

Aus dem Zentrum für Operative Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Tumorchirurgie und
Transplantationschirurgie

Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. med. C. Bruns

**DKK2 und miRNA221 als Prognosefaktoren für das
Gesamtüberleben nach neoadjuvanter
Radiochemotherapie bei Ösophaguskarzinom**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Anne Sophie Jacob
Aus Duisburg

promoviert am 07. September 2022

Aus dem Zentrum für Operative Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Tumorchirurgie und
Transplantationschirurgie

Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. med. C. Bruns

**DKK2 und miRNA221 als Prognosefaktoren für das
Gesamtüberleben nach neoadjuvanter
Radiochemotherapie bei Ösophaguskarzinom**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Anne Sophie Jacob
Aus Duisburg

promoviert am 07. September 2022

Dekanin/Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin oder Gutachter: Professor Dr. med. F. Gebauer

2. Gutachterin oder Gutachter: Privatdozent Dr. med. C. M. Baues

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.¹

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Prof. Dr. Florian Gebauer

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Daten wurde unter Anleitung von Mitarbeiter*innen der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Tumorchirurgie der Uniklinik Köln von mir ermittelt.

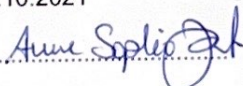
Die dieser Arbeit zugrundeliegenden pathologischen Befunde wurden ohne meine Mitarbeit im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Uniklinik Köln ermittelt.

Die Operationen an den Patienten im Rahmen der Behandlung ihrer Tumorerkrankung sowie die chemotherapeutische Behandlung und die Nachsorge wurden durch Mitarbeiter*innen der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Tumorchirurgie der Universität zu Köln durchgeführt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 20.10.2021

Unterschrift: 

¹Bei kumulativen Promotionen stellt nur die eigenständig verfasste Einleitung und Diskussion die Dissertationsschrift im Sinne der Erklärung gemäß dieser Erklärung dar.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Florian Gebauer für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Meinen Eltern, Geschwistern, Freunden und meinem Freund danke ich für ihre Geduld und ihre Zusprüche während meines Studiums und während der Arbeit an dieser Dissertation.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS6

1 ZUSAMMENFASSUNG8

2 EINLEITUNG9

2.1 ÖSOPHAGUSKARZINOM9

2.1.1 PLATTENEPITHELKARZINOM9

2.1.2 ADENOKARZINOM9

2.2 EPIDEMIOLOGIE10

2.3 RISIKOFAKTOREN11

2.3.1 RAUCHEN11

2.3.2 ALKOHOL11

2.3.3 ÜBERGEWICHT11

2.3.4 WEITERE RISIKOFAKTOREN12

2.4 LEITLINIENGERECHTE THERAPIE DES ÖSOPHAGUSKARZINOMS12

2.4.1 STAGING12

2.4.2 ENDOSKOPISCHE THERAPIE13

2.4.3 CHIRURGISCHE THERAPIE14

2.4.4 MULTIMODALE THERAPIEKONZEPTE15

2.4.5 NACHSORGE16

2.4.6 BEWERTUNG DES THERAPIEERFOLGES17

2.5 MIKRO-RNA-221 UND DICKKOPF 218

2.5.1 MIKRO-RNAs – FUNKTION UND BIOGENESE18

2.5.2 DIE ROLLE VON MIRNAS IN DER ENTSTEHUNG UND PROGRESSION VON KREBSERKRANKUNGEN19

2.5.3 DICKKOPF 2 – FUNKTION UND ZUSAMMENHANG IN DER ENTSTEHUNG VON KREBS ...20

2.5.4 MIRNAS UND DKK2 - ROLLE IN DER ENTSTEHUNG VON CHEMORESISTENZEN21

2.6 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT22

3 MATERIAL UND METHODEN22

3.1 PATIENTENKOLLEKTIV22

3.2 TMA-KONSTRUKTION23

3.3 IMMUNHISTOCHEMIE FÜR DKK225

3.4 RNASCOPE RED FÜR MIRNA22126

3.6 STATISTISCHE ANALYSE28

<u>4 ERGEBNISSE</u>	29
4.1 KLINISCH-PATHOLOGISCHE CHARAKTERISTIKA DER PATIENTEN.....	29
4.2 DKK2 EXPRESSION UND GESAMTÜBERLEBEN	31
4.3 MIR-221 ERGEBNISSE UND GESAMTÜBERLEBEN	35
<u>5 DISKUSSION</u>	38
<u>6 LITERATURVERZEICHNIS</u>	42
<u>7 ANHANG</u>	51
7.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	51
7.2 TABELLENVERZEICHNIS.....	52
<u>8 VORABVERÖFFENTLICHUNG</u>	52
8.1 PUBLIKATION	52

Abkürzungsverzeichnis

5-FU - 5-Fluoruracil

Abb. - Abbildung

Ago 2 - Argonaute2

AUC - Fläche unter der Kurve (area under curve)

BMI - Body-Mass-Index

CDKN1B/p27 - Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B/p27

CDKN1C/p57 - Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B/p57

CRC - Kolorektales Karzinom

CT - Computertomographie

DKK2 - Dickkopf-2

ER -Endoskopische Resektion

EMR - Endoskopische Mukosaresektion

ESD - Endoskopische Submukosadisektion

FISH - Fluoreszenz in situ hybridization

FOLFOX - Oxaliplatin, Folinsäure, 5-FU

G - Differenzierungsgrad (Grading)

GERD - Gastro-ösophageale Refluxkrankheit (Gastro-Esophageal Reflux Disease)

HCC Hepatozelluläres Karzinom

H. pylori - Helicobacter pylori

KI - Konfidenzintervall

KOP - Körperoberfläche

mRNA - messengerRNA

miRNA - Mikro-RNA

miR-221 - Mikro-RNA-221

L - Lymphinvasion

N - Lymphknotenstatus

M - Metastasenstatus

ÖDG - Ösophagogastroduodenoskopie

oncomiR - onkogene miRNA

oncosuppressor-miR - Tumorsuppressor-miRNA

OP - Operation

OR - Odds Ratio

OS - Overall Survival

PCR - Polymerase-Chain-Reaction
PET - Positronen-Emissions-Tomographie
pre-miRNA - Vorläufer-miRNA
pri-miRNA - Vorläufer-pre-miRNA
R - Resektionsgrad
RCT - Radiochemotherapie
RISC - RNA-induced silencing complex
RNA - Ribonukleinsäure
RNA-ISH - RNA in situ hybridization
RR - Relatives Risiko
T - Tumorstatus
Tab - Tabelle
TMA - Tissue Micro Arrays
UICC - Union for International Cancer Control
V - Veneninvasion
WHO - World Health Organization

1 Zusammenfassung

Das Ösophaguskarzinom ist einer der aggressivsten und tödlichsten Tumoren weltweit. Trotz zunehmender Fortschritte in der onkologischen Therapie bleibt die Prognose weiterhin infaust. Vor allem in der westlichen Welt wurde in den letzten Jahren ein Anstieg der Inzidenz des histologischen Subtyps des Adenokarzinoms festgestellt und im Einklang dazu ebenso eine erhöhte Mortalitätsrate an Adenokarzinomen.

Die aktuellen Therapiemöglichkeiten richten sich vor allem nach der TNM-Klassifikation und beinhalten multimodale Therapiekonzepte aus (neo-) adjuvanter Radiochemotherapie in Kombination mit einer Ösophagusresektion. Die weiterhin ungünstige Prognose trotz Therapie lässt sich unter anderem durch eine bislang unzureichende Risikostratifizierung erklären. Hoffnung aktueller Forschungen ist die Entdeckung von Prognosefaktoren, welche prätherapeutisch bestimmt werden können, um die Therapie des Ösophaguskarzinoms patientenindividuell gestalten zu können. Es gibt eine Reihe von Zielstrukturen, die hierfür in Frage kommen. Dazu gehören auch DKK2 und miR-221, deren Untersuchung Gegenstand dieser Arbeit sind.

Die aus 175 Patienten mit Adenokarzinom des Ösophagus bestehenden Kohorte wurde bezüglich eines Unterschiedes im Gesamtüberleben in Zusammenhang mit der Expression von DKK2 und miR-221 untersucht. Dabei konnte für die gesamte Kohorte für beide Faktoren kein signifikanter Unterschied belegt werden. Die Subgruppenanalyse der neoadjuvant vorbehandelten Patienten zeigte jedoch ein signifikant vermindertes Gesamtüberleben bei Expression beider Faktoren. Dies steht im Einklang mit bereits veröffentlichten Arbeiten zum Einfluss von DKK2 und miR-221 auf die Tumorprogression und die Ausbildung von Chemoresistenzen in anderen Tumoren. Die Untersuchung des Einflusses von DKK2 und miR-221 in einer größeren Patientenkohorte auf das histopathologische Ansprechen stellt einen vielversprechenden Forschungsansatz dar. Darüber hinaus könnten DKK2 und miR-221 nicht nur diagnostische, sondern ebenso therapeutische Zwecke in Bezug auf das Ösophaguskarzinom erfüllen und eine sorgfältige Erforschung dieser Möglichkeiten sollte ebenfalls Ziel zukünftiger Arbeiten sein.

2 Einleitung

2.1 Ösophaguskarzinom

Das Ösophaguskarzinom ist einer der aggressivsten und tödlichsten Tumoren weltweit [1]. Trotz zunehmender Fortschritte in der Onkologie mit Einführung von unter anderem zielgerichteten Therapien oder durch Reduzierung der therapieassoziierten Toxizitäten auf ein Minimum, bleibt die Prognose des Ösophaguskarzinoms weiterhin in vielen Fällen infaust [1]. Um zu verstehen, warum die Prognose dieses Karzinoms sich im Gegensatz zu anderen Tumorerkrankungen, wie etwa die des malignen Melanoms oder der chronisch lymphatischen Leukämie [1, 2], nur so wenig verbessert hat, sollten vorerst einige Grundzüge dieses Tumors und seiner bisherigen Therapie erläutert werden.

2.1.1 Plattenepithelkarzinom

Das Ösophaguskarzinom kann histologisch in zwei Subtypen unterteilt werden: in das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom.

Das Plattenepithelkarzinom entsteht durch den direkten Kontakt verschiedener Noxen mit der Ösophagusmukosa. Zu diesen karzinogenen Noxen gehören unter anderem der Konsum von Alkohol - insbesondere hochprozentiger Zubereitungen - und Tabakrauch, des Weiteren der Konsum von rohem Fleisch und heißen Getränken. Mechanische Beeinträchtigungen der Schutzbarriere der Ösophagusmukosa, wie zum Beispiel durch Radiotherapie oder Achalasie, lassen die Mukosa noch anfälliger für diese Noxen werden und verstärken ihren karzinogenen Effekt. Darüber hinaus konnten in drei genomweiten Studien Suszeptibilitäts-Loci identifiziert werden, die eine genetische Prädisposition verursachen [3].

