingegen in TF und K vom Stratum basale zum Stratum superficiale an. Das Stratum basale lässt für TF und K eine gleiche Expression erkennen, für die nachfolgenden Strata besteht im Wesentlichen ebenfalls kein Unterschied. In (C) ist der IRS für CysLT-1 wiedergegeben, der für beide Gruppen basal gleichwertig ist. Hier kann in TF eine starke Zunahme der mittleren Expression von basal nach superficial beobachtet werden. Hingegen zeigt K keine Veränderung in der Expressionsstärke. CysLT-2 (D) weist im Stratum basale für TF und K einen gleichwertigen IRS auf. Die weiter luminal lokalisierten Mukosaschichten sind von einer Zunahme der Expression in TF und K gekennzeichnet. TF weist jedoch in beiden Strata einen wesentlich höheren IRS als K auf. Eine Darstellung erfolgt aufgrund der Datenstruktur als Säulengraphik. Die Säulen repräsentieren den Median des Färbintensitätsscores (IRS) in den einzelnen Strata der Mukosa. TF = tumorfreie Schleimhaut; K = Ösophagusschleimhaut im Kontrollpatienten; S. basale = Stratum basale; S. spinosum = Stratum spinosum; S. superficiale = Stratum superficiale; IRS = „Immunoreactivity score“. (*) = $p < 0,05^*$ (Wilcoxon-Test, Mann-Whitney U-Test).

4.4.6. Expressionsanalyse von Blt-1/-2 auf mRNA-Ebene im Karzinom, der tumorfreien Schleimhaut und der Kontrolle

Blt-1 und Blt-2 zeigten sich auf mRNA-Ebene in den 3 Gruppen (PEK, TF und K) exprimiert (Abb. 9). Der Blt-1 Rezeptor wies eine Zunahme des Transkriptes im PEK (2,3-fach) und TF (2,5-fach) gegenüber K auf. Die Zunahme der Blt-1 mRNA in TF war gegenüber K signifikant ($p < 0,05^*$). Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen dem PEK und der TF-Gruppe. Das Blt-2 Transkript zeigte hingegen keine statistisch signifikante Differenz zwischen dem PEK und den Mukosagruppen (TF und K) auf.

4.4.7. Expressionsanalyse von Cyslt-1/-2 auf mRNA-Ebene im Karzinom, der tumorfreien Schleimhaut und der Kontrolle

Die Expression von Cyslt-1 und Cyslt-2 auf mRNA-Ebene war in allen untersuchten Geweben gegeben (Abb. 9). Cyslt-1 zeigte im PEK eine 3,2-fache Abnahme der mRNA-Konzentration gegenüber den K-Biopsien. Die Reduktion des Cyslt-1 Transkriptes erreichte zwischen PEK und K statistische Signifikanz ($p < 0,05^*$). Zwischen TF und PEK bzw. TF und K war statistisch kein Unterschied nachweisbar. Die Expression von Cyslt-2 auf mRNA-Ebene war im PEK (17-fach) und TF (16,1-fach) gegenüber K geringer. Dies erreichte statistische Signifikanz ($p < 0,05^*$).

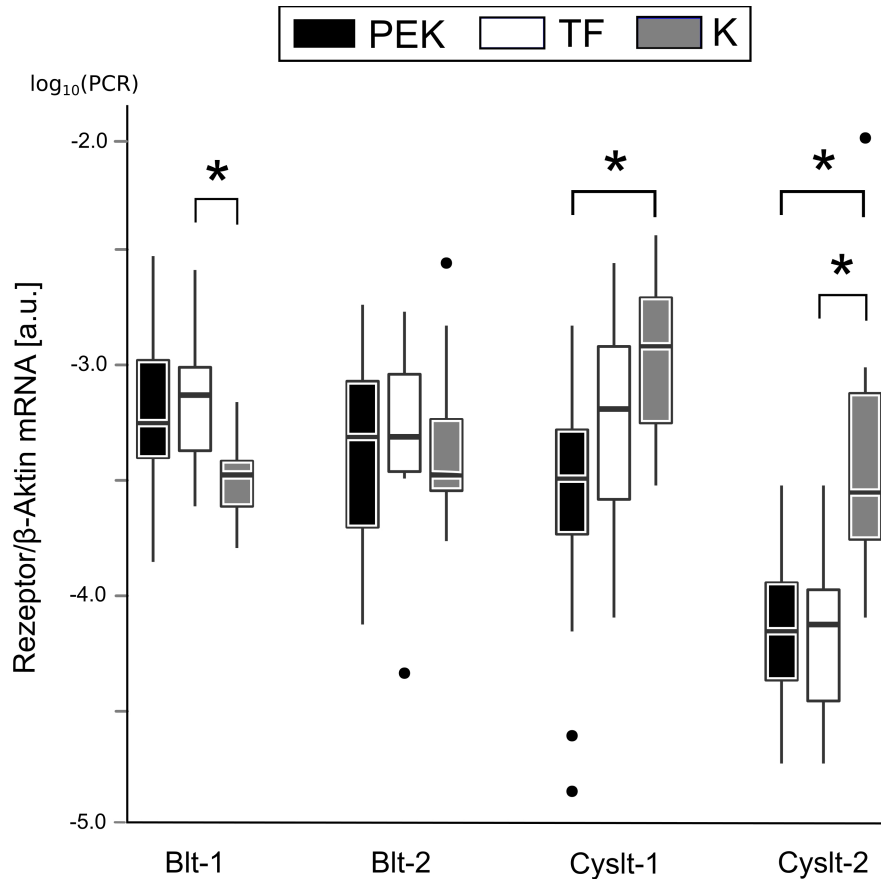


Abbildung 9. Boxplot-Darstellung der Leukotrienrezeptorexpression auf mRNA-Ebene in Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (Karzinom und tumorfreie Schleimhaut) und in der Kontrolle.

Zur Berechnung der Darstellung eines jeweiligen Boxplots wurden logarithmierte Werte verwendet. Die Darstellung erfolgt als Median (Linien innerhalb der Box), 0,25% und 0,75% Quartil (obere und untere Boxbegrenzung). Klammern repräsentieren signifikante 2-Gruppen-Vergleiche. Punkte kennzeichnen Werte unter bzw. über den „Whiskers“. Die Darstellung erfolgt gemäß Tukey. Als Werteeinheit kommen [a.u.] = „arbitrary units“ zur Anwendung. PEK = Plattenepithelkarzinom; TF = tumorfreie Schleimhaut; K = Kontrolle; * = $p < 0,05$ (Wilcoxon-Test, Mann-Whitney U-Test).

5. Diskussion

5.1. Bedeutung der BLT-1 Expression im PEK des Ösophagus und in der nichttransformierten Ösophagusschleimhaut

Mehrere Studien konnten bereits zuvor eine BLT-1 Expression für diverse gastrointestinale Malignome belegen (Venerito *et al.* 2011; Ihara *et al.* 2007; Hennig *et al.* 2002). Uns gelang erstmalig ein Nachweis des BLT-1 Rezeptors im PEK des Ösophagus *in situ*. Gegenüber der Basalzellschicht in K zeigte das PEK zudem eine Hochregulation von BLT-1. In einer *in vitro* Studie konnten Hoque *et al.* (2005) bereits Blt-1 auf mRNA-Niveau in Zelllinien des ösophagealen PEK (TE-1; TE-3; SKGT-4; SKGT-5) exprimiert nachweisen. Eine Inhibition der 5-LOX löste in diesen Zellen Apoptoseprozesse aus, die nachfolgend durch Applikation von LTB₄ verhindert werden konnten. U-75302, ein selektiver BLT-1 Antagonist, bewirkte hingegen ebenfalls einen Anstieg der Apoptoserate. Obwohl dies auf eine Beteiligung von BLT-1 an der Genese des ösophagealen PEK hinweist, bleibt dessen Stellenwert für karzinogene Prozesse weiter abzuklären. Ähnliche Ergebnisse wurden zuvor auch für das Pankreaskarzinom erbracht (Tong *et al.* 2007; Hennig *et al.* 2002), allerdings konnte in einer nachfolgenden Phase II Studie an Patienten mit inoperablem Pankreaskarzinom die zusätzliche Gabe des BLT-1 Antagonisten LY293111 gegenüber der alleinigen Monotherapie mit Gemcitabine keinen Überlebensvorteil herbeiführen (Saif *et al.* 2009).

Eine BLT-1 Expression konnte ebenfalls in der nichtmalignen Ösophagusk Mukosa (TF und K) beobachtet werden. Dabei ließ die TF Mukosa generell eine höhere BLT-1 Expression als K erkennen. Sowohl TF als auch K zeigten basal die höchste BLT-1 Expression. Hingegen war in beiden Gruppen der BLT-1 Rezeptor nach luminal herabreguliert. In der Genexpressionsanalyse zeigte die TF Ösophagusk Mukosa (ähnlich dem PEK) eine rund zweifache Zunahme des Blt-1 Transkripts gegenüber K. Marian *et al.* (2006) analysierten immunhistochemisch in einer Studie zur Pathogenese der „chronic obstructive pulmonary disease“ (COPD) die LTB₄-Rezeptorexpression in der Lunge von Rauchern und Nichtrauchern. Hierbei ließen Alveolarmakrophagen der Raucher eine signifikant erhöhte BLT-1 Expression erkennen. 19 von 19 unserer

Patienten mit PEK gaben bei Diagnosestellung einen aktiven (11/19) bzw. ehemals aktiven (8/19) Zigarettenkonsum an. Klinische Daten konnten wir in K in 6/9 Patienten retrospektiv erheben, wobei 6/6 Patienten angaben, keine aktiven Raucher zu sein. In K waren zudem 3/6 Patienten zeitlebens Nichtraucher. Eine geringere Exposition gegenüber dem Zigarettenrauchen kann für K angenommen werden. Ein erhöhter Zigarettenkonsum als Ursache der beobachteten BLT-1 Hochregulation in TF ist denkbar, bleibt aber abzuklären. Weitere Unterstützung für diese These ergibt sich aus bisherigen Erkenntnissen über die Regulation der Blt-1 Transkription. So wird diese über eine Modulation des Methylierungsgrades GC-reicher Sequenzen im Promotorbereich des Gens reguliert. Dabei besteht zwischen Aktivität und Methylierungsgrad des Blt-1 Promotors eine inverse Korrelation (Kato *et al.* 2000). Dass epigenetische Variationen *in vivo* eine erhöhte Blt-1 Transkription bedingen können, offenbarten zuletzt Analysen an peripheren mononukleären Blutzellen von Menschenaffen und Menschen, die ein unterschiedliches Methylierungsmuster für das Blt-1 Gen erbrachten. Gegenüber dem hypermethylierten humanoiden Blt-1 Promotor zeigte sich der humane hypomethyliert. Es resultierte ein 40-fach höherer zellulärer Blt-1 mRNA-Spiegel im Menschen mit nachfolgend erhöhter konzentrationsabhängiger Kalziummobilisation durch LTB₄ (Wilson *et al.* 2014). Epigenetische Untersuchungen konnten eine Beeinflussung des Methylierungsmusters verschiedener Gene durch Zigarettenrauchen belegen, die eine veränderte Genexpression bewirkte. Dabei war Rauchen häufig mit einer Demethylierung betroffener Gene assoziiert. Karzinogene Prozesse können somit begünstigt werden (Besingi *et al.* 2014; Zeilinger *et al.* 2013). Ob Zigarettenkonsum auch zu einer Alteration der Methylierung des Blt-1 Promotors führt, ist nicht untersucht. Ein Stellenwert für die erhöhte Blt-1 mRNA Menge im PEK und TF bleibt jedoch weiter abzuklären.

Weiterhin unterliegt die BLT-1 Expression pro- und antiinflammatorischen Faktoren. In einer Studie an Monozyten führten die proinflammatorischen Mediatoren Interferon (INF)- γ , „tumor necrosis factor“ (TNF)- α und bakterielles Lipopolysaccharid zu einer Abnahme der BLT-1 Expression. Die Antiphlogistika Interleukin (IL)-10 und Dexamethason bewirkten hingegen eine BLT-1 Expressionssteigerung (Pettersson *et al.* 2005). Eine IL-10 Synthese ist für das ösophageale PEK nachgewiesen (Gholamin *et al.* 2009). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die BLT-1 Expressionszunahme in TF

parakrin durch das PEK bedingt ist.