Das Plattenepithelkarzinom entsteht bevorzugt im mittleren Drittel des Ösophagus und entlang physiologischer Engstellen [4].

2.1.2 Adenokarzinom

Zu den Ösophaguskarzinomen gehört außerdem das Adenokarzinom, welches meist auf dem Boden eines Barrett-Ösophagus entsteht [3]. Durch die chronische gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD) entsteht eine intestinale Metaplasie: das Plattenepithel des Ösophagus wird vom Magen ausgehend durch Zylinderepithel ersetzt [5]. Hieraus kann im nächsten Schritt eine Dysplasie

entstehen, welche als Präkanzerose für das Adenokarzinom des Ösophagus gilt. Diese Adenom-Karzinom-Sequenz erklärt auch, warum das Adenokarzinom vorwiegend am gastroösophagealen Übergang zu finden ist [4]. Analog zu den Risikofaktoren für die Entstehung der GERD gehören daher Reflux, aber auch Übergewicht und das männliche Geschlecht zu den Hauptrisikofaktoren dieses Subtyps. Als Protektivfaktoren gelten der Konsum von Früchten und Gemüse und eine Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* [4].

2.2 Epidemiologie

Das Plattenepithelkarzinom ist weltweit der häufigste histologische Subtyp des Ösophaguskarzinoms. Vor allem in Ost-Asien sowie in Ost- und Südafrika finden sich hohe Inzidenzraten. Im Gegensatz dazu lässt sich eine Zunahme in der Inzidenz des Adenokarzinoms in Europa, Australien und den USA feststellen. Mittlerweile liegt die Inzidenz des Adenokarzinoms in diesen Regionen sogar höher als die des Plattenepithelkarzinoms. Dieser Anstieg steht im Zusammenhang mit einer Zunahme von Übergewicht und Refluxerkrankungen, aber auch mit abnehmenden Prävalenzen von *H. Pylori*-Infektionen in oben genannten Regionen [3].

Trotz großer Fortschritte in der Medizin gehört das Ösophaguskarzinom mit seinem hohen Risiko zur lokalen Invasion und seiner frühen Dissemination immer noch zu einem der aggressivsten soliden Tumoren des Gastrointestinaltraktes. Die 5-Jahres-Überlebensrate in den USA in den Jahren 2009-2015 liegt trotz fortgeschrittener Behandlungsmöglichkeiten bei nur 20% und selbst bei regionalem Tumorwachstum weiterhin nur bei 47% [1]. Siegel et al. prognostizieren 18440 Neuerkrankungen von und 16170 Todesfälle an Ösophaguskarzinomen in den Vereinigten Staaten für das Jahr 2020. Während für andere Krebserkrankungen, wie zum Beispiel das Lungenkarzinom oder das metastasierte Melanom, bedeutende Rückgänge in den Mortalitätsraten verzeichnet werden konnten, unter anderem bedingt durch einen starken Rückgang des Tabakkonsums, aber auch durch die Implementierung von spezifischen Therapieansätzen anhand von Checkpoint-Inhibitoren [1], bleibt die Prognose des Ösophaguskarzinoms weiterhin ungünstig.

2.3 Risikofaktoren

2.3.1 Rauchen

In einer Metaanalyse von Tramacere et al. konnten die Autoren einen Zusammenhang zwischen Tabakkonsum und der Entstehung eines Ösophaguskarzinoms darstellen mit einem relativen Risiko (RR) von 1,76 für Patienten, die jemals in ihrem Leben geraucht haben, einem RR von 1,62 für Ex-Raucher und einem RR von 2,32 für Patienten, die zum Zeitpunkt der Studie rauchten. Außerdem bewiesen sie eine direkte Assoziation zwischen der Menge und Dauer des Tabakkonsums [6]. Ähnliche Zusammenhänge konnten in einer Publikation zu Alkohol und Tabak als Risikofaktoren für die Entstehung von Ösophaguskarzinomen in Südafrika gezeigt werden: Hier betrug die Odds Ratio (OR) für die Entstehung eines Karzinoms bei Frauen und Männern mit einem Tabakkonsum von mehr als 14g pro Tag 4,56 bzw. 4,36 [7].

2.3.2 Alkohol

2018 veröffentlichten Choi et al. eine Metaanalyse von insgesamt 60 Kohortenstudien, die ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms der Speiseröhre mit einem RR von 1,98 (95% CI, 1,25 bis 3,14) bei moderatem Alkoholkonsum (1-2 Gläser/Tag) zeigte. Ein Zusammenhang zur Entstehung eines Adenokarzinoms konnte dagegen nicht belegt werden [8]. Auch die oben bereits erwähnte Studie aus Südafrika zeigte eine ähnliche Risikoerhöhung und vor allem einen Zusammenhang zwischen der konsumierten Menge an Alkohol und der Risikoerhöhung [7].

2.3.3 Übergewicht

Eine Metaanalyse von Turati et al. aus dem Jahr 2013 dokumentierte ein um mehr als das Zweifache erhöhtes Risiko für Karzinome des ösophago-gastralen Übergangs ab einem Body Mass Index (BMI) von über 30 kg/m² im Vergleich zu normalgewichtigen Studienpatienten. Schon bei einem BMI von 25 bis 30 kg/m² stieg das relative Risiko auf 1.71 (95% KI 1.50-1.96) [9]. Zwei weitere Publikationen berichten ebenfalls von Ösophaguskarzinomen als Komorbidität bei Adipositas [10, 11].

2.3.4 Weitere Risikofaktoren

Darüber hinaus können unter anderem auch die Achalasie, Gastroösophagealer Reflux und der Barret-Ösophagus das Risiko für die Entstehung eines Ösophaguskarzinoms erhöhen [5, 11-14].

2.4 Leitliniengerechte Therapie des Ösophaguskarzinoms

2.4.1 Staging

Die aktuelle Leitlinie empfiehlt Staging-Informationen, Komorbiditäten, Ernährungszustand und Patientenpräferenz bei der Therapieentscheidung zu berücksichtigen. Daher nimmt das prätherapeutische Staging der Patienten eine sehr wichtige Rolle ein. Anhand von Anamnese und klinischer Untersuchung wird eine erste Einschätzung der Symptomatik vorgenommen. Mithilfe einer Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) mit 4-Quadranten-Biopsie [15], Chromoendoskopie vor allem bei Risikopatienten [16, 17], endoskopischem Ultraschall [18, 19] und (Multi-detector-) Computertomographie von Hals/ Thorax und Abdomen [20, 21] wird dieser erste Schritt ergänzt. In Einzelfällen kann ein laparoskopisches Staging erwogen werden [22]. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren kann darüber hinaus eine PET/CT-Untersuchung zum Metastasen-Staging eingesetzt werden [21, 23].

Anhand des histopathologischen Befundes aus dem Biospiematerial kann das pathologische Tumorstadium bestimmt werden. Neben der Art der neoplastischen Läsion und dem histologischen Typ nach WHO sollte bei invasiven Adenokarzinomen auch der Differenzierungsgrad sowie bei Läsionen des distalen Ösophagus das (Nicht-) Vorhandensein von Barrett-Mukosa bestimmt werden [15].

Aufgrund dieser gesammelten Informationen wird der Tumor einer TNM-Kategorie zugeteilt (siehe Tabelle 1). Anhand des TNM-Stagings werden die Patienten daraufhin einem UICC-Stadium zugeordnet, anhand dessen sich wiederum eine 5-Jahres-Überlebensrate prognostizieren lässt. Ferner richten sich die Therapieempfehlungen nach der Zuordnung zum UICC-Stadium.

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ

T1	Tumor infiltriert Lamina propria, Muscularis mucosae oder Submukosa a: Tumor infiltriert Lamina propria, Muscularis mucosae b: Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Adventitia
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen a: Tumor infiltriert Pleura, Perikard, Zwerchfell b: Tumor infiltriert andere Nachbarstrukturen wie Aorta, Wirbelkörper oder Trachea
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 – 2 Lymphknoten
N2	Metastasen in 3 – 6 Lymphknoten
N3	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
M	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1 Klinische Klassifikation der Ösophaguskarzinome, eingeschlossen Karzinome des ösophagogastralen Übergangs nach der TNM-Klassifikation [15]

UICC-Stadium				5-J
0	Tis	N0	M0	80%
I	T1	N0	M0	67%
IIA	T2/ T3	N0	M0	43%
IIB	T1/ T2	N1	M0	26%
IIIA	T3	N1	M0	16%
	T4	Jedes N	M0	
IIIB	T3	N2	M0	
IV	Jedes T	Jedes N	M1	3%

Tabelle 2 UICC-Stadien/ 5-Jahres-Überlebensrate [24]

2.4.2 Endoskopische Therapie

Eine endoskopische Resektion (ER) mit gleichzeitiger Untersuchung der Infiltrationstiefe zum Staging empfiehlt sich bei hochgradigen intraepithelialen Neoplasien oder mukosalen Karzinomen mit geringer Infiltrationstiefe im Barrett-Ösophagus. Hierzu kommen sowohl die endoskopische Mukosaresektion (EMR) als auch die endoskopische Submukosadisektion (ESD) in Frage [25]. Es wurde gezeigt, dass die EMR bei geringerer Morbidität und Mortalität gleiche Kurationsraten wie die chirurgische Resektion des Ösophagus aufweisen kann

[26-28]. Sobald es sich jedoch um ein weiter fortgeschrittenes Karzinom handelt, sollte eine Ösophagusresektion in Erwägung gezogen werden. Zu den Indikationskriterien einer vollständigen Ösophagektomie gehören die Lymph (L1)- oder Veneninvasion (V1), ein schlechter Differenzierungsgrad ($\geq G3$), eine tiefe Submukosainfiltration ($\geq 500\mu\text{m}$) und ein Tumorrest am basalen Resektionsrand (R1 basal) [26, 29]. In den ersten zwei Jahren nach Therapie sollten engmaschige endoskopische Kontrollen stattfinden, um das Auftreten von Rezidiven frühzeitig zu erkennen. Die Evidenz für dieses Vorgehen ist jedoch gering und abhängig vom behandelnden Arzt [15].