Ihara *et al.* (2007) konnten hingegen in einer Studie an Kolonkarzinomen eine BLT-1 Expression auch für 80% der Kolonadenome beobachten, wohingegen die normale Kolonmukosa kein BLT-1 exprimiert. Patienten mit ösophagealem PEK weisen häufig weitere neoplastische Veränderungen der Ösophagasmukosa auf. So waren in einer Studie aus Japan in 5/68 Patienten mit PEK des Ösophagus synchrone Karzinome der Speiseröhre feststellbar. Weitere mukosale Dysplasien unterschiedlichen Grades waren in 26/68 Fällen zu sehen (Miyazaki *et al.* 2002). Eine BLT-1 Expression ist für neoplastische Veränderungen der Ösophagasmukosa bisher nicht untersucht. Obwohl wir zur Auswertung regelrecht stratifiziertes Ösophagusepithel heranzogen, sind geringgradige histologische Veränderungen des selbigen nicht sicher auszuschließen. Über eine Relevanz für die BLT-1 Expression in TF kann spekuliert werden.

Eine Studie an Patienten mit *Helicobacter pylori* positiver Korpusgastritis konnte eine gesteigerte BLT-1 Expression der Proliferationszone foveolärer Magendrüsen beobachten. Im differenzierten Magenepithel war eine geringere BLT-1 Expression zu sehen (Venerito *et al.* 2008). Proliferative Vorgänge sind im mehrschichtigen Ösophagusepithel auf das basale Kompartiment beschränkt, luminale Strata unterliegen der Differenzierung (Seery *et al.* 2000). Wir konnten ebenfalls die höchste BLT-1 Expression in der Proliferationszone von TF und K beobachten. Eine Rolle von BLT-1 für Proliferationsvorgänge im Ösophagusepithel ist zu vermuten. Weitere Studienergebnisse stützen dies. Seegers *et al.* (2000) untersuchten in einer randomisierten Studie die Wirkung eines oral eingenommenen BLT-1 Antagonisten (VML295) auf die humane Epidermis nach mechanischer Traumainduktion. Gegenüber Placebo zeigte die Verumgruppe weniger Basalzellen in der S und G₂M-Phase, sowie eine Zunahme postmitotischer Epithelzellen. Inwieweit eine nachlassende Proliferation und zunehmende Differenzierung für die BLT-1 Expressionsabnahme luminaler Strata ursächlich sind, ist Spekulation. Ähnliches konnte zumindest *in vitro* an BLT-1 exprimierenden murinen, neuronalen Stammzellen beobachtet werden. Diese ließen nach Differenzierung in Neurone eine Reduktion der BLT-1 mRNA- und Proteinexpression erkennen (Wada *et al.* 2006).

5.2. Bedeutung der BLT-2 Expression im PEK des Ösophagus und in der nichttransformierten Ösophagusschleimhaut

Uns gelang erstmalig ein Nachweis des BLT-2 Rezeptors auf Proteinebene im PEK des Ösophagus. Dabei zeigte das PEK eine BLT-2 Hochregulation gegenüber den Strata basale von TF und K. Bisherige Studien konnten für BLT-2 eine förderliche Wirkung auf proliferative Prozesse, Zellüberleben, Invasion und Metastasierung in Malignomen belegen (Lee *et al.* 2012; Choi *et al.* 2010; Kim *et al.* 2012; Kim *et al.* 2010). Beispielsweise zeigten Lee *et al.* (2013) in einer *in vitro* Studie eine Assoziation zwischen der *Anoikis*-Resistenz aggressiver Prostatakarzinomzellen (PC-3) und einer BLT-2 Hochregulation auf. Die siRNA-bedingte BLT-2 Depletion induzierte nachfolgend eine Expressionszunahme proapoptotischer Proteine und verminderte das Zellüberleben. Für *Anoikis*-sensitive Prostataepithelzellen (PWR-1E) konnte hingegen nach BLT-2 Überexpression eine erhöhte Resistenz gegenüber diesem Apoptosemechanismus beobachtet werden. In einer aktuellen Studie demonstrierten Park *et al.* (2015) wiederum, dass eine lipopolysaccharidbedingte Zunahme des invasiven Potentials von Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231; MDA-MB-435) durch eine erhöhte Expression des BLT-2 Rezeptors und seiner Liganden LTB₄ und 12(S)-HETE mediiert wird. Eine BLT-2 Inhibition reduzierte nachfolgend die invasive Aktivität und das Metastasierungspotential der Karzinomzellen *in vitro* und in einem orthotopen Mammakarzinommodell *in vivo*. Ein weiterer Prozess, der für Metastasierungsvorgänge als relevant angesehen wird, ist die epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT). In *in vitro* Versuchen an humanen Mammaepithelzellen (MCF-10A) induzierte der „transforming growth factor“ (TGF)- β eine reduzierte E-cadherinexpression, Erhöhung der Vimentinexpression und Invasivität, sowie zellmorphologische Veränderungen, passend zu einer EMT. Eine BLT-2 Überexpression bzw. BLT-2 Rezeptorstimulation in MCF-10A Zellen verstärkte diese Veränderungen nachfolgend zusätzlich (Kim *et al.* 2014). Für das ösophageale PEK ist die Funktion von BLT-2 bisher nicht untersucht. Ein positiver BLT-2 Nachweis im PEK mit erhöhter Expression gegenüber den Basalzellschichten (TF und K) lässt ebenfalls eine Rolle für die Pathogenese des PEK vermuten. Weitere Untersuchungen sind hierzu notwendig.

BLT-2 war ebenfalls in den unterschiedlichen Strata der Ösophagismukosa in TF und K exprimiert. Basal zeigte der BLT-2 Rezeptor eine schwache Expression, spinosal und superficial war eine starke Hochregulation feststellbar (TF und K). Zwischen den korrespondierenden Strata (TF und K) war kein Unterschied in der BLT-2 Expression zu erkennen. Das Blt-2 Transkript zeigte sich in der RT-PCR Analyse ebenfalls in allen Gruppen auf ähnlichem Niveau.

Aktuell wird für den BLT-2 Rezeptor eine Entstehung durch Genduplikation aus Blt-1 diskutiert (Yokomizo *et al.* 2000). Bisherige Studien zeigten jedoch unterschiedliche expressionsfördernde Faktoren auf. So konnte LTB₄ in einer Studie an humanen Endothelzellen zeitabhängig eine Blt-1 mRNA- und BLT-1 Proteinexpression induzieren. Eine ähnliche Wirkung war für BLT-2 nicht zu beobachten (Qiu *et al.* 2006). Der BLT-2 Rezeptor verfügt hingegen mit 12(S)-(HETE)-Hydroxyeicosatetraensäure und dem Thromboxanderivat 12-(HHT)-Hydroxyheptadekatrinoensäure über weitere physiologische Agonisten (Okuno *et al.* 2008; Yokomizo *et al.* 2001). Analysen konnten die 12-HETE als das Hauptlipoxygenaseprodukt der normalen Ösophagismukosa identifizieren. Weitere Lipoxygenase- und Thromboxanderivate waren hingegen nur in sehr geringer Menge bzw. nicht nachweisbar (Alber *et al.* 1988). Inwieweit die BLT-2 Expression in TF und K als Folge einer konstanten epithelialen 12(S)-HETE-Synthese resultiert, bleibt gegenwärtig Spekulation. Über die Wirkung der 12(S)-HETE auf Blt-2 Transkription und Proteinexpression ist bisher nichts bekannt.

Daneben wird mechanischer Stress als förderlich für die epitheliale Homöostase im Gastrointestinaltrakt diskutiert (Gayer *et al.* 2009). So führten in *in vivo* und *in vitro* Studien mechanische Belastung am Intestinum bzw. intestinalen Epithelzellen zur Stimulation von Proliferationsprozessen und der Proteinsynthese (Basson *et al.* 1996; Spencer *et al.* 2006). Eine ähnliche mechanische Belastung durch lebenslang auftretende Schluckvorgänge und autonome Muskelkontraktionen kann für alle Patienten (TF und K) vermutet werden. Hingegen ist für TF und K eine interindividuell unterschiedliche Exposition gegenüber exogenen Einflüssen anzunehmen. Ob die mechanische Beanspruchung der Ösophagismukosa eine ähnliche BLT-2 Expression der Epithelzellen (TF und K) herbeiführen kann, bleibt weiter abzuklären.

Hinweise zur BLT-2 Funktion in der Ösophagismukosa ergeben sich aus vorhergehenden Studien. Izuka *et al.* (2010) beobachteten im Tiermodell einer chemisch

induzierten Kolitis, dass BLT-2 „knock-out“ Mäuse eine verstärkte intestinale Entzündungsreaktion im Vergleich zum Wildtyp zeigten. Daneben traten spontane Inflammationen des Kolons auf, die durch Invasion der orthotopen Darmflora bedingt gesehen wurden. Eine BLT-2 Expression konnte für Kryptenzellen der Kolonmukosa des Wildtyps nachgewiesen werden. Funktionelle Analysen offenbarten *in vitro* eine Verstärkung der Barriereigenschaften von MDCKII Epithelzellen durch BLT-2 Transfektion. Seitens der Autoren wurde für BLT-2 eine mukosale Schutzfunktion im Intestinum diskutiert. Für die Ösophagasmukosa ist dies bisher nicht untersucht. Jedoch lassen weitere Studienergebnisse auch eine protektive Funktion von BLT-2 für das mehrschichtige Ösophagusepithel annehmen. So perfundierten Stein *et al.* (1989) in einer Studie Ösophagi von Kaninchen mit angesäuerter Pepsinlösung. Bei vorheriger Gabe des COX-Inhibitors Indometacin war keine Veränderung des mukosalen Schadens zu erkennen. Unter Anwendung des dualen LOX/COX-Inhibitors BW755C konnte hingegen eine Zunahme der Mukosaschädigung verzeichnet werden. Da unter BW755C eine signifikante Abnahme der 12-HETE Spiegel innerhalb der Mukosa auftraten, wurde für diese eine protektive Funktion diskutiert. Die 12(S)-HETE ist wiederum ein Agonist am BLT-2 Rezeptor (Yokomizo *et al.* 2001).

Genauer abzuklären bleibt die Rolle der BLT-2 Expression im Stratum basale. Als Präkanzerosen des duktales Pankreaskarzinoms gelten u.a. intraepitheliale papilläre muzinöse Neoplasien (IPMN). In einer Studie an Pankreaskarzinomen konnten Hennig *et al.* (2008) zeigen, dass benigne IPMN eine BLT-2 Expression aufweisen können, die sich nicht vom normalen Pankreasgangepithel unterscheidet. Maligne IPMN ließen hingegen eine Hochregulation der BLT-2 Expression erkennen. Unbekannt ist aktuell, inwieweit intraepitheliale Neoplasien des Ösophagus mit zunehmendem Schweregrad Alterationen der BLT-2 Expression aufweisen und dem Ösophaguskarzinom vorausgehen. Bisherige Studien lassen jedoch eine Relevanz von BLT-2 für die Tumorinduktion vermuten. Wiederholte *in vitro* Studien an H-ras mutierten murinen Fibroblasten konnten zeigen, dass BLT-2 Ras-induzierte Veränderungen zum onkogenen Phänotyp mediiere kann. Eine BLT-2 Überexpression in nicht-mutierten Fibroblasten erzeugte ähnliche phänotypische Veränderungen, einhergehend mit einer Proliferationssteigerung, Verlust der Kontaktinhibition, verankerungsunabhängigem

Wachstum und Suppression des „smooth muscle α -actin“ Gens (Choi *et al.* 2008; Yoo *et al.* 2004). Abzuklären bleibt die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Pathogenese des ösophagealen PEK. Über eine basale BLT-2 Expressionssteigerung mit zunehmendem Dysplasiegrad als Voraussetzung für eine Tumorinduktion kann diesbezüglich spekuliert werden.

5.3. Bedeutung der CysLT-1 Expression im PEK des Ösophagus und in der nichttransformierten Ösophagusschleimhaut

Wir konnten erstmalig eine CysLT-1 Expression im ösophagealen PEK belegen. Dabei zeigte das PEK eine Hochregulation des CysLT-1 Rezeptors gegenüber den Strata basale in TF und K, wobei gegenüber K keine Signifikanz nach Adjustierung bestand. Letzteres ist vermutlich der geringen Probandenzahl in K geschuldet und bedarf der Abklärung. Verschiedene Studien konnten bereits zuvor eine erhöhte CysLT-1 Proteinexpression in unterschiedlichen Karzinomen belegen (Matsuyama *et al.* 2010; Magnusson *et al.* 2010; Venerito *et al.* 2011). Gegenwärtig werden für CysLT-1 unterschiedliche Funktionen im Malignom diskutiert. Beispielsweise war in einer Studie an CysLT-1 exprimierenden Kolonkarzinomzellen (Caco-2, SW480) durch selektive Rezeptorantagonisierung eine Reduktion der Proliferationsrate induzierbar. Da zudem eine endogene Cysteinyl-Leukotriensynthese in den Karzinomzellen nachgewiesen werden konnte, wurde eine auto- bzw. parakrine Stimulation vermutet (Paruchuri *et al.* 2006). Öhd *et al.* (2003) führten hingegen in einer weiteren *in vitro* Studie an Caco-2 Kolonkarzinomzellen mittels Transfektion eine CysLT-1 Überexpression herbei. In diesen zeigte sich ein Anstieg des Zellüberlebens gegenüber dem Wildtyp. Darüber hinaus wird auch eine Relevanz von CysLT-1 für Metastasierungsprozesse diskutiert. Massoumi *et al.* (2003) konnten in einer weiteren Studie an der Zelllinie Caco-2 zeigen, dass CysLT-1 Adhäsions- und Migrationseigenschaften dieser modulieren kann. So konnte *in vitro* durch LTD₄ Stimulation eine integrinvermittelte Adhäsion an eine Kollagen I Matrix dosis- und zeitabhängig verstärkt werden. Weiterhin war durch LTD₄ Applikation eine Zunahme der Migrationsrate feststellbar. Bisher sind diese Effekte für das ösophageale PEK nicht untersucht. Ähnliche Funktionen können für dieses vermutet werden, bedürfen aber der weiteren Abklärung.

Eine CysLT-1 Expression war in allen Strata (TF und K) der Ösophagusk Mukosa zu beobachten. Der CysLT-1 Rezeptor war sowohl für TF als auch K im Stratum basale gering exprimiert. In der TF Mukosa zeigte sich CysLT-1 in der Spinosal- und Superficialzellschicht hochreguliert, wohingegen K hier keine Veränderung aufwies. TF und K ließen in der Analyse der Genexpression keine Veränderung der Cyslt-1 Transkription erkennen. Im PEK zeigte sich das Cyslt-1 Transkript gegenüber K

reduziert. In einer *in vitro* Studie an der nichtmalignen Zelllinie Int 407 konnten die inflammatorischen Mediatoren TNF- α und LTD₄ nicht nur eine CysLT-1 Hochregulation zeitabhängig herbeiführen. Ebenso war durch beide ein Expressionsanstieg der Schlüsselenzyme 5-LOX und LTC₄-Synthase auslösbar (Yudina *et al.* 2008). Demzufolge wäre eine lokale Dysregulation der Cysteinyl-Leukotriensynthese als Ursache der erhöhten luminalen CysLT-1 Expression in TF denkbar. Wodurch diese bedingt sein kann und welche funktionellen Veränderungen diese im Epithel hervorrufen würden, kann aktuell nicht beantwortet werden. Bisherige Studien legen weiterhin eine transkriptionelle Regulation der CysLT-1 Proteinexpression nahe (Yudina *et al.* 2008; Amrani *et al.* 2001; Thivierge *et al.* 2001; Thivierge *et al.* 2000). Demgegenüber konnte an bronchialen Muskelzellen durch Applikation von TGF- β flusszytometrisch eine CysLT-1 Hochregulation nachgewiesen werden, ohne dass es zur Änderung des Cyslt-1 Transkripts kam. Eine erhöhte Proteintranslation bzw. verminderte Proteindegradation wurde als ursächlich diskutiert (Espinosa *et al.* 2003). Ein Stellenwert dieser Beobachtung für die Hochregulation des CysLT-1 Proteins in TF bei gleichbleibender Cyslt-1 mRNA bleibt abzuklären.

Ferner konnte Zymosan in einer *in vitro* Studie an dendritischen Zellen eine Herabregulation der Cyslt-1 mRNA und Proteinexpression bedingen. Ein Prozess, der sich als Prostaglandin (PG)E₂ und IL-10 abhängig erwies (Thivierge *et al.* 2009). Eine endogene Synthese von PGE₂ und IL-10 durch das ösophageale PEK ist vorbeschrieben (Meng *et al.* 2011; Gholamin *et al.* 2009). Demnach ist eine Reduktion der Cyslt-1 Transkription hierdurch denkbar. Die Ergebnisse weiterer Studien legen zudem nahe, dass CysLT-1 posttranskriptionell und –translational modifiziert wird, womit eine Veränderung der mRNA Halbwertszeit und Proteinexpression bzw. -degradation einhergehen kann (Thivierge *et al.* 2009; Espinosa *et al.* 2003). Ob dies die Zunahme der CysLT-1 Proteinexpression bei gleichzeitiger Reduktion des Cyslt-1 Transkripts im PEK bedingen kann, ist gegenwärtig unklar, stellt jedoch eine mögliche Erklärung dar.

Da eine CysLT-1 Expression für die Ösophaguskosa nicht vorbeschrieben ist, kann über die Funktion des Rezeptors innerhalb dieser nur gemutmaßt werden. Cysteinyl-Leukotriene werden unter physiologischen Bedingungen in der Ösophaguskosa synthetisiert (Gupta *et al.* 2006). Da sowohl Rezeptor als auch Ligand nachweisbar sind,

kann vermutet werden, dass für den LTD₄-CysLT-1 Signalweg eine physiologische Funktion im mehrschichtigen ösophagealen Plattenepithel existiert. An *in vitro* Studien in intestinalen Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass CysLT-1 nach LTD₄ Applikation über separate Signaltransduktionswege einen Anstieg der Proliferationsrate, des Zellüberlebens und der Migrationsrate bedingen kann (Paruchuri *et al.* 2005; Paruchuri *et al.* 2003). Die funktionelle Relevanz dieser Beobachtung für das Ösophagusepithel bedarf weiterer Abklärung. Ähnliche Effekte sind für dieses bisher nicht untersucht.

Neben einer zytoplasmatischen Lokalisation konnte eine nukleäre CysLT-1 Expression durch uns in 14/19 PEK des Ösophagus beobachtet werden. CysLT-1 zeigte sich in der nichtmalignen Mukosa von TF und K ebenfalls nukleär exprimiert (80% bzw. 66%), wobei sich diese Expression über alle Strata erstreckte. Ähnlich unseren Ergebnissen konnte eine nukleäre CysLT-1 Lokalisation zuvor bereits für das Kolonkarzinom und die nichtmaligne Kolonmukosa aufgezeigt werden (Nielsen *et al.* 2005). Weitere Studien belegten, dass CysLT-1 zudem nach Aktivierung an die Kernmembran translozieren kann (Parhamifar *et al.* 2010; Nielsen *et al.* 2005). In einer *in vitro* Studie an intestinalen Epithelzellen (Int 407; IEC-6) war durch selektive CysLT-1 Antagonisierung dosisabhängig ein zellulärer Proliferationsstop sowie Apoptose induzierbar. Hingegen konnte an vier verschiedenen Zelllinien des Kolonkarzinoms (Caco-2, SW480, HCT-116, HT-29) hierdurch nur eine Inhibition der Proliferation beobachtet werden. Erst eine Blockade der 5-LOX führte ebenfalls zur Apoptoseinduktion. Paruchuri *et al.* (2006) vermuteten diesbezüglich eine Relevanz nukleärer CysLT-1 Rezeptoren für die Überlebenssignalübermittlung, da diese extrazellulären CysLT-1 Antagonisten nicht zugänglich sind. Übereinstimmend hierzu konnten Magnusson *et al.* (2010) eine hohe nukleäre CysLT-1 Expression in einer anderen Studie an Kolonkarzinomen häufiger für fortgeschrittene Stadien beobachten. Eine weitere statistische Analyse erbrachte für Patienten mit fehlender nukleärer CysLT-1 Expression die beste Überlebensprognose, wohingegen Patienten mit hoher nukleärer CysLT-1 Expression die schlechteste aufwiesen. Anhand unserer Ergebnisse kann spekuliert werden: (1) Nukleäre CysLT-1 Rezeptoren können für das ösophageale PEK eine Relevanz haben. (2) Das Vorhandensein nukleärer CysLT-1 Rezeptoren in der

nichtmalignen Ösophagusk Mukosa lässt auf eine erhöhte Rezeptoraktivierung schließen. Inwieweit und welche funktionellen Veränderungen sich hierdurch für die Mukosa ergeben, bleibt gegenwärtig ungeklärt.

5.4. Bedeutung der CysLT-2 Expression im PEK des Ösophagus und in der nichttransformierten Ösophagusschleimhaut

Vorhergehende Studien zeigten bisher CysLT-2 in unterschiedlichen Karzinomen exprimiert auf (Venerito *et al.* 2011; Magnusson *et al.* 2010; Magnusson *et al.* 2007). Übereinstimmend hierzu konnten wir erstmalig CysLT-2 im PEK des Ösophagus nachweisen. Dabei zeigte sich eine CysLT-2 Hochregulation vom PEK gegenüber der Basalzellschicht von TF und K. Gegenwärtig wird eine antikarzinogene Funktion des CysLT-2 Rezeptors vermutet (Magnusson *et al.* 2011; Magnusson *et al.* 2007). So konnte in einer Studie an Kolonkarzinomzellen (Caco-2) durch LTC₄ Stimulation des CysLT-2 Rezeptors eine Expression intestinaler Bürstensaumproteine ausgelöst werden, die allgemein als Differenzierungsmarker gelten (Magnusson *et al.* 2007). Ferner ließen CysLT-2 negative Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231) nach Cyslt-2 Transfektion eine reduzierte migratorische Kapazität *in vitro* erkennen. LTC₄ als selektiver Rezeptoragonist verstärkte diesen Effekt weiter (Magnusson *et al.* 2011). Für das ösophageale PEK sind diese Wirkungen aktuell nicht untersucht. Magnusson *et al.* (2011) konnten zudem *in vivo* in Mammakarzinomen eine direkte Korrelation zwischen histologischem Differenzierungsgrad und CysLT-2 Expression beobachten. So war eine Verminderung der CysLT-2 Expression mit Verringerung des Differenzierungsgrades der Mammakarzinome feststellbar. Inwieweit diese Beobachtung für das PEK des Ösophagus Bestand hat, bedarf weiterer Untersuchung in größeren Studien. Wir konnten bei geringer Fallzahl an PEK mit ungleichmäßiger Verteilung der Differenzierungsgrade diesbezüglich keine Analyse der CysLT-2 Expression durchführen. Allerdings zeigte die Gruppe PEK gegenüber dem differenzierten Oberflächenepithel der Ösophagumukosa in TF CysLT-2 erniedrigt exprimiert (Ergebnisse nicht gezeigt, $p < 0,05^*$, Wilcoxon-Test).

CysLT-2 zeigte sich ebenfalls in der TF und K Ösophagumukosa exprimiert. Basal war in beiden Gruppen eine geringe CysLT-2 Expression zu sehen. K wies im Stratum spinosum und superficiale eine Zunahme der CysLT-2 Expression auf. Gegenüber der K Mukosa war in TF CysLT-2 spinosal und superficial zusätzlich hochreguliert. In der RT-PCR Analyse ließ die TF Mukosa (ähnlich dem PEK) hingegen eine Herabregulation der CysLT-2 Transkription gegenüber K erkennen.

Bisher konnte in zurückliegenden Studien eine direkte transkriptionelle Regulation der CysLT-2 Rezeptorexpression beobachtet werden (Magnusson *et al.* 2011; Yudina *et al.* 2007; Early *et al.* 2007). Im Gegensatz hierzu stehen unsere Beobachtungen in TF und PEK. Posttranskriptionelle bzw. posttranslationale Mechanismen sind für CysLT-2 bisher nicht bekannt. Die Rolle der Ausbildung von Di- und Oligomeren der CysLT-Rezeptoren (Jiang *et al.* 2007; Figueroa *et al.* 2001) bleibt diesbezüglich jedoch abzuklären. So konnte eine verzögerte Rezeptorinternalisierung mit Reduktion der Proteindegradation hierdurch beispielsweise für G-Protein gekoppelte Rezeptoren festgestellt werden (Evans *et al.* 2008). Inwieweit dies für das beobachtete CysLT-2 Expressionsmuster relevant ist, bleibt aktuell Spekulation.