2.4.3 Chirurgische Therapie

Die chirurgische Therapie bildet neben der Radiochemotherapie einen der zwei Grundpfeiler der kurativ intendierten Therapie des Ösophaguskarzinoms. Ziel ist die vollständige Entfernung des Tumors und der regionären Lymphknoten [15]. Das Resektionsausmaß und das Ausmaß der Lymphadenektomie lassen sich anhand der TNM-Kategorie, Histologie, Tumorlokalisation und Ausdehnung des gegebenenfalls vorliegenden Barrett-Ösophagus bestimmen und sollten die Physiologie des Gastrointestinaltraktes so weit wie möglich intakt lassen [15].

Das aktuelle Standardverfahren ist die abdominothorakale Ösophagusresektion nach Ivor-Lewis mit intrathorakaler Anastomose [30]. Ist der Tumor weit distal lokalisiert und infiltriert gegebenenfalls schon Teile des Magens, kann eine transhiatal erweiterte Gastrektomie plus distale Ösophagusresektion erwogen werden. Dieses Verfahren beinhaltet jedoch eine weniger radikale Lymphadenektomie und damit einhergehender schlechterer Prognose [31] sowie eine zervikale Anastomose, welche mit höheren Raten an Anastomoseninsuffizienzen einhergeht [32] und daher eine der transthorakalen Ösophagusresektion unterlegene Option darstellt.

Bei Plattenepithelkarzinomen erfordert die enge Lagebeziehung zu Trachea und zu den Hauptbronchien besonders bei fortgeschrittenen Karzinomen eine exakte Präparationstechnik, deren Anforderungen nur durch die transthorakale Ösophagusresektion erfüllt werden können [15].

Es erfolgt eine Zweifeld-Lymphadenektomie, das heißt, die thorakalen und abdominalen, eventuell auch zervikalen Lymphknoten (Dreifeld-Lymphadenektomie), werden entfernt und pathologisch untersucht [33]. Dabei hat laut Peyre et al. die Anzahl der entfernten Lymphknoten prognostische

Relevanz: Bei einem Cut-off-Value von 23 Lymphknoten wurde ein signifikanter Überlebensvorteil nachgewiesen [34].

Ösophagusresektion und Magenhochzug können auch minimalinvasiv durchgeführt werden [35]. In einigen kleinen Studien wurde gezeigt, dass hierdurch weniger postoperative Komplikationen und eine geringere postoperative Morbidität, ein kürzerer Aufenthalt auf Intensivstation und eine insgesamt kürzere Krankenhausverweildauer erreicht werden können. Noch ist die Studienlage jedoch zu gering, um die minimal invasive Ösophagektomie als Standardverfahren festzulegen [24].

2.4.4 Multimodale Therapiekonzepte

Multimodale Therapieansätze bilden den zweiten Grundpfeiler der kurativen Therapie und umfassen unter anderem die Radiochemotherapie (RCT). Zeitpunkt und Ausmaß der RCT orientieren sich dabei am Tumorstadium: bei lokalisierten Tumoren kann - bei fortgeschrittenen Tumoren sollte - eine präoperative Chemotherapie durchgeführt und postoperativ fortgeführt werden [36-39].

Zu den in Frage kommenden Chemotherapieregimen gehören Cisplatin/5-Fluoruracil (5-FU), Carboplatin/ Paclitaxel und FOLFOX (Oxaliplatin, Folinsäure, 5-FU) in Kombination mit einer Radiotherapie mit einer Dosis von 40.0-50.4 Gy in konventioneller Fraktionierung mit 1.8 Gy bis 2.0 Gy pro Fraktion [40].

Mehrere Arbeiten konnten einen signifikanten Überlebensvorteil unter präoperativer Radiochemotherapie mit nachfolgender Operation verzeichnen. Gleichzeitig werden sowohl erhöhte R0-Resektionsraten als auch ein geringeres Risiko für Lokalrezidive berichtet [40, 41].

Nach Abschluss der präoperativen Therapie sollte ein Re-Staging erfolgen, um erneut Fernmetastasen auszuschließen und die OP zu planen. Kommt es unter neoadjuvanter Therapie zum lokalen Progress des Tumors, sollte die OP frühzeitig durchgeführt werden [15].

Sollte der Patient funktionell inoperabel sein, eine OP ablehnen oder eine interdisziplinäre Tumorkonferenz den Tumor als nicht resektabel erachten, ist eine definitive RCT in Erwägung zu ziehen. In zwei Übersichtsarbeiten konnten 5-Jahres-Überlebensraten von 10-35% gezeigt werden [42, 43]. Hierfür werden die gleichen Schemata verwendet wie bei der neoadjuvanten RCT.

Eine definitive RCT sollte bei Patienten mit lokalisiertem zervikalen Plattenepithelkarzinom gegenüber der primären Resektion bevorzugt und bei resektablen Plattenepithelkarzinomen des intrathorakalen Ösophagus der Kategorie cT3/cT4 alternativ durchgeführt werden [44].

Sollte es zu einer histologisch nachgewiesenen Tumorpersistenz oder einem isolierten Lokalrezidiv kommen, ist die Durchführung einer Salvage-Therapie in kurativer Intention möglich [15].

Nach R0-Resektion eines Adenokarzinoms des gastro-ösophagealen Übergangs ist eine adjuvante Radiochemotherapie bei erhöhtem Lokalrezidivrisiko bei neoadjuvant nicht vorbehandelten Patienten möglich [45].

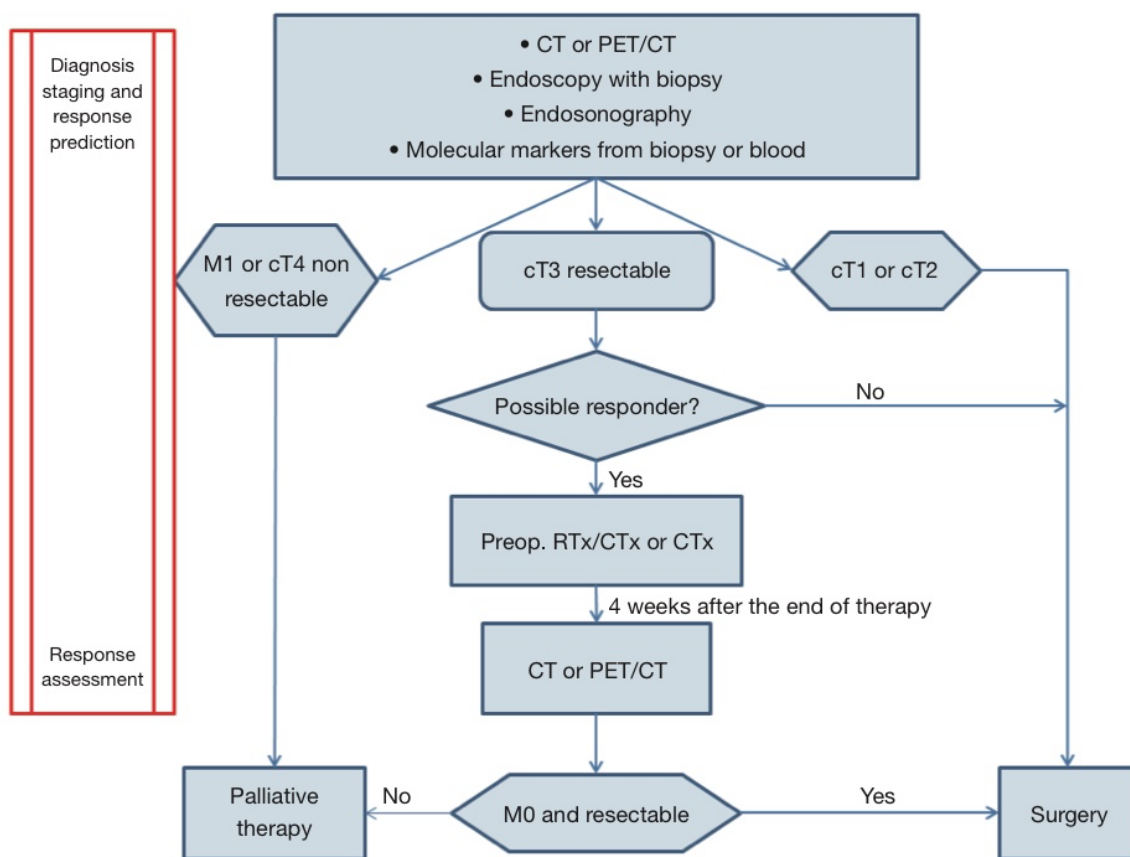


Abbildung 1 Flussdiagramm zu Diagnose, Staging und Therapie [46]

2.4.5 Nachsorge

Eine körperliche Untersuchung sowie symptomorientierte Anamnese sollte im Rahmen von regelmäßigen Nachsorgeuntersuchungen vor allem anfänglich in kurzen Abständen erfolgen, um die Lebensqualität beeinflussende Funktionsstörungen zu erfassen. Abate et al. konnten zeigen, dass mehr als

90% der Rezidive innerhalb der ersten 3 Jahre nach alleiniger und innerhalb von zwei Jahren nach neoadjuvanter Radiochemotherapie gefolgt von einer Ösophagusresektion auftreten. Darüber hinaus konnte durch ein frühes Erkennen von Rezidiven das Überleben durch eine erneute Therapie verbessert werden [47].

2.4.6 Bewertung des Therapieerfolges

Verschiedene Studien untersuchten die Überlebensraten von Patienten mit Ösophaguskarzinom nach multimodaler Therapie. Die CROSS-Studie ist wohl eine der bekanntesten hiervon: In dieser erhielten die Patienten Carboplatin i.v. und Paclitaxel i.v.. Zusätzlich erhielten alle Patienten Dexamethason, Clemastin und Ranitidin sowie Antiemetika. Die Gesamtstrahlendosis betrug 41,4 Gy und wurde in 23 Fraktionen von jeweils 1,8 Gy aufgeteilt. Nach Beendigung der neoadjuvanten RCT wurden die Patienten operiert. Die Kontrollgruppe wurde ohne neoadjuvante RCT nach erfolgter Randomisation primär operiert. Die Studie zeigte, dass die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit neoadjuvanter RCT bei 82% lag, bei der Kontrollgruppe jedoch nur bei 70% [48]. Andere Studien zeigten ähnliche Ergebnisse [38, 39].

Trotz aller Fortschritte der multimodalen Therapie bleibt die Prognose für Patienten mit Ösophaguskarzinom mit einer Überlebensrate von 16% (Männer) bzw. 17% (Frauen) nach 10 Jahren im Jahr 2014 weiterhin schlecht [48]. Auch nach Durchführung einer neoadjuvanten Chemotherapie konnte das Gesamtüberleben nach 2 Jahren nur um 5,1% gesteigert werden, in Zusammenspiel mit einer operativen Behandlung um 8,7% [24].

Ursächlich hierfür sind unter anderem zwei Aspekte: das präoperative Staging anhand der oben genannten Modalitäten ist nicht präzise genug in der Feststellung des Tumorstatus. Daraus ergibt sich zwangsläufig eine eher ungenaue Einteilung in das aktuelle TNM-Staging-System. Darüber hinaus gibt es kein validiertes System, um Hochrisikopatientin identifizieren zu können. Es ergibt sich also die Notwendigkeit einer präziseren prätherapeutischen Stratifizierung von Patientengruppen um eine gezielte, patienten-individuelle Therapie zu ermöglichen.

Ein neuer Ansatzpunkt ist es, prognostische Faktoren zu identifizieren, anhand derer sich das individuelle Patientenrisiko besser einschätzen und sich ein Patient einer genauen Gruppe zuordnen lässt. Diese Prognosefaktoren sollen

möglichst das biologische Verhalten des Ösophaguskarzinoms beschreiben und das Ansprechen auf spezifische Therapieformen vorhersagen. In Abbildung 1 sind die verschiedenen Schritte zu Diagnose und Therapie bei Ösophaguskarzinomen dargestellt. Direkt im ersten Schritt wird von Bollschweiler et al. die Bestimmung molekularer Marker aus Biopsien oder dem Blut des Patienten aufgeführt, mit deren Hilfe sich die Patienten besser stratifizieren lassen und so eine präzisere Vorhersage erlauben.

Es gibt eine Reihe von verschiedenen Zielstrukturen, die hierfür in Frage kommen: Dazu gehören unter anderem Growth Factor Rezeptoren, Angiogeneseenzyme, Tumorsuppressorgene, Zellzyklusregulatoren sowie Enzyme des DNA-Reparatursystems. Des Weiteren zeigten andere Studien die prognostische Relevanz von microRNAs [49].

2.5 Mikro-RNA-221 und Dickkopf 2

2.5.1 Mikro-RNAs – Funktion und Biogenese

Mikro-RNAs (miRNAs) sind kleine, 20 bis 23 Nukleotide lange, nicht-kodierende Einzelstrang-RNAs. Sie interagieren mit der komplementären 3'UTR-Region ihrer Ziel-Messenger-RNA (mRNA) und unterdrücken post-transkriptionell die Expression unterschiedlicher Gene. Dadurch regulieren sie die Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose [50]. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass eine veränderte Expression spezifischer miRNAs über unterschiedliche Signalwege zur Entstehung und Progression von Krebserkrankungen beitragen kann [51-57].

Bei der Biogenese der miRNAs handelt es sich um einen mehrschrittigen Ablauf: Zu Anfang werden die miRNAs im Zellkern zu langen Vorläufer-RNAs (pri-miRNAs) transkribiert [58]. Diese werden durch einen Enzym-Protein-Komplex (*Drosha*) zu einer weiterhin vorläufigen pre-miRNA prozessiert, welche circa 70 Nukleotide lang und wie eine Stammschleife geformt ist, und anschließend in das Zytoplasma exportiert [59, 60]. Im Zytoplasma werden diese pre-miRNAs dann von dem Enzym *Dicer*, einer Endoribonuklease der RNAase III Familie, zu zwei Einzelsträngen verarbeitet. Der sogenannte „guide strand“ wird als reife miRNA in den RNA-induced silencing complex (*RISC*) eingebunden, während der sogenannte „passenger strand“ abgebaut wird. Es kommt zur (partiell) komplementären Basenpaarung am 3'UTR-Ende der mRNA, welche entweder

die Translation der mRNA inhibiert oder zum Abbau der mRNA durch Argonaute2 (Ago2) führt [50, 56, 61].

2.5.2 Die Rolle von miRNAs in der Entstehung und Progression von Krebserkrankungen

Im menschlichen Genom gibt es hunderte miRNAs, welche wiederum tausende mRNAs als Zielstruktur haben. Daraus ergibt sich eine herausragende regulatorische Rolle der miRNAs in der Entwicklung, Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Zellen [57]. miRNAs können sowohl als potentielle Onkogene (oncomiRs) als auch als Onkosuppressorgene (oncosuppressor-miRs) fungieren, abhängig von den zellulären Gegebenheiten sowie den relevanten Genen [57].

Für miR-221 wurden bereits verschiedene Signalwege nachgewiesen, über welche die miRNA Einfluss auf die Entstehung von Krebs nimmt. Galardi et al. konnten den Zellzyklus-Regulator p27 als Zielstruktur von miR-221 identifizieren und eine inverse Korrelation zwischen den Expressionslevels von miR-221 und p27 in Prostatakarzinomzellen nachweisen. Eine Überexpression von miR-221/222 führte zu einer Abwärtsregulierung des Tumorsuppressors p27 und damit zu einer erhöhten Proliferationsrate und Veränderungen im Zellzyklus der Prostatakarzinomzellen [54]. Ferner zeigte sich in einer Studie von Fornari et al., dass miR-221 über CDKN1C/p57 und CDKN1B/p27 eine onkogene Wirkung auf Leberzellen haben kann [55].

Auch ein Zusammenhang mit der Entstehung von kolorektalen Karzinomen (CRC) wurde bereits berichtet [62]. Interessanterweise konnte für das CRC sogar ein Zusammenhang zwischen dem Serumspiegel von miR-221 und CRC gezeigt werden: die miR-221-Spiegel waren im peripheren Blut signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten [63]. Darüber hinaus stellte sich miR-221 in Zusammenhang mit CRC als diagnostischer Marker dar, da Yau et al. eine Sensitivität von 86% und Spezifität von 41% der miR-221-Serumspiegel sowie eine Sensitivität von 62% und Spezifität von 74% der Stuhl-miR-221-Level nachweisen konnten [64].

Abb. 2 zeigt, auf welchen Wegen miR-221 Einfluss auf die Entstehung und Progression von Krebs nehmen kann. Dazu gehören einige der oben genannten Wege, welche beispielhaft in diesem Kapitel beschrieben wurden, um die Rolle

von miR-221 in der Entstehung von Krebs zu umreißen. Tiefere Einblicke gewähren folgende Publikationen [52, 53, 58].

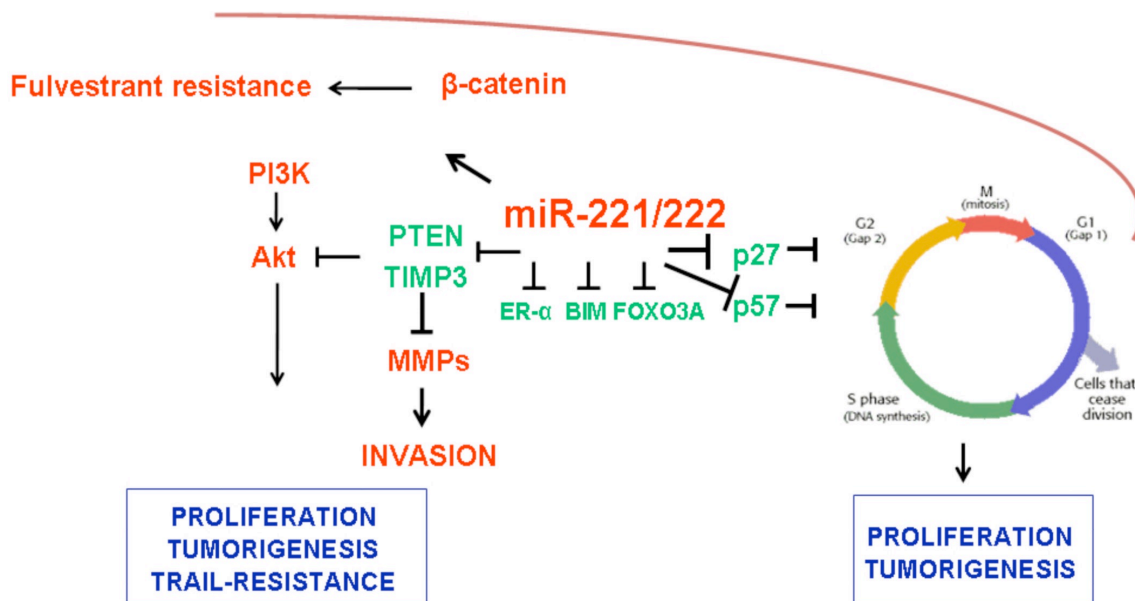


Abbildung 2 Einfluss von miR-221/222 auf die Entstehung und Progression von Krebs: miR-221/222 agieren als „oncomiRs“ indem sie Tumorsuppressorgene inhibieren. Dadurch induziert die Überexpression von miR-221/222 Zellproliferation. Außerdem nehmen sie Einfluss auf die Entstehung von Chemoresistenzen über Aktivierung des Wnt-β-Catenin-Signalwegs [57].

2.5.3 Dickkopf 2 – Funktion und Zusammenhang in der Entstehung von Krebs

Das Glykoprotein Dickkopf 2 (DKK2) ist Mitglied der Dickkopf Familie. Alle Mitglieder dieser Familie greifen vor allem inhibierend in die Wnt-β-catenin-Signalkaskade ein. DKK2 bindet und moduliert Wnt-Co-Rezeptoren des lipoprotein receptor-related protein 5/6 und inhibiert dadurch die Signalkaskade [65].

Im ungehemmten Zustand wirkt das Wnt-Signalprotein inhibierend auf einen Proteinkomplex, bestehend aus der Proteinkinase GSK-3, Adenomatöses Polyposis Coli Protein (APC) und Axin, sodass β-Catenin nicht abgebaut wird. Es kommt zur Ansammlung von β-Catenin im Zytoplasma und Nukleus, was wiederum die Transkription und Zellproliferation fördert [66].

Wenn DKK2 das Wnt-Signalprotein hemmt, wird der Abbau von β-Catenin durch den Proteinkomplex nicht mehr gehemmt, sodass β-Catenin abgebaut wird und der Zelltranskription nicht mehr zur Verfügung steht [51].

Die Mikro-RNA-221 (miR-221) greift in diesen Signalweg jedoch noch früher ein: miR-221 inhibiert DKK2. DKK2 wird somit herunterreguliert und wirkt nicht mehr

hemmend auf das Wnt-Signalprotein. Wnt wird also aktiviert und somit der β -Catenin-Abbau gehemmt. β -Catenin steht der Transkription also zur Verfügung und die Zellproliferation, und somit Tumorprogression, wird gefördert. DKK2 stellt daher einen Tumorsuppressor dar, der durch die Überexpression der onkogenen miR-221 inaktiviert wird [51].