In einer weiteren Studie an humanen Mastzellen war nach CysLT-2 „knock-down“ eine Erhöhung der CysLT-1 Rezeptorexpression zu verzeichnen. Eine ähnliche Beobachtung gelang in murinen Mastzellen von CysLT-2 „knock-out“ Tieren. Eine verstärkte Aktivierung mitogener Signalwege nach LTD₄ Stimulation konnte für diese Zellen festgestellt werden. Fluoreszenzanalysen offenbarten nachfolgend, dass eine direkte Interaktion zwischen CysLT-1 und CysLT-2 in Form von Rezeptordimeren auftreten kann. Jiang *et al.* (2007) diskutierten für CysLT-2 als Funktion eine Abschwächung der CysLT-1 Signalaktivität. Eine CysLT-2 bedingte Begrenzung der CysLT-1 Homodimerisation bzw. CysLT-1 Expression wurde vermutet. Ergebnisse einer weiteren *in vitro* Studie stützen eine zusammenhängende CysLT-Rezeptorexpression. So konnte in einer nichtmalignen und malignen intestinalen Epithelzelllinie (Int 407 bzw. Caco-2) nach Exposition mit LTD₄ sowohl eine CysLT-1 als auch CysLT-2 Hochregulation beobachtet werden (Yudina *et al.* 2008). Wir konnten in TF, neben einer erhöhten CysLT-2 Expression, auch eine Hochregulation von CysLT-1 für luminale Schichten gegenüber K beobachten. Über eine CysLT-2 Hochregulation in TF als Folge der erhöhten CysLT-1 Expression kann demnach spekuliert werden.

Demgegenüber müssen auch methodische Aspekte bei der Interpretation der CysLT-2 Expression im PEK und TF berücksichtigt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die voneinander abweichende Expression des CysLT-2 Proteins und der Cyslt-2 mRNA im PEK und TF statistisch durch die geringe Fallzahl unserer Studie beeinflusst ist. Untersuchungen mit größerer Fallzahl würden zur Klärung beitragen.

Hinsichtlich der Bedeutung des CysLT-2 Rezeptors für das ösophageale Plattenepithel können wir ebenfalls nur Vermutungen anstellen. So ist eine Zellzyklusabhängigkeit der Expression für CysLT-2 vorbekannt. Ruhende intestinale Epithelzellen wiesen in einer *in vitro* Studie CysLT-2 exprimiert auf. Bei mitogener Aktivität mit Eintritt in den Zellzyklus kam es zur Abnahme der CysLT-2 Expression (Magnusson *et al.* 2007). Wir konnten CysLT-2 in der Basalzellschicht (TF und K) der Ösophagasmukosa gering exprimiert verzeichnen. Im Stratum spinosum und superficiale nahm die CysLT-2 Expression nachfolgend in beiden Gruppen zu. Die Basalzellschicht gilt als mitotisch aktives Kompartiment der Mukosa, spinosal und superficial unterliegen die Epithelzellen hingegen Differenzierungsprozessen (Jankowski *et al.* 1992). Inwieweit CysLT-2 im Ösophagusepithel einen Marker für zunehmende Differenzierung darstellt, oder aktiv Differenzierungsprozesse auslösen kann, ist nicht bekannt. Obwohl aktuelle Ergebnisse an Kolonkarzinomzellen (Caco-2) einen Stellenwert des CysLT-2 Rezeptors für die Einleitung zellulärer Differenzierungsprozesse aufzeigen konnten (Magnusson *et al.* 2007), sind Studien an nichtmalignen Epithelzellen zur weiteren Abklärung diesbezüglich notwendig.

6. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie konnten wie erstmalig eine Expression des Leukotrienrezeptorsystems (BLT-1, BLT-2, CysLT-1, CysLT-2) für das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und die angrenzende nichttransformierte Mukosa nachweisen. Im PEK zeigten sich die Leukotrien-B4- und Cysteinyl-Leukotrienrezeptoren dysreguliert, eine Bedeutung für die Pathogenese dieses Malignoms ist somit anzunehmen. Auch die nichttransformierte Schleimhaut der Karzinompatienten wies bereits Abweichungen der Rezeptorproteinexpression gegenüber Kontrollpatienten ohne Ösophaguspathologie auf. Anhand bisheriger Studien kann ein Stellenwert der Rezeptoren für Proliferations- und Differenzierungsprozesse, sowie Schutzmechanismen im Ösophagusepithel angenommen werden. In der RT-PCR Analyse zeigte sich die Blt-1 und Cyslt-2 Genexpression in der Schleimhaut der Karzinompatienten ähnlich dem PEK dysreguliert. Dies kann als frühzeitiger Nachweis für Veränderungen der mukosalen Expression von Blt-1 und Cyslt-2 im Rahmen der Ösophaguskarzinogenese angesehen werden.

7. Zusammenfassung

Hintergrund: Das Ösophaguskarzinom stellt weltweit die sechst häufigste Ursache malignombedingter Sterblichkeit mit rund 400.000 Toten jährlich dar. Dominierender Subtyp ist das Plattenepithelkarzinom (PEK). Im Gastrointestinaltrakt ist das Leukotrienrezeptorsystem aus Leukotrien-B4-Rezeptoren (BLT-1, BLT-2) und Cysteinyl-Leukotrienrezeptoren (CysLT-1, CysLT-2) mit der Entstehung maligner Tumoren assoziiert worden.

Ziel: Wir beabsichtigten die Expression des Leukotrienrezeptorsystems im PEK und dem nichtmalignen Ösophagusepithel abzuklären.

Methoden: 19 Patienten mit Erstdiagnose eines PEK wurden prospektiv von März 2009 bis Januar 2010 rekrutiert. Eine Kalkulation des UICC Stadiums erfolgte nach TNM-Klassifikation (7. Edition). Es wurden Biopsien aus Karzinom und tumorfreier Ösophagasmukosa (TF) gewonnen. Die Kontrollgruppe (K) entstand aus 9 alters- und geschlechtsgleichen Patienten mit funktioneller Dyspepsie, bei denen Biopsien aus dem distalen Ösophagus entnommen wurden. Immunhistochemie (IHC) und „realtime“-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) erfolgten zur Analyse von BLT-1, BLT-2, CysLT-1 und CysLT-2. Korrelationsanalyse nach Spearman, Friedman-Test, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und Mann-Whitney U-Test kamen zur Anwendung (2-seitig).

Ergebnisse: 11/19 Patienten (58%) befanden sich im UICC Stadium IV, 8/19 (42%) zeigten das Stadium I-III. In der IHC zeigten sich BLT-1/-2 und CysLT-1/-2 sowohl im PEK als auch in der TF und K Mukosa exprimiert. Die RT-PCR Analyse offenbarte in TF für Blt-1 und Cyslt-2 eine Genexpressionsänderung ähnlich dem PEK.

Schlussfolgerung: Eine Dysregulation der Leukotrienrezeptoren im PEK stützt eine Bedeutung dieser für Entstehung und Verlauf des Malignoms. Daneben ist eine physiologische Funktion des Leukotrienrezeptorsystems im nichttransformierten Ösophagusepithel anzunehmen. Eine Expressionsänderung des Blt-1 und Cyslt-2 Gens in TF kann als Nachweis für frühzeitige Schleimhautveränderungen im Prozess der Ösophaguskarzinogenese angesehen werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Alber D, Moussard C, Toubin M, Henry JC, Ottignon Y, Deschamps JP: Gas chromatographic/mass spectrometric quantitative analysis of eicosanoids in human oesophageal mucosa. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 16. 299-304 (1988)
2. Allum WH, Blazeby JM, Griffin SM, Cunningham D, Jankowski JA, Wong R; Association of Upper Gastrointestinal Surgeons of Great Britain and Ireland, the British Society of Gastroenterology and the British Association of Surgical Oncology: Guidelines for the management of oesophageal and gastric cancer. *Gut.* 60. 1449-72 (2011)
3. Amdal CD, Jacobsen AB, Sandstad B, Warloe T, Bjordal K: Palliative brachytherapy with or without primary stent placement in patients with oesophageal cancer, a randomised phase III trial. *Radiother. Oncol.* 107. 428-33 (2013)
4. Amrani Y, Moore PE, Hoffman R, Shore SA, Panettieri RA Jr: Interferon-gamma modulates cysteinyl leukotriene receptor-1 expression and function in human airway myocytes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164. 2098-101 (2001)
5. Appelqvist P, Salmo M: Lye corrosion carcinoma of the esophagus: a review of 63 cases. *Cancer.* 45. 2655-8 (1980)
6. Avis IM, Jett M, Boyle T, Vos MD, Moody T, Treston AM, Martínez A, Mulshine JL: Growth control of lung cancer by interruption of 5-lipoxygenase-mediated growth factor signaling. *J. Clin. Invest.* 97. 806-13 (1996)
7. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G: Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol. Res. Health.* 25. 263-70 (2001)
8. Bareiss D, Stabenow R, Müller R, Eisinger B, Stegmaier C, Däubler P, Zeitz M, Scherübl H: Current epidemiology of carcinoma of the esophagus and cardia in Germany. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 127. 1367-74 (2002)
9. Basson MD, Li GD, Hong F, Han O, Sumpio BE: Amplitude-dependent modulation of brush border enzymes and proliferation by cyclic strain in human intestinal Caco-2 monolayers. *J. Cell Physiol.* 168. 476-88 (1996)
10. Bergquist H, Johnsson E, Nyman J, Rylander H, Hammerlid E, Friesland S, Ejnell H, Lundell L, Ruth M: Combined stent insertion and single high-dose brachytherapy in patients with advanced esophageal cancer--results of a prospective safety study. *Dis. Esophagus.* 25. 410-5 (2012)
11. Besingi W, Johansson A: Smoke-related DNA methylation changes in the etiology of human disease. *Hum. Mol. Genet.* 23. 2290-7 (2014)
12. Bird-Lieberman EL, Fitzgerald RC: Early diagnosis of oesophageal cancer. *Br. J. Cancer.* 101. 1-6 (2009)

13. Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C: Systematic review: primary and secondary prevention of gastrointestinal cancers with antioxidant supplements. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 28. 689-703 (2008)
14. Bosetti C, Gallus S, Peto R, Negri E, Talamini R, Tavani A, Franceschi S, La Vecchia C: Tobacco smoking, smoking cessation, and cumulative risk of upper aerodigestive tract cancers. *Am. J. Epidemiol.* 167. 468-73 (2008)
15. Castellsagué X, Muñoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolón PA: Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. *Int. J. Cancer.* 88. 658-64 (2000)
16. Chen X, Wang S, Wu N, Sood S, Wang P, Jin Z, Beer DG, Giordano TJ, Lin Y, Shih WC, Lubet RA, Yang CS: Overexpression of 5-lipoxygenase in rat and human esophageal adenocarcinoma and inhibitory effects of zileuton and celecoxib on carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* 10. 6703-9 (2004)
17. Chen X, Li N, Wang S, Wu N, Hong J, Jiao X, Krasna MJ, Beer DG, Yang CS: Leukotriene A4 hydrolase in rat and human esophageal adenocarcinomas and inhibitory effects of bestatin. *J. Natl. Cancer Inst.* 95. 1053-61 (2003)
18. Choi JA, Lee JW, Kim H, Kim EY, Seo JM, Ko J, Kim JH: Pro-survival of estrogen receptor-negative breast cancer cells is regulated by a BLT2-reactive oxygen species-linked signaling pathway. *Carcinogenesis.* 31. 543-51. (2010)
19. Choi JA, Kim EY, Song H, Kim C, Kim JH: Reactive oxygen species are generated through a BLT2-linked cascade in Ras-transformed cells. *Free Radic. Biol. Med.* 44. 624-34 (2008)
20. Courrech Staal EF, Aleman BM, Boot H, van Velthuysen ML, van Tinteren H, van Sandick JW: Systematic review of the benefits and risks of neoadjuvant chemoradiation for oesophageal cancer. *Br. J. Surg.* 97. 1482-96 (2010)
21. Dixon RA, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, Gillard JW, Miller DK: Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature.* 343. 282-4 (1990)
22. Early SB, Barekzi E, Negri J, Hise K, Borish L, Steinke JW: Concordant modulation of cysteinyl leukotriene receptor expression by IL-4 and IFN-gamma on peripheral immune cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 36. 715-20 (2007)
23. Enzinger PC, Mayer RJ: Esophageal cancer. *N. Engl. J. Med.* 349. 2241-52 (2003)
24. Espinosa K, Bossé Y, Stankova J, Rola-Pleszczynski M: CysLT1 receptor upregulation by TGF-beta and IL-13 is associated with bronchial smooth muscle cell proliferation in response to LTD4. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111. 1032-40 (2003)
25. Evans NJ, Walker JW: Sustained Ca²⁺ signaling and delayed internalization

associated with endothelin receptor heterodimers linked through a PDZ finger. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 86. 526-35 (2008)

26. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F: GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 25/11/2014.