Wang et al. haben diesen Zusammenhang zwischen miR-221, DKK2 und der WNT- β -Signalkaskade für Adenokarzinome der Speiseröhre nachgewiesen [4]. Ähnliche Zusammenhänge konnten auch für andere Tumoren nachgewiesen werden: So konnten Yau et al. beweisen, dass es auch in CRC-Zellen zu einer vermehrten Expression von miR-221 kommt und miR-221 daher als prognostischer Biomarker genutzt werden kann [64]. Dies steht im Einklang mit Studien zur Expression von miR-221 und/oder DKK2 bei Patienten mit Magenkarzinom, Kolonkarzinom, Mammakarzinom oder Hepatozellulären Karzinom [67-71].

2.5.4 miRNAs und DKK2 - Rolle in der Entstehung von Chemoresistenzen

Wang et al. haben außerdem herausgefunden, dass durch die miR-221 nicht nur die Zellproliferation, sondern auch die Chemoresistenz gefördert wird. Sie zeigten, dass die Expression von miR-221 in Tumorgewebe signifikant höher als im umgebenden normalen Gewebe ist. Über die Inhibition der Expression von DKK2 und dadurch Aktivierung des Wnt- β -Catenin-Signalwegs beeinflusst miR-221 Chemoresistenzen. Daher scheint die Resistenz gegen 5-FU in Adenokarzinomzellen durch eine veränderte Expression von DKK2, bedingt durch miR-221, verursacht zu sein. Diese Hypothese wird bestätigt, da Wang et al. nachweisen konnten, dass die Inhibition von miR-221 die Zellproliferation senkt, Apoptose von Tumorzellen anregt sowie die Sensitivität auf 5-FU wiederherstellt [4].

Auch Rao und Kollegen konnten zeigen, dass miR-221 und -222 Chemoresistenzen durch Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs und Unterdrückung der TGF- β -Signal-induzierten Wachstumsinhibition fördern können [72]. In einer Publikation, in der der Einfluss von DKK2 und miR-221 auf die Prognose von Patienten mit Adenokarzinom des Ösophagus untersucht wurde, zeigte sich, dass die Expression von miR-221 bei neoadjuvant behandelten Patienten mit Tumorwachstum und 5-FU-Resistenz assoziiert ist [73].

miR-221 scheint daher ein potentieller Verursacher und Marker zur Prädiktion von Chemoresistenzen im Ösophaguskarzinom zu sein und könnte helfen, sensitivere Screeningmethoden zu etablieren.

2.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Neben der Forschung an individualisierten Therapiemöglichkeiten des Ösophaguskarzinoms bildet eine verbesserte Risikostratifizierung und genauere Stadieneinteilung vor Therapiebeginn ebenfalls einen Pfeiler in der Senkung der Mortalitätsrate, da sich hierdurch eine gezieltere Therapie realisieren ließe und somit potentiell toxische Nebenwirkungen multimodaler Therapiekonzepte reduziert werden könnten [1, 24].

Ziel dieser Arbeit ist es, darzustellen, welchen Einfluss die Expression von DKK2 und miRNA-221 auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Ösophaguskarzinom hat. Damit einhergehend soll die Frage beantwortet werden, ob die Marker DKK2 und miRNA-221 als Prognosefaktoren dienen können, um die Therapie des Ösophaguskarzinoms möglichst Patientenindividuell gestalten zu können. Perspektivisch könnte die Expression von DKK2 und miR-221 darüber hinaus auch als therapeutischer Angriffspunkt untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Für unsere Studie wurden insgesamt die Daten von 1205 Patienten gesichtet, die in den Jahren zwischen 1996 bis 2014 in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Tumorchirurgie der Uniklinik Köln wegen eines Adeno- oder Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus operiert wurden. Von den insgesamt 1205 Patienten, die prinzipiell für die Studie in Frage kamen, wurden nur Patienten mit Adenokarzinom in die Studie eingeschlossen werden. Darüber hinaus waren die klinischen Daten bei einigen der Patienten unvollständig, sodass diese Patienten ebenfalls ausschlossen werden mussten. Daraus ergab sich, dass nur von circa der Hälfte der ursprünglich in Frage kommenden 1205 Patienten das entnommene Tumormaterial gefärbt wurde. Auch hier kamen weitere Ausschlusskriterien zur Geltung, da auf einigen Objektträgern nur Bindegewebe und keine Tumorzellen dargestellt werden konnten.

Schlussendlich konnten somit die Daten von 192 Patienten mit einem vollständigen Datensatz für die Studie ausgewertet werden. Die Einteilung der Patienten in die verschiedenen Tumorstadien erfolgte anhand des TNM-Schemas und des UICC-Schemas wie unter 1.2 beschrieben. Follow-Up-Daten waren für alle in die Studie eingeschlossenen Patienten verfügbar.

Standard-Operationsverfahren war die subtotale transthorakale Ösophagektomie mit Resektion des proximalen Magens mit anschließender Rekonstruktion anhand eines Magenhochzugs und einer hohen intrathorakalen Anastomose mit 2-Felder-Lymphadenektomie der mediastinalen und der abdominalen Lymphknoten oder aber die transhiatal erweiterte distale Ösophagektomie mit transabdomineller intrathorakaler oder zervikaler Anastomose (Ivor-Lewis-Ösophagektomie) [73].

Patienten mit lokal fortgeschrittenem Ösophaguskarzinom (cT3) oder Nachweis von regionären Lymphknotenmetastasen, detektiert während der klinischen Staging-Untersuchungen, erhielten eine präoperative Radiochemotherapie (5-Fluoruracil, Cisplatin, Bestrahlung mit 40 Grey) oder alleinige Chemotherapie.

Alle Vorgehensweisen folgten den nationalen und institutionellen ethischen Standards und waren im Einklang mit der aktuellen Version der Deklaration von Helsinki. Alle Patienten erteilten ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

3.2 TMA-Konstruktion

Tissue Micro Arrays (TMA) gehören zu den Hochdurchsatz-Screening-Verfahren, indem sie das simultane Analysieren vieler Patienten gleichzeitig ermöglichen. Im Gegensatz zu älteren Verfahren wie zum Beispiel Proteinarrays oder der Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) im Hochdurchsatz, muss für TMAs das zu untersuchende Gewebe nicht zerstört und kann daher für weitere Untersuchungen noch genutzt werden.

Die Proben für die TMA werden aus Formalin-fixierten Paraffinblocks entnommen, die routinemäßig für histologische Untersuchungen hergestellt werden. Aus dem „Spenderblock“ (Donor) werden Stanzzyylinder herausgestochen mit einem Durchmesser von 0,6mm. Diese Stanzzyylinder werden dann in einen „Empfängerblock“ (Recipient) transferiert. Durch diese Technik entstehen nur minimale Schäden am Originalgewebe, sodass dieses später für weitere histologische Schnittuntersuchungen zur Verfügung steht. Der

„Empfängerblock“ wird dann in 4 bis 8 µm dünne Scheiben geschnitten, welche auf einen Objektträger gebracht und dort analysiert werden können. Durch diese Technik ist es möglich, bis zu 1000 verschiedene Gewebeproben auf einen mit einer Klebeschicht beschichteten Objektträger (Instrumedics Inc., Hackensack, NJ) zu bringen und simultan in-situ zu analysieren. Verschiedene In-Situ-Verfahren wie zum Beispiel die Immunhistochemie, *RNA in situ hybridization* (RNA-ISH) oder *fluoreszenz in situ hybridization* (FISH) können daraufhin durchgeführt werden. Abbildung 3 zeigt eine vereinfachte Darstellung der TMA Technologie. Des Weiteren können die TMA-Daten mit verschiedenen immunhistochemischen, wie zum Beispiel dem Mutationsstatus von TP53, und klinischen Daten, wie etwa das Überleben, korreliert werden.

Es gibt verschiedene Ansatzpunkte für TMA. Zum einen gibt es „Multitumor TMAs“, bei welchen Gewebeproben von verschiedenen Tumoren untersucht werden. Bei „Normal Tissue TMAs“ steht vor allem das Potential verschiedener Gene als diagnostischer oder therapeutischer Ansatzpunkt im Vordergrund. „Progression TMAs“ vergleichen die verschiedenen Stadien einer bestimmten Krankheit und „Prognosis TMAs“ analysieren Gewebeproben von Tumoren mit vorhandenen klinischen Follow-Up-Daten. „Experientental Tissue TMAs“ analysieren Zellen von experimentellen Geweben und „TMAs from frozen tissues“ gefrorene Gewebeproben. Der Vorteil von letzterem ist, dass die Erhaltung von Antigenen und RNA in gefrorenem Gewebe deutlich besser gelingt als in chemisch fixiertem Gewebe [74].

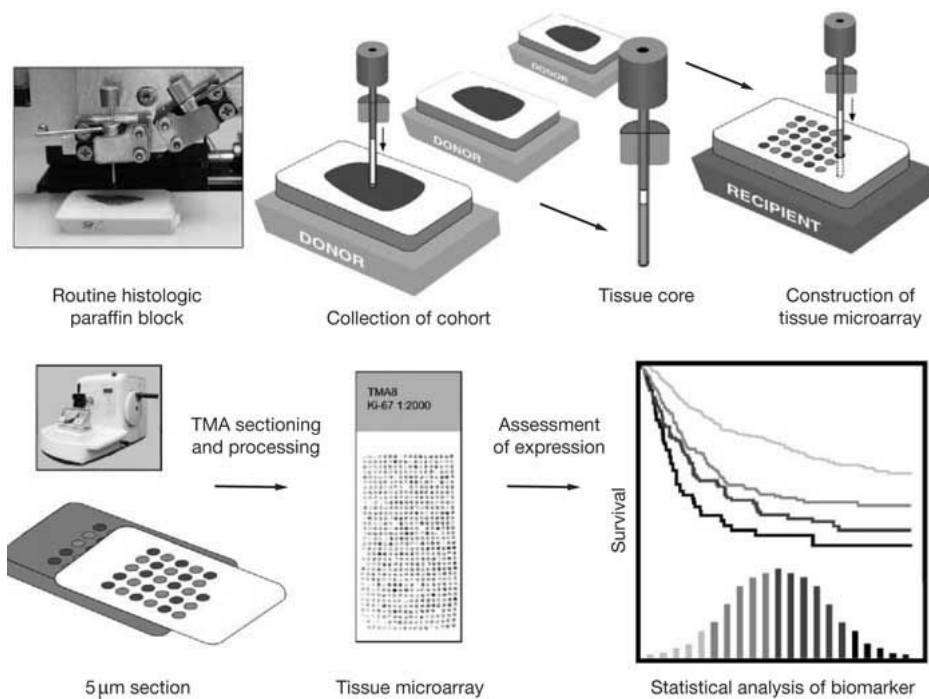


Abbildung 3 Überblick zur Erstellung von TMAs: Passende, archivierte Paraffinblöcke werden herausgesucht. Ein Pathologe wählt die zutreffenden Regionen jedes "Spenderblocks" (Donor) aus und sticht Stanzzyylinder aus. Die Stanzzyylinder werden dann in den „Empfängerblock“ (Recipient) übertragen. μ m-dünne Scheiben des „Empfängerblocks“ werden geschnitten und auf einen Objektträger gebracht. Hierauf kann dann der Biomarker-Status durch immunhistochemische oder ISH-Verfahren dargestellt werden. Die Biomarker-Expression wird durch manuelle oder automatisierte Analysen bewertet und mit klinischen Informationen verglichen. Der Graf zeigt ein Histogramm und eine Kaplan-Meier Überlebenskurve [75].

3.3 Immunhistochemie für DKK2

Zur Darstellung des Proteins DKK2 wurde der monoklonale Kaninchen-Antikörper IgG (ab38594; Verdünnung 1:200; Abcam, UK) benutzt. Alle anschließenden Färbungen wurden mit dem Färbeautomaten Leica BOND-MAX (Leica Biosystems, Germany) gemäß dem Protokoll des Herstellers angefertigt. Die immunhistochemische Analyse des Tumormaterials wurde auf den zuvor angefertigten TMA Objektträgern durchgeführt. Die Expression von DKK2 und miR-221 wurde mit negativen (dapB) und positiven (PPIB) Kontrollen verglichen. Anschließend wurden die Ergebnisse anhand des vom Hersteller empfohlenen Scoring-Schemas in folgende Gruppen eingeteilt: keine Färbung oder weniger als ein Molekül pro 10 Zellen gefärbt = Score 0, 1-3 Punkte/Zelle = Score 1, 4-9 Punkte/Zelle = Score 2, 10-15 Punkte/Zelle = Score 3 und >15 Punkte/Zelle = Score 4. Der dapB-Score betrug 0 und der PPIP-Score betrug 2. Ein Ergebnis wurde als positiv beurteilt bei einem Score von > 0.

Die immunhistochemische Expression von DKK2 und miR-221 wurde von zwei Pathologen des Pathologischen Institutes der Uniklinik Köln evaluiert. In einer

kleinen Anzahl von Fällen ergaben sich Diskrepanzen, die jedoch durch eine gemeinsame Re-Evaluation beseitigt werden konnten.

Für die genaue Analyse des Tumormaterials bezüglich des Proteins DKK2 und bezüglich der miR-221 siehe unten [73].

3.4 RNAscope RED für miRNA221

Um den potenziellen Biomarker miR-221 im Tumormaterial nachzuweisen, wurde der RNAscope Assay von ACD (Advanced Cell Diagnostics) verwendet. Dieser RNAscope Assay zeichnet sich durch seine hohe Spezifität und Sensitivität der In-Situ Hybridisierung aus, welche durch die Verwendung von „ZZ“ Proben Paaren und Signal Amplifikation erreicht wird [76]. In Abbildung 4 ist schematisch der Ablauf des RNAscope Assays dargestellt.

Für die Durchführung des Assays wurden 3-4µm dicke Schnitte aus dem Tumormaterial der Patienten angefertigt und auf Superfrost^R Objektträger gebracht. Diese wurden anschließend für eine Stunde lang bei 60°C im Ofen gebacken.



Abbildung 4 Ablauf der RNAscope In Situ Hybridisierung: Die Schnitte werden auf Objektträgern fixiert und mit dem RNAscope Pretreatment Kit behandelt, um die Ziel-RNA zu demaskieren. Im zweiten Schritt werden die RNAscope Ziel-RNAs mit 20 genspezifischen Doppel-Z-Proben-Paaren hybridisiert, um die Ziel RNAs darstellen zu können. Es folgt die Amplifikation und immunhistochemische Anfärbung der Schnitte, welche dann mikroskopisch untersucht werden. Die Signale können entweder manuell oder durch eine spezielle Software quantifiziert werden [77].

In der Zwischenzeit wurden 700ml des Puffers *Pretreat 2*, bestehend aus 630ml Wasser und 70ml *Pretreat 2 10x* Konzentrat, auf 98-104°C erhitzt. Nun folgte das

Entparaffinieren der Schnitte. Dafür wurden die Schnitte für 5 Minuten in Xylol eingelegt und anschließend für 3 Minuten in Ethanol 100% gesäubert. Dieser Vorgang wurde anschließend einmal wiederholt.

Danach trockneten die Schnitte für 5 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend wurde mit einem ImmEdge Fettstift das zu analysierende Gewebe eingekreist.

Für das Pretreatment 1 wurden 5 bis 8 Tropfen der *Pretreat 1* Lösung auf die Schnitte gegeben, welche dann bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte nach Dekantierung in destilliertem Wasser gewaschen. Nun folgte das Pretreatment 2, hierfür wurde die *Pretreat 2* Lösung bereits vorher auf 98 bis 104°C erhitzt. Die Schnitte wurden für 30 Minuten in diese kochende Lösung gelegt und danach direkt in destilliertes Wasser gestellt. Für das Pretreatment 3 wurden die Schnitte dem destillierten Wasser entnommen und trocken getupft. Es wurden 5 Tropfen der *Pretreat 3* Lösung auf die Schnitte gegeben, welche daraufhin für 30 Minuten bei 40°C im HybEZ Ofen (feuchte Kammern) inkubiert wurden. Anschließend erfolgten ein erneutes Dekantieren und Waschen in destilliertem Wasser.

Für die Hybridisierung wurden die Schnitte mit einem Tuch leicht trocken getupft, dann wurden 3 bis 4 Tropfen Probe (fertig geliefert von ACD) und Kontrollproben auf die Schnitte gegeben. Daraufhin folgte eine Inkubation bei 40°C im HybEZ Ofen.

Für die Amplifikation wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 2 Minuten im Waschpuffer gewaschen, dieser Vorgang wurde mit frischem Waschpuffer wiederholt.

Als Erstes wurden 4 Tropfen der *Amp1* Lösung auf die Schnitte gegeben und diese dann für 30 Minuten bei 40°C im Ofen inkubiert. Anschließend kamen die Schnitte zweimal für jeweils 2 Minuten in Waschpuffer.

Dann wurden 4 Tropfen der *Amp2* Lösung auf die Schnitte gegeben, welche daraufhin für 15 Minuten bei 40°C im Ofen inkubiert wurden. Der Waschvorgang wurde genauso wie oben beschrieben wiederholt.

Nun wurden 4 Tropfen *Amp3* auf die Schnitte gegeben, welche bei 40°C für 30 Minuten im Ofen inkubiert wurden. Es erfolgte erneut der Waschvorgang.

Als nächstes wurden 4 Tropfen *Amp4* auf die Schnitte gegeben, welche bei 40°C für 15 Minuten im Ofen inkubiert wurden. Es erfolgte erneut der Waschvorgang.

Daraufhin wurden 4 Tropfen *Amp5* auf die Schnitte gegeben, welche bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert wurden. Es erfolgte erneut der Waschvorgang.

Als Letztes wurden 4 Tropfen *Amp6* auf die Schnitte gegeben, welche bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert wurden. Es erfolgte erneut der Waschvorgang.

Für die Detektion wurde die Fast RED-B Tube abzentrifugiert. Dann wurde die BaseScope Fast RED-B Lösung in einer Verdünnung von 1:60 angefertigt: 2µl Red B wurden mit 120µl Red A in einem Eppendorf-Gefäß gut vermischt. Nun wurden die Schnitte mit 120µl RED Lösung bedeckt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die überschüssige RED Lösung wurde abgeklopft und die Schnitte in einer Küvette mit destilliertem Wasser gewaschen.

Für den Counterstain wurden die Schnitte mit Hematoxylin I gefärbt, dafür wurden sie 2 Minuten lang in Hematoxylin auf und ab bewegt. Anschließend wurden sie durch Auf- und Abbewegen in destilliertem Wasser gewaschen.

Es folgte das Mounting: Hierfür wurden die Schnitte 15 Minuten lang bei 60°C im Ofen getrocknet. Nach 5-minütigem Abkühlen wurden 1 bis 2 Tropfen EcoMount aufgetragen und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Anschließend wurden die Schnitte noch 5 Minuten luftgetrocknet und waren dann bereit für die mikroskopische Untersuchung.

3.6 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurden die klinischen Daten der Patienten retrospektiv aus den archivierten papierenen Patientenakten oder aus den elektronischen Patientenakten, welche im Krankenhaus-Informationssystem ORBIS von Agfa Health-Care hinterlegt sind, der Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Allgemein-, Tumor- und Transplantationschirurgie der Uniklinik Köln herausgesucht. Des Weiteren wurden die Datensätze der Klinik und Poliklinik für Pathologie der Uniklinik Köln bezüglich der Expression von DKK2 und miR-221 ausgewertet. Die Informationen wurden in einem Excel-Dokument zusammengetragen. Anhand der Daten aus dem Excel-Dokument erfolgte daraufhin die statistische Analyse mit dem Statistikprogramm SPSS Version 21 für Macintosh (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Die deskriptiven Daten wurden mittels absoluter und relativer Häufigkeit sowie Median, Mittelwert und 95%-igen Konfidenzintervall dargestellt. Mit Hilfe von

Kreuztabellen wurde außerdem die Abhängigkeit zwischen der Expression von DKK2 und miR-221 und klinischen Daten dargestellt. Zur Berechnung der Signifikanz der Korrelation wurden der Chi-Quadrat-Test und der Fisher's Exact Test verwendet.

Anschließend wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven angefertigt und analysiert mithilfe des Log-rank Tests. Die univariate und multivariate Analyse erfolgte mit dem Cox Regression Model. Als Signifikanzniveau wurde jeweils eine 2-seitige Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angenommen ($p < 0,05$).

4 Ergebnisse

4.1 Klinisch-pathologische Charakteristika der Patienten

Insgesamt konnten die Daten von 175 Patienten der 192 TMA-Patienten immunhistochemisch ausgewertet werden. Einige Tumorspots zeigten nicht genug auswertbares Gewebe (16 Spots, 8,3% der TMA) oder das Gewebe konnte nicht zuverlässig als Karzinomzellen identifiziert werden (17 Spots, 8,9% der TMA).