27. Figueroa DJ, Breyer RM, Defoe SK, Kargman S, Daugherty BL, Waldburger K, Liu Q, Clements M, Zeng Z, O'Neill GP, Jones TR, Lynch KR, Austin CP, Evans JF: Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163. 226-33 (2001)

28. Flamen P, Lerut A, Van Cutsem E, De Wever W, Peeters M, Stroobants S, Dupont P, Bormans G, Hiele M, De Leyn P, Van Raemdonck D, Coosemans W, Ectors N, Haustermans K, Mortelmans L: Utility of positron emission tomography for the staging of patients with potentially operable esophageal carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 18. 3202-10 (2000)

29. Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF, Mouw T, Subar AF, Hollenbeck AR, Schatzkin A: A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes. *Am. J. Epidemiol.* 165. 1424-33 (2007)

30. Folco G, Murphy RC: Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. *Pharmacol. Rev.* 58. 375-88 (2006)

31. Gayer CP, Basson MD: The effects of mechanical forces on intestinal physiology and pathology. *Cell Signal.* 21. 1237-44 (2009)

32. German JB, Dillard CJ, Whelan J: Biological effects of dietary arachidonic acid. Introduction. *J. Nutr.* 126. 1076S-80S (1996)

33. Gholamin M, Moaven O, Memar B, Farshchian M, Naseh H, Malekzadeh R, Sotoudeh M, Rajabi-Mashhadi MT, Forghani MN, Farrokhi F, Abbaszadegan MR: Overexpression and interactions of interleukin-10, transforming growth factor beta, and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *World J. Surg.* 33. 1439-45 (2009)

34. Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC: COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol. Rep.* 62. 233-44 (2010)

35. Gibbs JF, Rajput A, Chadha KS, Douglas WG, Hill H, Nwogu C, Nava HR, Sabel MS: The changing profile of esophageal cancer presentation and its implication for diagnosis. *J. Natl. Med. Assoc.* 99. 620-6 (2007)

36. Giovino GA, Mirza SA, Samet JM, Gupta PC, Jarvis MJ, Bhala N, Peto R, Zatonski W, Hsia J, Morton J, Palipudi KM, Asma S; GATS Collaborative Group: Tobacco use in

- 3 billion individuals from 16 countries: an analysis of nationally representative cross-sectional household surveys. *Lancet*. 380. 668-79 (2012)
37. Grilo A, Santos CA, Fonseca J: Percutaneous endoscopic gastrostomy for nutritional palliation of upper esophageal cancer unsuitable for esophageal stenting. *Arq. Gastroenterol.* 49. 227-31 (2012)
38. Grünberger B, Raderer M, Schmidinger M, Hejna M: Palliative chemotherapy for recurrent and metastatic esophageal cancer. *Anticancer Res.* 27. 2705-14 (2007)
39. Gupta SK, Peters-Golden M, Fitzgerald JF, Croffie JM, Pfefferkorn MD, Molleston JP, Corkins MR, Lim JR: Cysteinyl leukotriene levels in esophageal mucosal biopsies of children with eosinophilic inflammation: are they all the same? *Am. J. Gastroenterol.* 101. 1125-8 (2006)
40. Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Sakamoto K, Bostwick DG, Mukhtar H: Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma. *Cancer.* 91. 737-43 (2001)
41. Hashibe M, Boffetta P, Janout V, Zaridze D, Shangina O, Mates D, Szeszenia-Dabrowska N, Bencko V, Brennan P: Esophageal cancer in Central and Eastern Europe: tobacco and alcohol. *Int. J. Cancer.* 120. 1518-22 (2007)
42. Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL Jr, Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George SR, O'Neill GP, Metters KM, Lynch KR, Evans JF: Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J. Biol. Chem.* 275. 30531-6 (2000)
43. Hennig R, Osman T, Esposito I, Giese N, Rao SM, Ding XZ, Tong WG, Büchler MW, Yokomizo T, Friess H, Adrian TE: BLT2 is expressed in PanINs, IPMNs, pancreatic cancer and stimulates tumour cell proliferation. *Br. J. Cancer.* 99. 1064-73 (2008)
44. Hennig R, Ding XZ, Tong WG, Schneider MB, Standop J, Friess H, Büchler MW, Pour PM, Adrian TE: 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue. *Am. J. Pathol.* 161. 421-8 (2002)
45. Hindy P, Hong J, Lam-Tsai Y, Gress F: A comprehensive review of esophageal stents. *Gastroenterol. Hepatol. (N Y).* 8. 526-34 (2012)
46. Homs MY, Steyerberg EW, Eijkenboom WM, Tilanus HW, Stalpers LJ, Bartelsman JF, van Lanschot JJ, Wijrdeman HK, Mulder CJ, Reinders JG, Boot H, Aleman BM, Kuipers EJ, Siersema PD: Single-dose brachytherapy versus metal stent placement for the palliation of dysphagia from oesophageal cancer: multicentre randomised trial. *Lancet.* 364. 1497-504 (2004)

47. Hoque A, Lippman SM, Wu TT, Xu Y, Liang ZD, Swisher S, Zhang H, Cao L, Ajani JA, Xu XC: Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention. *Carcinogenesis*. 26. 785-91 (2005)
48. Ihara A, Wada K, Yoneda M, Fujisawa N, Takahashi H, Nakajima A: Blockade of leukotriene B4 signaling pathway induces apoptosis and suppresses cell proliferation in colon cancer. *J. Pharmacol. Sci.* 103. 24-32 (2007)
49. Ikeda E, Kojima T, Kaneko K, Minashi K, Onozawa M, Nihei K, Fuse N, Yano T, Yoshino T, Tahara M, Doi T, Ohtsu A: Efficacy of concurrent chemoradiotherapy as a palliative treatment in stage IVB esophageal cancer patients with dysphagia. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 41. 964-72 (2011)
50. Ishiguro S, Sasazuki S, Inoue M, Kurahashi N, Iwasaki M, Tsugane S; JPHC Study Group: Effect of alcohol consumption, cigarette smoking and flushing response on esophageal cancer risk: a population-based cohort study (JPHC study). *Cancer Lett.* 275. 240-6 (2009)
51. Ishikawa A, Kuriyama S, Tsubono Y, Fukao A, Takahashi H, Tachiya H, Tsuji I: Smoking, alcohol drinking, green tea consumption and the risk of esophageal cancer in Japanese men. *J. Epidemiol.* 16. 185-92 (2006)
52. Islami F, Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Jenab M, Scotti L, Rota M, Corrao G, Garavello W, Schüz J, Straif K, Negri E, Boffetta P, La Vecchia C: Alcohol drinking and esophageal squamous cell carcinoma with focus on light-drinkers and never-smokers: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer.* 129. 2473-84 (2011)
53. Islami F, Boffetta P, Ren JS, Pedoeim L, Khatib D, Kamangar F: High-temperature beverages and foods and esophageal cancer risk - a systematic review. *Int. J. Cancer.* 125. 491-524 (2009a)
54. Islami F, Kamangar F, Nasrollahzadeh D, Aghcheli K, Sotoudeh M, Abedi-Ardekani B, Merat S, Nasseri-Moghaddam S, Semnani S, Sepehr A, Wakefield J, Møller H, Abnet CC, Dawsey SM, Boffetta P, Malekzadeh R: Socio-economic status and oesophageal cancer: results from a population-based case-control study in a high-risk area. *Int. J. Epidemiol.* 38. 978-88 (2009b)
55. Iizuka Y, Okuno T, Saeki K, Uozaki H, Okada S, Misaka T, Sato T, Toh H, Fukayama M, Takeda N, Kita Y, Shimizu T, Nakamura M, Yokomizo T: Protective role of the leukotriene B4 receptor BLT2 in murine inflammatory colitis. *FASEB J.* 24. 4678-90 (2010)
56. Jankowski J, Hopwood D, Doherty R, Wormsley KG: Development and growth of normal; metaplastic and dysplastic oesophageal mucosa: biological markers of neoplasia. *European J. Gastroent. & Hepatology.* 5. 235-46 (1993)
57. Javle M, Ailawadhi S, Yang GY, Nwogu CE, Schiff MD, Nava HR: Palliation of

- malignant dysphagia in esophageal cancer: a literature-based review. *J. Support. Oncol.* 4. 365-73 (2006)
58. Jayaprakash V, Marshall JR: Selenium and other antioxidants for chemoprevention of gastrointestinal cancers. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 25. 507-18 (2011)
59. Jessri M, Rashidkhani B, Hajizadeh B, Jessri M, Kreiger N, Bajdik CD: Adherence to dietary recommendations and risk of esophageal squamous cell carcinoma: a case-control study in Iran. *Ann. Nutr. Metab.* 59. 166-75 (2011)
60. Jiang Y, Borrelli LA, Kanaoka Y, Bacskai BJ, Boyce JA: CysLT2 receptors interact with CysLT1 receptors and down-modulate cysteinyl leukotriene dependent mitogenic responses of mast cells. *Blood.* 110. 3263-70 (2007)
61. Jin M, Cai S, Guo J, Zhu Y, Li M, Yu Y, Zhang S, Chen K: Alcohol drinking and all cancer mortality: a meta-analysis. *Ann. Oncol.* 24. 807-16 (2013)
62. Jones R, Latinovic R, Charlton J, Gulliford MC: Alarm symptoms in early diagnosis of cancer in primary care: cohort study using General Practice Research Database. *BMJ.* 334. 1040 (2007)
63. Jung M: Mucosectomy as sufficient therapy for early squamous cell. *Chirurg.* 76. 1018-24 (2005)
64. Kamangar F, Schantz MM, Abnet CC, Fagundes RB, Dawsey SM: High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17. 1262-8 (2008)
65. Kapoor N, Bassi A, Sturgess R, Bodger K: Predictive value of alarm features in a rapid access upper gastrointestinal cancer service. *Gut.* 54. 40-5 (2005)
66. Kato K, Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T: Cell-specific transcriptional regulation of human leukotriene B(4) receptor gene. *J. Exp. Med.* 192. 413-20 (2000)
67. Kim H, Choi JA, Kim JH: Ras promotes transforming growth factor- β (TGF- β)-induced epithelial-mesenchymal transition via a leukotriene B4 receptor-2-linked cascade in mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 289. 22151-60 (2014)
68. Kim H, Park GS, Lee JE, Kim JH: A leukotriene B4 receptor-2 is associated with paclitaxel resistance in MCF-7/DOX breast cancer cells. *Br. J. Cancer.* 109. 351-9 (2013)
69. Kim H, Choi JA, Park GS, Kim JH: BLT2 up-regulates interleukin-8 production and promotes the invasiveness of breast cancer cells. *PLoS One.* 7. e49186 (2012)
70. Kim EY, Seo JM, Kim C, Lee JE, Lee KM, Kim JH: BLT2 promotes the invasion and metastasis of aggressive bladder cancer cells through a reactive oxygen species-linked pathway. *Free Radic. Biol. Med.* 49. 1072-81 (2010)