Ein Großteil der Patienten war männlich (männlich $n = 160$, 91,4%; weiblich $n = 15$, 8,6%) und knapp über die Hälfte der Patienten war unter 65 Jahre alt (<65 Jahre $n = 90$, 53,6%; ≥ 65 Jahre $n = 78$, 46,4%). Zum Zeitpunkt der Diagnose betrug der Median des Alters aller in diese Studie eingeschlossenen Patienten 65,2 Jahre (33,6 bis 85,6 Jahre). Mit 76,0% befand sich der Großteil der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose im Tumorstadium pT3. Darüber hinaus waren bei 60% der Patienten zu diesem Zeitpunkt Lymphknotenmetastasen nachweisbar (pN+ $n = 105$, 60%). 78 der insgesamt 175 Patienten (44,8%) wurden dem UICC-Stadium III zugeordnet, gefolgt von 36 Patienten (20,7%) im Stadium I, 35 Patienten (20,1%) im Stadium II und 25 Patienten (14,4%) im Stadium IV. Eine neoadjuvante Therapie wurde bei 115 Patienten (65,7%) durchgeführt. Diese und weitere Charakteristika der Patientenkohorte sind Tabelle 3 und 4 zu entnehmen.

Faktor	DKK 2 Expression							p-Wert
	Weiblich		Negativ		Positiv			
Geschlecht	Weiblich	15	8,6%	13	86,7%	2	13,3%	0,529
	Männlich	160	91,4%	124	77,5%	36	22,5%	

Altersgruppe	< 65 Jahre	90	53,6%	69	76,7%	21	23,3%	0,449
	≥65 Jahre	78	46,4%	64	82,1%	14	17,9%	
Tumorstadium	pT1	24	13,7	19	79,2%	5	20,8%	0,846
	pT2	10	5,7%	7	70,0%	3	30,0%	
	pT3	133	76,0%	104	78,2%	29	21,8%	
	pT4	8	4,6%	7	87,5%	1	0,6%	
Lymphknoten Metastasen	pN0	70	40,0%	51	72,9%	19	27,1%	0,101
	pN1	61	34,9%	54	88,5%	7	11,5%	
	pN2	26	14,9%	18	69,2%	8	30,8%	
	pN3	18	10,3%	14	77,8%	4	22,2%	
Differenzierung	G1	3	2,5%	2	66,7%	1	33,3%	0,150
	G2	67	55,4%	48	71,6%	19	28,4%	
	G3	51	42,1%	44	86,3%	7	13,7%	
UICC Stadium	I	32	21,6%	24	75,0%	8	25,0%	0,596
	II	26	17,6%	19	73,1%	7	26,9%	
	III	65	43,9%	54	83,1%	11	16,9%	
	IV	25	16,9%	21	84,0%	4	16,0%	
Neoadjuvante Therapie	Nein	60	34,3%	50	83,3%	10	16,7%	0,334
	Ja	115	65,7%	87	75,7%	28	24,3%	

Tabelle 3 Klinisch-pathologische Charakteristika der Patientenkohorte in Bezug auf DKK2

Faktor	miRNA-221 Expression							
		Negativ		Positiv		p-Wert		
Geschlecht	Weiblich	15	8,6%	7	50,0%	7	50,0%	0,173
	Männlich	160	91,4%	110	67,9%	52	32,1%	
Altersgruppe	< 65 Jahre	90	53,6%	56	63,6%	32	36,4%	0,512
	≥ 65 Jahre	78	46,4%	54	68,4%	25	31,6%	
Tumorstadium	pT1	24	13,7	21	75,0%	7	25,0%	0,448
	pT2	10	5,7%	6	60,0%	4	40,0%	
	pT3	133	76,0%	83	63,8%	47	36,2%	
	pT4	8	4,6%	6	85,7%	1	14,3%	
Lymphknoten Metastasen	pN0	70	40,0%	50	69,4%	22	30,6%	0,563
	pN+	61	34,9%	67	64,4%	37	35,6%	

Differenzierung	1	26	14,9%	1	33,3%	2	66,7%	
	2	18	10,3%	52	74,3%	18	25,7%	
	3	3	2,5%	29	60,4%	19	39,6%	0,124
UICC Stadium	I	67	55,4%	22	66,7%	11	33,3%	
	II	51	42,1%	16	66,7%	8	33,3%	
	III	32	21,6%	40	62,5%	24	37,5%	
	IV	26	17,6%	16	66,7%	8	33,3%	0,965
Neoadjuvante Therapie	Nein	65	43,9%	30	66,7%	15	33,3%	
	Ja	25	16,9%	106	65,8%	55	34,2%	0,890

Tabelle 4 Klinisch-pathologische Charakteristika der Patientenkohorte in Bezug auf miR-221

4.2 DKK2 Expression und Gesamtüberleben

Insgesamt konnte die Expression von DKK2 bei 38 Patienten (21,7%) nachgewiesen werden. In der immunhistochemischen Analyse konnte eine ausschließlich intrazelluläre Färbung nachgewiesen werden (Abb. 5).

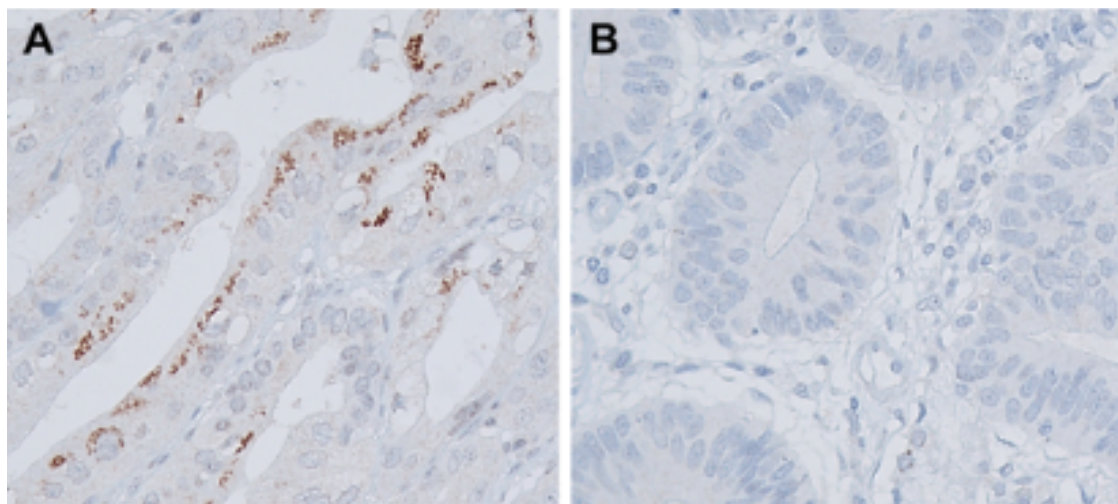


Abbildung 5 Immunhistochemische Färbung auf DKK2 in ösophagealen Adenokarzinomen. (A) Die Verteilung der DKK2-Expression ließ sich ausschließlich intrazellulär darstellen. (B) Beispiel eines Tumors ohne immunhistochemisch nachgewiesene Expression von DKK2

Abb. 6 zeigt beispielhaft die immunhistochemische Evaluation von DDK2 und Einteilung anhand des vom Hersteller empfohlenen Scoring-Schemas durch die Pathologen.

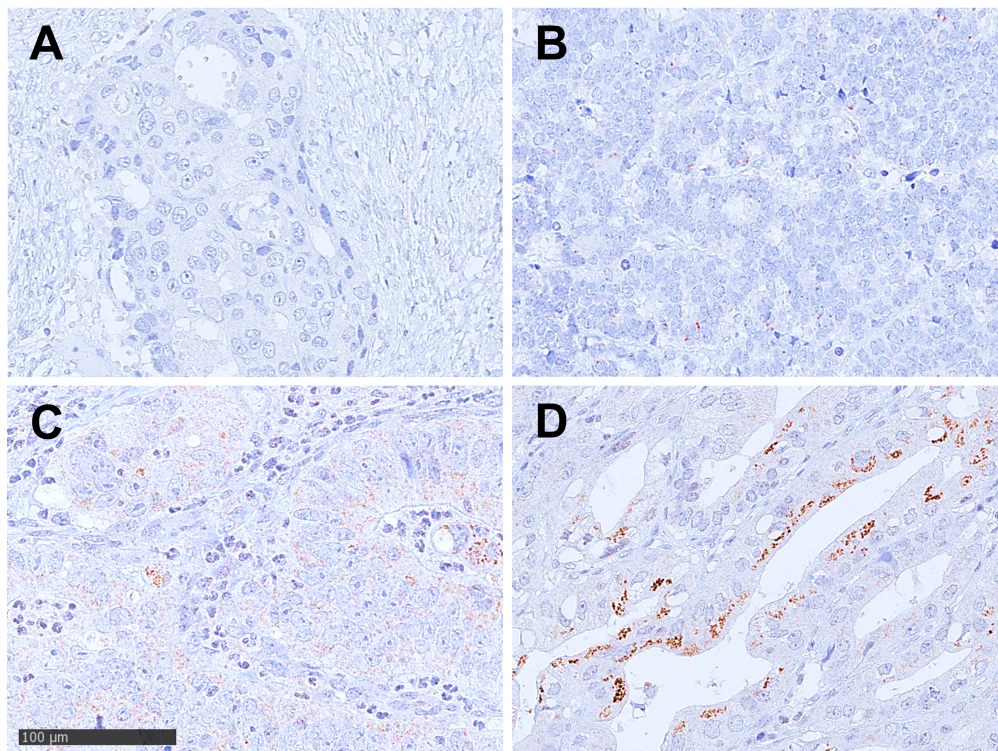


Abbildung 6 Immunhistochemische Färbung auf DDK2 in ösophagealen Adenokarzinomen in Anlehnung an ein 4-Scoring System; Vergrößerung x400. (A) keine Färbung auf DKK2 in den Tumorzellen (Score 0); (B) schwache Färbung auf DKK2 in den Tumorzellen (Score 1+); (C) schwache bis moderate Färbung in den meisten Tumorzellen (Score 2+); (D) starke Färbung auf DKK2 in >30% der Tumorzellen (Score 3+)

In Bezug auf die Überlebenswahrscheinlichkeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied (95% KI 17,11 – 47,23 Monate; p -Wert = 0,694) zwischen den Patienten mit DKK2-Expression (DKK2-positiv) und denen ohne DKK2-Expression (DKK2-negativ) in der Gesamtkohorte (siehe Abb. 7).