71. Kim EY, Seo JM, Cho KJ, Kim JH: Ras-induced invasion and metastasis are regulated by a leukotriene B4 receptor BLT2-linked pathway. *Oncogene*. 29. 1167-78 (2010)
72. Kim GY, Lee JW, Cho SH, Seo JM, Kim JH: Role of the low-affinity leukotriene B4 receptor BLT2 in VEGF-induced angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29. 915-20 (2009)
73. Kramer RM, Sharp JD: Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). *FEBS Lett.* 410. 49-53 (1997)
74. Kranzfelder M, Schuster T, Geinitz H, Friess H, Büchler P: Meta-analysis of neoadjuvant treatment modalities and definitive non-surgical therapy for oesophageal squamous cell cancer. *Br. J. Surg.* 98. 768-83 (2011)
75. Lee JW, Kim JH: Activation of the leukotriene B4 receptor 2-reactive oxygen species (BLT2-ROS) cascade following detachment confers anoikis resistance in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 288. 30054-63 (2013)
76. Lee JW, Kim GY, Kim JH: Androgen receptor is up-regulated by a BLT2-linked pathway to contribute to prostate cancer progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420. 428-33 (2012)
77. Leeuwenburgh I, Scholten P, Alderliesten J, Tilanus HW, Looman CW, Steijgerberg EW, Kuipers EJ: Long-term esophageal cancer risk in patients with primary achalasia: a prospective study. *Am. J. Gastroenterol.* 105. 2144-9 (2010)
78. Li N, Sood S, Wang S, Fang M, Wang P, Sun Z, Yang CS, Chen X: Overexpression of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase 2 in hamster and human oral cancer and chemopreventive effects of zileuton and celecoxib. *Clin. Cancer Res.* 11. 2089-96 (2005)
79. Lopes AB, Fagundes RB: Esophageal squamous cell carcinoma - precursor lesions and early diagnosis. *World J. Gastrointest. Endosc.* 4. 9-16 (2012)
80. Lubin JH, Cook MB, Pandeya N, Vaughan TL, Abnet CC, Giffen C, Webb PM, Murray LJ, Casson AG, Risch HA, Ye W, Kamangar F, Bernstein L, Sharp L, Nyrén O, Gammon MD, Corley DA, Wu AH, Brown LM, Chow WH, Ward MH, Freedman ND, Whitman DC: The importance of exposure rate on odds ratios by cigarette smoking and alcohol consumption for esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in the Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma Consortium. *Cancer Epidemiol.* 36. 306-16 (2012)
81. Lv J, Cao XF, Zhu B, Ji L, Tao L, Wang DD: Long-term efficacy of perioperative chemoradiotherapy on esophageal squamous cell carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 16. 1649-54 (2010)

82. Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateaufneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL Jr, Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, Evans JF: Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature*. 399. 789-93 (1999)
83. Magnusson C, Liu J, Ehrnström R, Manjer J, Jirstrom K, Andersson T, Sjölander A: Cysteinyl leukotriene receptor expression pattern affects migration of breast cancer cells and survival of breast cancer patients. *Int. J. Cancer*. 129. 9-22 (2011)
84. Magnusson C, Bengtsson AM, Liu M, Liu J, Ceder Y, Ehrnström R, Sjölander A: Regulation of cysteinyl leukotriene receptor 2 expression--a potential anti-tumor mechanism. *PLoS One*. 6. e29060 (2011)
85. Magnusson C, Mezhybovska M, Lörinc E, Fernebro E, Nilbert M, Sjölander A: Low expression of CysLT1R and high expression of CysLT2R mediate good prognosis in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer*. 46. 826-35 (2010)
86. Magnusson C, Ehrnström R, Olsen J, Sjölander A: An increased expression of cysteinyl leukotriene 2 receptor in colorectal adenocarcinomas correlates with high differentiation. *Cancer Res*. 67. 9190-8 (2007)
87. Marian E, Baraldo S, Visentin A, Papi A, Saetta M, Fabbri LM, Maestrelli P: Up-regulated membrane and nuclear leukotriene B4 receptors in COPD. *Chest*. 129. 1523-30 (2006)
88. Marjani HA, Biramijamal F, Rakhshani N, Hossein-Nezhad A, Malekzadeh R: Investigation of NQO1 genetic polymorphism, NQO1 gene expression and PAH-DNA adducts in ESCC. A case-control study from Iran. *Genet. Mol. Res*. 9. 239-49 (2010)
89. Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P, Pelletier JP: Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann. Rheum. Dis*. 62. 501-9 (2003)
90. Massoumi R, Nielsen CK, Azemovic D, Sjölander A: Leukotriene D4-induced adhesion of Caco-2 cells is mediated by prostaglandin E2 and upregulation of alpha2beta1-integrin. *Exp. Cell Res*. 289. 342-51 (2003)
91. Matsuoka T, Narumiya S: Prostaglandin receptor signaling in disease. *Scientific World Journal*. 7. 1329-47 (2007)
92. Matsuyama M, Yoshimura R: Cysteinyl-leukotriene1 receptor is a potent target for the prevention and treatment of human urological cancer. *Mol. Med. Rep*. 3. 245-51 (2010)
93. Matuschek C, Bölke E, Zahra T, Knoefel WT, Peiper M, Budach W, Erhardt A, Scherer A, Baldus SE, Gerber PA, Buhren BA, Schauer M, Hoff NP, Gattermann N, Orth K: Trimodal therapy in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Eur. J. Med.*

Res. 16. 437-44 (2011)

94. Melstrom LG, Bentrem DJ, Salabat MR, Kennedy TJ, Ding XZ, Strouch M, Rao SM, Witt RC, Ternent CA, Talamonti MS, Bell RH, Adrian TA: Overexpression of 5-lipoxygenase in colon polyps and cancer and the effect of 5-LOX inhibitors in vitro and in a murine model. *Clin. Cancer Res.* 14. 6525-30 (2008)

95. Meng XY, Zhu ST, Zong Y, Wang YJ, Li P, Zhang ST: Promoter hypermethylation of cyclooxygenase-2 gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus.* 24. 444-9 (2011)

96. Miyazaki M, Ohno S, Futatsugi M, Saeki H, Ohga T, Watanabe M: The relation of alcohol consumption and cigarette smoking to the multiple occurrence of esophageal dysplasia and squamous cell carcinoma. *Surgery.* 131. S7-S13 (2002)

97. Mönkemüller K, Wex T, Kuester D, Fry LC, Peitz U, Beyer M, Roessner A, Malfertheiner P: Interleukin-1beta and interleukin-8 expression correlate with the histomorphological changes in esophageal mucosa of patients with erosive and non-erosive reflux disease. *Digestion.* 79. 186-95 (2009)

98. Mühr-Wilkenshoff F, Stahl M, Faiss S, Zeitz M, Scherübl H: Current diagnosis and therapy of esophageal carcinoma. *Z Gastroenterol.* 42. 615-21 (2004)

99. Nakamura M, Shimizu T: Leukotriene receptors. *Chem. Rev.* 11. 6231-98 (2011)

100. Nielsen CK, Campbell JI, Ohd JF, Mörgelin M, Riesbeck K, Landberg G, Sjölander A: A novel localization of the G-protein-coupled CysLT1 receptor in the nucleus of colorectal adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 65. 732-42 (2005)

101. Novacek G: Plummer-Vinson syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* 1. 36 (2006)

102. Ohd JF, Nielsen CK, Campbell J, Landberg G, Löfberg H, Sjölander A: Expression of the leukotriene D4 receptor CysLT1, COX-2, and other cell survival factors in colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology.* 124. 57-70 (2003)

103. Okuno T, Iizuka Y, Okazaki H, Yokomizo T, Taguchi R, Shimizu T: 12(S)-Hydroxyheptadeca-5Z, 8E, 10E-trienoic acid is a natural ligand for leukotriene B4 receptor 2. *J. Exp. Med.* 205. 759-66 (2008)

104. Parhamifar L, Sime W, Yudina Y, Vilhardt F, Mörgelin M, Sjölander A: Ligand-induced tyrosine phosphorylation of cysteinyl leukotriene receptor 1 triggers internalization and signaling in intestinal epithelial cells. *PLoS One.* 5. e14439 (2010)

105. Park GS, Kim JH: Myeloid differentiation primary response gene 88-leukotriene B4 receptor 2 cascade mediates lipopolysaccharide-potentiated invasiveness of breast cancer cells. *Oncotarget.* 6. 5749-59 (2015)

106. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS: Cancer burden in the year 2000. The global

- picture. *Eur. J. Cancer.* 37 S8. S4-66 (2001)
107. Paruchuri S, Mezhybovska M, Juhas M, Sjölander A: Endogenous production of leukotriene D4 mediates autocrine survival and proliferation via CysLT1 receptor signalling in intestinal epithelial cells. *Oncogene.* 25. 6660-5 (2006)
108. Paruchuri S, Broom O, Dib K, Sjölander A: The pro-inflammatory mediator leukotriene D4 induces phosphatidylinositol 3-kinase and Rac-dependent migration of intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 280. 13538-44 (2005)
109. Paruchuri S, Sjölander A: Leukotriene D4 mediates survival and proliferation via separate but parallel pathways in the human intestinal epithelial cell line Int 407. *J. Biol. Chem.* 278. 45577-85 (2003)
110. Peters-Golden M, Henderson WR Jr: Leukotrienes. *N. Engl. J. Med.* 357. 1841-54 (2007)
111. Peters-Golden M, Brock TG: 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 69. 99-109 (2003)
112. Pettersson A, Sabirsh A, Bristulf J, Kidd-Ljunggren K, Ljungberg B, Owman C, Karlsson U: Pro- and anti-inflammatory substances modulate expression of the leukotriene B4 receptor, BLT1, in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 77. 1018-25 (2005)
113. Polkowski M: Endosonographic staging of upper intestinal malignancy. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 23. 649-61 (2009)
114. Pultrum BB, van Westreenen HL, Mulder NH, van Dullemen HM, Plukker JT: Outcome of palliative care regimens in patients with advanced oesophageal cancer detected during explorative surgery. *Anticancer Res.* 26. 2289-93 (2006)
115. Pöttgen C, Stuschke M: Radiotherapy versus surgery within multimodality protocols for esophageal cancer--a meta-analysis of the randomized trials. *Cancer Treat. Rev.* 38. 599-604 (2012)
116. Qiu H, Johansson AS, Sjöström M, Wan M, Schröder O, Palmblad J, Haeggström JZ: Differential induction of BLT receptor expression on human endothelial cells by lipopolysaccharide, cytokines, and leukotriene B4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103. 6913-8 (2006)
117. Quint LE, Bogot NR: Staging esophageal cancer. *Cancer Imaging.* 8. S33-42 (2008)
118. Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B: 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem. Sci.* 32. 332-41 (2007)
119. Raijman I, Siddique I, Ajani J, Lynch P: Palliation of malignant dysphagia and

- fistulae with coated expandable metal stents: experience with 101 patients. *Gastrointest. Endosc.* 48. 172-9 (1998)
120. Rocconi RP, Kirby TO, Seitz RS, Beck R, Straughn JM Jr, Alvarez RD, Huh WK: Lipoxygenase pathway receptor expression in ovarian cancer. *Reprod. Sci.* 15. 321-6 (2008)
121. Roshandel G, Semnani S, Malekzadeh R, Dawsey SM: Polycyclic aromatic hydrocarbons and esophageal squamous cell carcinoma. *Arch. Iran. Med.* 15. 713-22 (2012)
122. Saif MW, Oettle H, Vervenne WL, Thomas JP, Spitzer G, Visseren-Grul C, Enas N, Richards DA: Randomized double-blind phase II trial comparing gemcitabine plus LY293111 versus gemcitabine plus placebo in advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer J.* 15. 339-43 (2009)
123. Savari S, Liu M, Zhang Y, Sime W, Sjölander A: CysLT(1)R antagonists inhibit tumor growth in a xenograft model of colon cancer. *PLoS One.* 8. e73466 (2013)
124. Seegers BA, Andriessen MP, van Hooijdonk CA, de Bakker ES, van Vlijmen-Willems IM, Parker GL, van Erp PE, van de Kerkhof PC: Pharmacological effects of a specific leukotriene B(4) receptor antagonist (VML 295) on blood leukocytes, cutaneous inflammation and epidermal proliferation. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 13. 75-85 (2000)
125. Seery JP, Watt FM: Asymmetric stem-cell divisions define the architecture of human oesophageal epithelium. *Curr. Biol.* 10. 1447-50 (2000)
126. Seo JM, Park S, Kim JH: Leukotriene B4 receptor-2 promotes invasiveness and metastasis of ovarian cancer cells through signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)-dependent up-regulation of matrix metalloproteinase 2. *J. Biol. Chem.* 287. 13840-9 (2012)
127. Seo JM, Cho KJ, Kim EY, Choi MH, Chung BC, Kim JH: Up-regulation of BLT2 is critical for the survival of bladder cancer cells. *Exp. Mol. Med.* 43. 129-37 (2011)
128. Shi HY, Lv FJ, Zhu ST, Wang QG, Zhang ST: Dual inhibition of 5-LOX and COX-2 suppresses esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 309. 19-26 (2011)
129. Siewert JR, Feith M, Stein HJ: Esophagectomy as therapeutic principle for squamous cell esophageal cancer. *Chirurg.* 76. 1033-43 (2005)
130. Singh RK, Gupta S, Dastidar S, Ray A: Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology.* 85. 336-49 (2010)
131. Sjoquist KM, Burmeister BH, Smithers BM, Zalberg JR, Simes RJ, Barbour A, GebSKI V; Australasian Gastro-Intestinal Trials Group: Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated

- meta-analysis. *Lancet Oncol.* 12. 681-92 (2011)
132. Soumaoro LT, Iida S, Uetake H, Ishiguro M, Takagi Y, Higuchi T, Yasuno M, Enomoto M, Sugihara K: Expression of 5-lipoxygenase in human colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 12. 6355-60 (2006)
133. Spencer AU, Sun X, El-Sawaf M, Haxhija EQ, Brei D, Luntz J, Yang H, Teitelbaum DH: Enterogenesis in a clinically feasible model of mechanical small-bowel lengthening. *Surgery.* 140. 212-20 (2006)
134. Steevens J, Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA: Alcohol consumption, cigarette smoking and risk of subtypes of oesophageal and gastric cancer: a prospective cohort study. *Gut.* 59. 39-48 (2010)
135. Stein BE, Schwartzman ML, Carroll MA, Stahl RE, Rosenthal WS: Role of arachidonic acid metabolites in acid-pepsin injury to rabbit esophagus. *Gastroenterology.* 97. 278-83 (1989)
136. Steinmetz KA, Potter JD: Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control.* 2. 325-57 (1991)
137. Thivierge M, Stankova J, Rola-Pleszczynski M: Cysteinyl-leukotriene receptor type 1 expression and function is down-regulated during monocyte-derived dendritic cell maturation with zymosan: involvement of IL-10 and prostaglandins. *J. Immunol.* 183. 6778-87 (2009)
138. Thivierge M, Stanková J, Rola-Pleszczynski M: IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 167. 2855-60 (2001)
139. Thivierge M, Doty M, Johnson J, Stanková J, Rola-Pleszczynski M: IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. *J. Immunol.* 165. 5221-6 (2000)
140. Tong WG, Ding XZ, Hennig R, Witt RC, Standop J, Pour PM, Adrian TE: Leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 8. 3232-42 (2002)
141. Tong WG, Ding XZ, Witt RC, Adrian TE: Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol. Cancer Ther.* 1. 929-35 (2002)
142. van Vliet EP, Heijenbrok-Kal MH, Hunink MG, Kuipers EJ, Siersema PD: Staging investigations for oesophageal cancer: a meta-analysis. *Br. J. Cancer.* 98. 547-57 (2008)
143. Varela AB, Blanco Rodríguez MM, Boullosa PE, Silva JG: Tylosis A with squamous cell carcinoma of the oesophagus in a Spanish family. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 23. 286-8 (2011)

144. Venerito M, Kohrs S, Wex T, Adolf D, Kuester D, Schubert D, Peitz U, Mönkemüller K, Malfertheiner P: Helicobacter pylori infection and fundic gastric atrophy are not associated with esophageal squamous cell carcinoma: a case-control study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 23. 859-64 (2011)
145. Venerito M, Kuester D, Harms C, Schubert D, Wex T, Malfertheiner P: Upregulation of leukotriene receptors in gastric cancer. *Cancers (Basel).* 3. 3156-68 (2011)
146. Venerito M, Kuester D, Wex T, Roessner A, Malfertheiner P, Treiber G: The long-term effect of Helicobacter pylori eradication on COX-1/2, 5-LOX and leukotriene receptors in patients with a risk gastritis phenotype--a link to gastric carcinogenesis. *Cancer Lett.* 270. 218-28 (2008)
147. Wada K, Arita M, Nakajima A, Katayama K, Kudo C, Kamisaki Y, Serhan CN: Leukotriene B4 and lipoxin A4 are regulatory signals for neural stem cell proliferation and differentiation. *FASEB J.* 20. 1785-92 (2006)
148. Wang D, Dubois RN: Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 10. 181-93 (2010)
149. Wasilewicz MP, Kołodziej B, Bojułko T, Kaczmarczyk M, Sulzyc-Bielicka V, Bielicki D, Ciepela K: Overexpression of 5-lipoxygenase in sporadic colonic adenomas and a possible new aspect of colon carcinogenesis. *Int. J. Colorectal. Dis.* 25. 1079-85 (2010)
150. Wittekind C., Meyer H.J.: TNM: Klassifikation maligner Tumoren. pp. 63-68. Wiley-Blackwell 2010
151. Wolf MC, Stahl M, Krause BJ, Bonavina L, Bruns C, Belka C, Zehentmayr F: Curative treatment of oesophageal carcinoma: current options and future developments. *Radiat. Oncol.* 6. 55 (2011)
152. Wong SK, Chiu PW, Leung SF, Cheung KY, Chan AC, Au-Yeung AC, Griffith JF, Chung SS, Ng EK: Concurrent chemoradiotherapy or endoscopic stenting for advanced squamous cell carcinoma of esophagus: a case-control study. *Ann. Surg. Oncol.* 15. 576-82 (2008)
153. Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T: A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J. Exp. Med.* 192. 421-32 (2000)
154. Yokomizo T, Kato K, Hagiya H, Izumi T, Shimizu T: Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B4 receptor, BLT2. *J. Biol. Chem.* 276. 12454-9 (2001)
155. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T: A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature.* 387. 620-4 (1997)

156. Yokota Y, Inoue H, Matsumura Y, Nabeta H, Narusawa M, Watanabe A, Sakamoto C, Hijikata Y, Iga-Murahashi M, Takayama K, Sasaki F, Nakanishi Y, Yokomizo T, Tani K: Absence of LTB₄/BLT1 axis facilitates generation of mouse GM-CSF-induced long-lasting antitumor immunologic memory by enhancing innate and adaptive immune systems. *Blood*. 120. 3444-54 (2012)
157. Yoo MH, Song H, Woo CH, Kim H, Kim JH: Role of the BLT2, a leukotriene B4 receptor, in Ras transformation. *Oncogene*. 23. 9259-68 (2004)
158. Yudina Y, Parhamifar L, Bengtsson AM, Juhas M, Sjölander A: Regulation of the eicosanoid pathway by tumour necrosis factor alpha and leukotriene D4 in intestinal epithelial cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 79. 223-31 (2008)
159. Zeilinger S, Kühnel B, Klopp N, Baurecht H, Kleinschmidt A, Gieger C, Weidinger S, Lattka E, Adamski J, Peters A, Strauch K, Waldenberger M, Illig T: Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS One*. 8. e63812 (2013)
160. Zhi H, Zhang J, Hu G, Lu J, Wang X, Zhou C, Wu M, Liu Z: The deregulation of arachidonic acid metabolism-related genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*. 106. 327-33 (2003)

9. Danksagung

Großer Dank gilt Herrn Dr. med. Marino Venerito für die Bereitstellung des Themas und der damit verbundenen Betreuung, von den ersten Schritten bis zum Abschluss. Bei Fragen und aufkommenden Problemen war er stets erreichbar und engagiert, seine Erfahrung und seine Ratschläge waren ein ständiger Rückhalt. Zurückblickend weiß ich seine Bemühungen zu schätzen, mich das Ziel nicht aus den Augen verlieren zu lassen.

Insbesondere danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Peter Malfertheiner, für die Möglichkeit in seiner Universitätseinrichtung diese Dissertation verfasst haben zu dürfen. Honorieren will ich dabei besonders die an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie bestehende Atmosphäre für Doktoranden, die von Vertrauen und Wertschätzung, sowie damit einhergehenden Freiheiten gekennzeichnet ist.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Wex bedanken. Seine Erfahrung und seine Diskussionsbereitschaft waren eine stete, wertvolle Bereicherung.

Zusätzlicher Dank gebührt ebenfalls Frau OÄ Dr. med. Dörthe Jechorek aus dem Institut für Pathologie für die erbrachten Hilfeleistungen. Ebenfalls möchte ich hiermit allen beteiligten Mitarbeitern am Institut meinen Dank aussprechen.

Danken möchte ich ebenfalls Frau Ursula Stolz, Marion Holley, Simone Philipsen und Ingrid Bierwirth für die Anleitung und Hilfe bei der Laborarbeit, sowie den offenen, kollegialen Umgang miteinander.

Am meisten danken möchte ich an dieser Stelle meiner Familie und meinen Freunden. Ohne ihren ständigen Rückhalt, ihre Unterstützung und ihr Verständnis wäre für mich sicherlich sehr vieles unerreichbar geblieben. Durch ihren ständigen Zuspruch gaben sie mir die nötige Kraft und das nötige Selbstvertrauen.

10. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Expressionsanalyse der Leukotrienrezeptoren im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus“

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektionologie (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Peter Malfertheiner) mit Unterstützung durch Dr. med. Marino Venerito

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Unterschrift

11. Darstellung des Bildungsweges

<i>Name</i>	Christoph Helmke
<i>geboren</i>	1. Juni 1985
<i>Geburtsort</i>	Haldensleben
<i>wohnhaf</i>	Hansapark 4, 39116 Magdeburg
<i>Ausbildung</i>	seit 05/2012. Assistenzarztweiterbildung in der Inneren Medizin an der Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Diabetologie und Endokrinologie, Universitätsklinikum Magdeburg, Direktor Prof. Peter R Mertens 2011. Approbation als Arzt, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg 2005. Beginn des Studiums Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg 2004. Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife am Freiherr-vom-Stein Gymnasium Weferlingen, Sachsen-Anhalt

12. Anhang

OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT MAGDEBURG
Ethik-Kommission

der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät
und am Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.
Vorsitzender: Prof. Dr. med. D. Krause



Universitätsklinikum • Leipziger Straße 44 • D-39120 Magdeburg

Herrn Prof. Dr. Malfertheiner, OA Mönkemüller, PD Wex, Dr. Venerito
Universitätsklinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.
Leipziger Straße 44
39120 Magdeburg

Tel.
(0391) 6714314
6714344

Fax
(0391) 6714354
67290185

eMail
norbert.beck@med.ovgu.de
ethikkommission@ovgu.de

Datum

16.06.2008

Unser Zeichen: 34/08

Bedeutung eines 5-Lipoxygenase/Leukotriene Rezeptorsystems für die Entstehung von Karzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes

Sehr geehrter Herr Prof. Malfertheiner, sehr geehrte Herren OA Mönkemüller, PD Wex und Dr. Venerito,

die Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg hat die übergebenen Unterlagen zur o. g. Studie überprüft, in der letzten Kommissionssitzung eingehend erörtert und ist zu der Auffassung gekommen, dass gegen die Durchführung keine ethischen Bedenken bestehen. Diese **zustimmende Bewertung** ergeht unter dem Vorbehalt gleichbleibender Gegebenheiten.

Die Verantwortlichkeit des jeweiligen Prüfwissenschaftlers / behandelnden Prüfarztes bleibt in vollem Umfang erhalten und wird durch diese Entscheidung nicht berührt. Alle zivil- oder haftungsrechtlichen Folgen, die sich ergeben könnten, verbleiben uneingeschränkt beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern.

Beim Monitoring sind die Bestimmungen des Bundes- und Landesdatenschutzgesetzes sowie die sich aus der ärztlichen Schweigepflicht ergebenden Einschränkungen zu beachten, was eine Aushändigung kompletter Patientenakten zum Monitoring ausschließt. Ein Monitoring personen- und studienbezogener Daten wird dadurch nicht beeinträchtigt.

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. med. D. Krause
Vorsitzender der Ethik-Kommission

ETHIK-KOMMISSION
der Otto-von-Guericke-Universität
an der Medizinischen Fakultät
Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med. D. Krause
Leipziger Str. 44
D-39120 Magdeburg

Anlage zum Votum der Studie 34/08 vom 16.06.2008

Zum Zeitpunkt der Bewertung der vorstehenden Studie waren folgende Damen und Herren Mitglied der Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg:

Herr Prof. Dr. Bannert	Medizinische Fakultät, Zentrum für Kinderheilkunde
Herr Prof. Dr. Behrens-Baumann	Medizinische Fakultät, Universitätsklinik für Augenheilkunde
Herr Prof. Dr. Huth	Medizinische Fakultät, Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie
Frau Prof. Dr. Kielstein	Medizinische Fakultät, Klinik für Innere Medizin
Herr Prof. Dr. Läuter	Medizinische Fakultät, Institut für Biometrie und Medizinische Informatik
Herr Prof. Dr. Lohmann	Fakultät Geistes-, Sozial- und Erziehungs- wissenschaften, Institut für Philosophie
Herr Prof. Dr. Meyer	Medizinische Fakultät, Institut für Klinische Pharmakologie
Herr Prof. Dr. Müller	Fakultät Naturwissenschaften, Institut für Experimentelle Physik
Herr Prof. Dr. Rose	Fakultät für Elektrotechnik und Informations- technik, Institut für Elektronik, Signalverarbeitung und Kommunikationstechnik
Herr Prof. Dr. Krause	Medizinische Fakultät, Institut für Rechtsmedizin

Mitglieder der Ethik-Kommission, die in eine Studie eingebunden sind, haben für die Votierung der betreffenden Studie kein Stimmrecht.

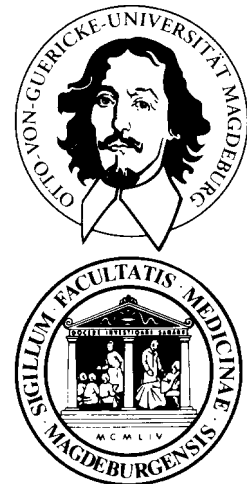
Die Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg ist unter Beachtung entsprechender internationaler Richtlinien (ICH, GCP) tätig, nach Landesrecht (Hochschulgesetz des Landes Sachsen-Anhalt § 80, Abs. 3; Hochschulmedizingesetz des Landes Sachsen-Anhalt § 1 Abs. 4) legitimiert und beim Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte gemäß § 20 Abs. 8 des Medizinproduktegesetzes registriert. Weiterhin besteht eine Registrierung der Ethik-Kommission beim Bundesamt für Strahlenschutz nach § 28g Röntgenverordnung (EK-043/R) und § 92 Strahlenschutzverordnung (EK-046/S) sowie beim Office for Human Research Protections, reg. no. IRB00006099, Rockville, MD, U.S.A..

Dr. med. Norbert Beck
Geschäftsführer der Ethik-Kommission

OTTO - VON - GUERICKE - UNIVERSITÄT Magdeburg

Medizinische Fakultät
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und
Infektiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Peter **Malferteiner**
Leipziger Straße 44
D-39120 Magdeburg



Patienteninformation Studientitel:

Bedeutung des 5-Lipoxygenase/Leukotriene Rezeptorsystems für die Entstehung Karzinome des oberen Magendarmtraktes (inkl. Speiseröhre)

Sehr geehrte Frau/Sehr geehrter Herr

sie haben die Möglichkeit an einem Forschungsvorhaben (Studie) teilzunehmen, die an unserer Klinik durchgeführt wird. Bevor Sie sich für eine Teilnahme entscheiden, ist es wichtig zu verstehen, warum diese Studie durchgeführt wird, welche Behandlung und welche Diagnostik durchgeführt werden. Wir möchten Sie im Folgenden auch über den Nutzen und die möglichen Risiken informieren. Bitte nehmen Sie sich Zeit, die folgenden Informationen sorgfältig zu lesen und eventuell offene Fragen mit dem betreuenden Arzt zu klären.

1. Was ist der Hintergrund und das Ziel der Studie?

Ihre Symptome deuten auf eine Krebskrankheit des oberen Magendarmtraktes (inklusive Speiseröhre) hin. Dabei handelt es sich um eine Erkrankung, die durch verschiedene, zum Teil nicht vollständig untersuchte Faktoren verursacht wurde. Um die Entstehung von Krebskrankheiten zu verstehen sind Studien an Patienten notwendig.

Im Rahmen dieser Studie soll die Bedeutung des aus der Behandlung des Asthma bronchiale bekannten 5-Lipoxygenase/Leukotriene-Rezeptorsystems für die Entstehung von Karzinomen des oberen Magendarmtraktes untersucht werden.

Neben der Erfassung ihrer Beschwerden sind eine Spiegelung der Speiseröhre, des Magens und Zwölffingerdarmes (Endoskopie) mit Probenentnahme aus dem Tumor und aus der Magenschleimhaut, sowie eine Blutentnahme für weitere Laboruntersuchungen geplant. Die Gewebeproben werden auf Komponenten des 5-Lipoxygenase/Leukotriene-Rezeptorsystems untersucht.

Eine Infektion des Magens mit *H. pylori* spielt eine wesentliche Rolle in der Entstehung des Magenkrebs. In dieser Studie wird die Rolle der *H. pylori*-Infektion auch für die Entstehung anderer Karzinome des oberen Magendarmtraktes, d. h. Speiseröhrenkrebs und Krebs im Übergangsbereich von der Speiseröhre zum Magen untersucht. Das Vorhandensein einer *H. pylori*-Infektion im Magen wird durch eine Gewebeprobe- und eine Blutentnahme überprüft.

Interleukin-1 β ist ein Molekül, das eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen spielt.

Bestehen Veränderungen (Polymorphismen) des *Interleukin-1 β* -Gens, so ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, Magenkrebs zu entwickeln. In dieser Studie wird untersucht, ob Polymorphismen des *Interleukin-1 β* -Gens eine Rolle auch in der Entstehung von anderen Krebs des oberen Magendarmtraktes spielen. Für diese Untersuchung ist eine zusätzliche Blutentnahme erforderlich.

2. Ist die Teilnahme an der Studie notwendig?

Ihre Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Sie können die Teilnahme verweigern oder sich jederzeit für eine Beendigung ohne Angabe von Gründen entscheiden. Dies wird den weiteren Behandlungsstandard nicht beeinflussen. Sie werden mit oder ohne Teilnahme die bestmögliche Therapie erhalten. Wenn Sie sich für die Teilnahme entscheiden, bitten wir Sie, das anliegende Patienteneinverständnisformular zu unterschreiben.

3. Welche Behandlung wird mich bei Teilnahme an der Studie erwarten?

Im Rahmen der Diagnostik wird bei Ihnen eine Endoskopie durchgeführt. Hierbei wird das lokale Ausmaß der Krebserkrankung festgestellt. Während dieser Untersuchung werden Gewebeprobe aus dem Tumor sowie aus der Speiseröhre und aus dem Magen entnommen (Routineproben sowie jeweils 4 zusätzliche Proben). Nach Abschluss dieser Untersuchung sind keine weiteren Untersuchungen oder Probenentnahmen im Rahmen der Studie erforderlich und Sie werden zukünftig durch unsere Klinik bzw. ihren Hausarzt weiter medizinisch betreut.

4. Was sind die möglichen Nebenwirkungen und Risiken der Studienteilnahme?

Es bestehen die allgemeinen Risiken einer Spiegelung des oberen Magendarmtraktes. Medikamente werden Ihnen für diese Studie nicht verabreicht.

5. Wird die gewonnene Information vertraulich behandelt?

Die in dieser Studie erhobenen Daten werden statistisch ausgewertet, nachdem die Daten komplett anonymisiert wurden, d.h. eine Zuordnung von Untersuchungsbefund zur Person nur noch dem Studienleiter und keinen außenstehenden Personen möglich ist. Somit haben nur Ärzte und Schwestern unserer Abteilung Zugang zu Ihren persönlichen Daten, die selbstverständlich der Schweigepflicht unterliegen. Die Studienergebnisse werden in der medizinischen Literatur veröffentlicht, jedoch ohne dass die Identität der Studienteilnehmer zu erkennen ist.

6. Was sind die Kosten der Studienteilnahme?

Kosten entstehen für Sie nicht. Es sind keine Visiten und Untersuchungen eingeplant, die nicht für die Behandlung Ihrer Erkrankung als notwendig erachtet werden.

7. Schadensersatz

Sollte durch die Studienteilnahme ein Schaden für Sie entstehen, was nicht zu erwarten ist, werden eventuelle Entschädigungsansprüche im Rahmen der gesetzlichen Haftpflichtversicherung des Klinikums reguliert.

8. Mit wem sollte ich Kontakt aufnehmen, um weitere Informationen oder Hilfe zu bekommen?

Wenn Sie unerwartete Nebenwirkungen im Zusammenhang mit den Untersuchungen bzw.

Medikamenten an sich beobachten oder Sie sich im Verlauf der Studie unwohl fühlen, sollten Sie sich an den behandelnden Prüfarzt wenden.

Name des Prüfarztes: Dr. M. Venerito

Adresse der Klinik: Klinik für Gastroenterologie / Hepatologie der Otto-von-Guericke
Universität

Leipziger Str. 44, D-39120 Magdeburg

Telefonnummer: 0391-67-13100

0391-67-21212 (Zentrale Notfallambulanz, übrige Zeiten)

Vielen Dank, dass Sie dieses Informationsblatt durchgelesen haben. Sollten Sie noch Fragen bezüglich der Studie oder zu Ihren Rechten als Studienteilnehmer haben, wenden Sie sich bitte an Ihren Arzt. Wenn Sie sich für eine Teilnahme entscheiden, werden Sie gebeten, eine sogenannte Einwilligungserklärung zu unterzeichnen, die besagt, dass Sie alles durchgelesen und verstanden haben und sich Bereiterklären, an der Studie teilzunehmen.

Für Ihre Einwilligung zur Teilnahme danken wir Ihnen.

Einwilligungserklärung

Studientitel: Bedeutung des 5-Lipoxygenase/Leukotriene Rezeptorsystems für die Entstehung Karzinome des oberen Magendarmtraktes (inkl. Speiseröhre).

Ich bestätige, dass ich die Patienteninformation für die oben genannte Prüfung gelesen und verstanden habe und dass meine Fragen zu meiner Zufriedenheit beantwortet wurden.

Ich verstehe, dass ich meine Einwilligung jederzeit widerrufen kann, ohne dass meine medizinische Versorgung oder gesetzlichen Rechte hierdurch beeinträchtigt werden.

Ein Exemplar der Patienteninformation und Einwilligungserklärung wurden mir ausgehändigt.

In wissenschaftlichen Prüfungen werden personenbezogene Informationen und medizinische Befunde in Zusammenhang mit Ihrem Fall aufgezeichnet. Die Weitergabe, Archivierung und Auswertung dieser prüfungsbezogenen Daten erfolgt in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Vorgaben, und vor der Teilnahme an der Prüfung ist folgende freiwillige Zustimmung erforderlich:

Ich stimme zu, dass die während dieser Prüfung gesammelten Daten/medizinischen Daten auf Prüfbögen und elektronischen Datenträgern aufgezeichnet und in anonymisierter Form (das heißt mein Name wird jeweils anhand des zweiten Buchstabens meines Vor- und Nachnamens verschlüsselt), ohne Nennung meines Namens an folgende Empfänger übermittelt werden:

an die zuständige Aufsichtsbehörde (Staatliche Behörde oder Landesbehörde)

die zuständige Ethikkommission, um zu verifizieren, dass die Prüfung korrekt durchgeführt wird.

Ich stimme ebenfalls zu, dass ein zur Wahrung der Vertraulichkeit verpflichteter befugter Mitarbeiter sowie die zuständigen Behörden im In- und Ausland meine vom Prüfarzt geführten personenbezogenen Daten einsehen, insoweit dies für die Überprüfung einer korrekten Prüfungsdurchführung nötig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Prüfarzt von seiner ärztlichen Schweigepflicht.

Falls ich meine Einwilligung für die Teilnahme widerrufe, stimme ich zu, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gesammelten Daten nicht gelöscht werden, da gesetzlichen Forderungen zufolge alle Prüfungsdaten über einen Mindestzeitraum von 15 Jahren aufbewahrt werden müssen.

Über meine Teilnahme an dieser Prüfung darf mein Hausarzt informiert werden.

Ich willige ein, an der Studie teilzunehmen.

Name des Patienten (in Druckbuchstaben)

Unterschrift des Patienten

Datum

Name des aufklärenden Prüfarztes (in Druckbuchstaben)

Unterschrift des aufklärenden Prüfarztes

Datum