In der Patientengruppe, die eine primäre Operation ohne neoadjuvante Therapie erhielten, zeigte sich ein signifikant längeres Gesamtüberleben ($p = 0,012$) für DKK2-positive Patienten. Die DKK2-positive Gruppe zeigte ein Median-Gesamtüberleben von 202 Monaten (95% KI nicht kalkulierbar), während die DKK2-negative Gruppe ein Median-Gesamtüberleben von 55,9 Monaten (95% KI 26,1 – 85,8 Monate).

In der Patientengruppe mit erfolgter neoadjuvanter Therapie zeigte sich ein signifikanter verkürztes Gesamtüberleben der DKK2-positiven Patienten mit im Median 26,2 Monaten (95% KI 13,4 – 39,2 Monate) im Vergleich zu den DKK2-negativen Patienten mit einem Median-Gesamtüberleben von 32,8 Monaten

(95% KI 13,8 – 51,3 Monate; $p = 0,022$) mit einer kalkulierten Hazard Ratio von 1,895 (05% KI 1,120 – 3,208), dargestellt in Abb. 8 und 9.

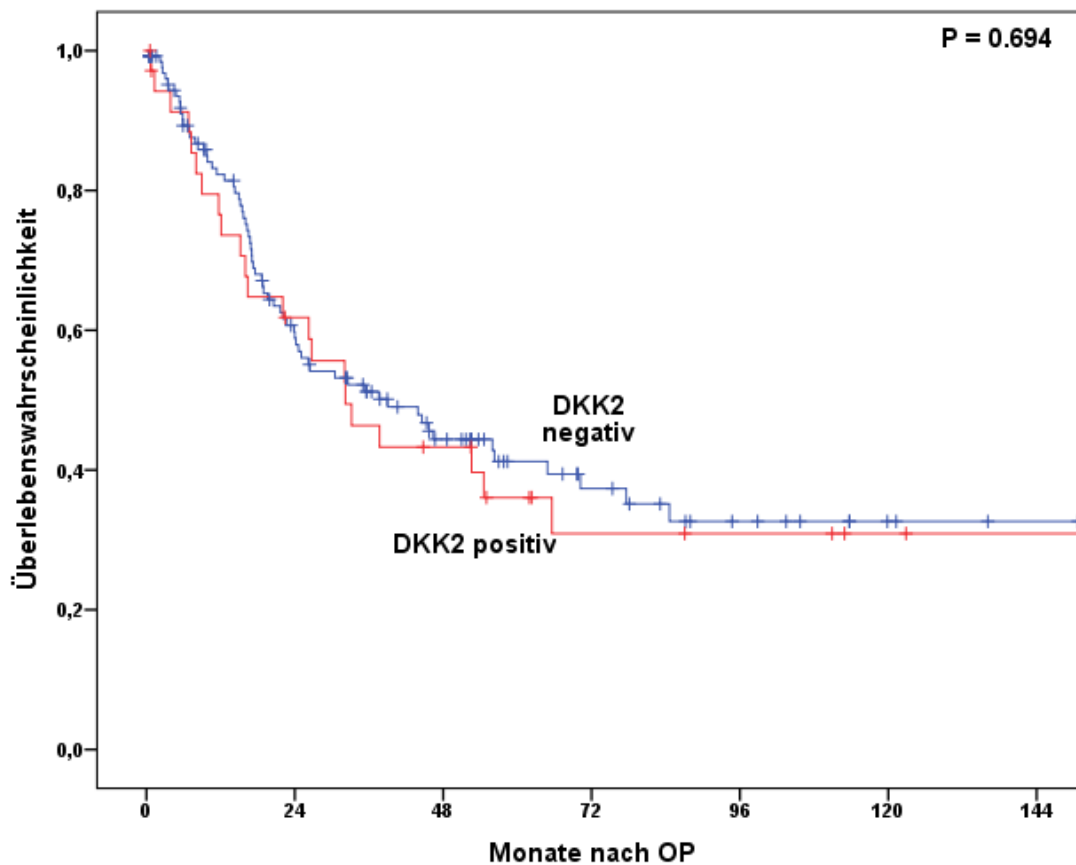


Abbildung 7 Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf Expression von DKK2

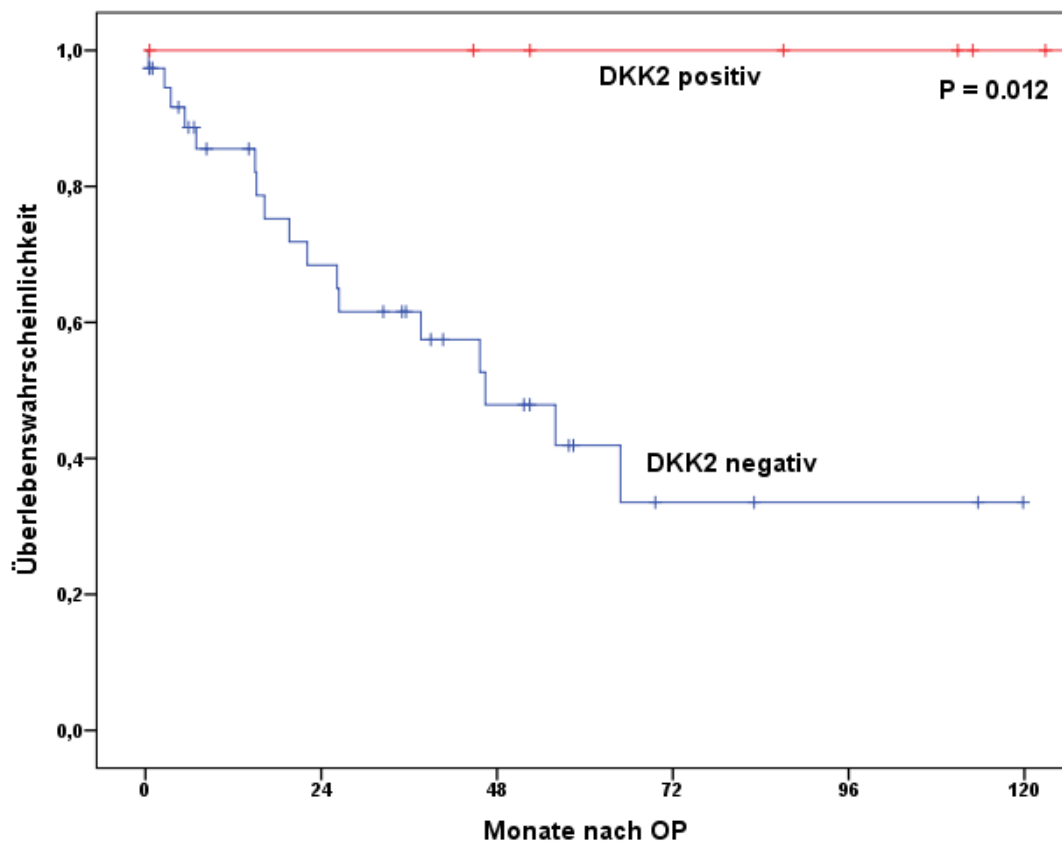


Abbildung 8 Überlebenswahrscheinlichkeit der DKK2 positiven und negativen Patienten nach primärer OP

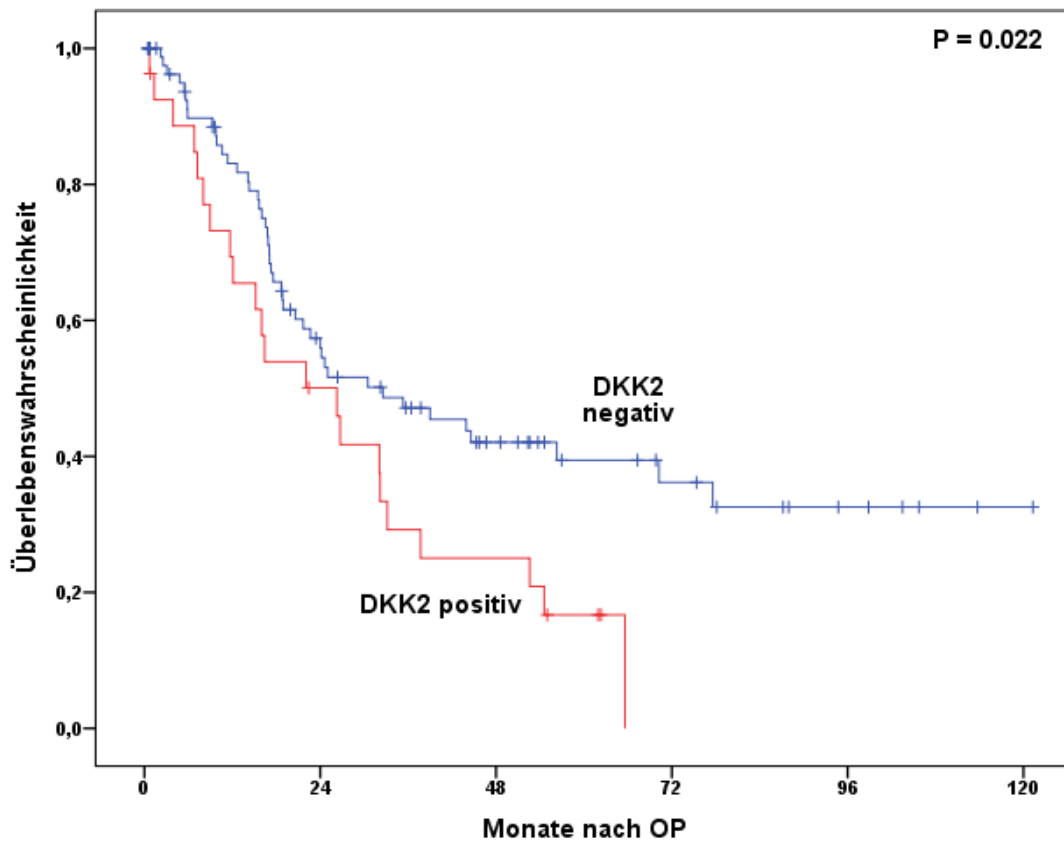


Abbildung 9 Überlebenswahrscheinlichkeit der DKK2 positiven und negativen Patienten nach neoadjuvanter Therapie und anschließender OP

In einer multivariaten Cox-Regressions Analyse stellte sich DKK2 als unabhängiger prognostischer Faktor bei neoadjuvant behandelten Patienten ($p = 0,017$) mit einer kalkulierten Hazard Ratio von 1,895 (95% KI 1,120 – 3,208) dar, nicht jedoch bei den Patienten, die eine primäre Operation erhielten (siehe Tabelle 5 und 6).

Faktor	Primäre Operation			
	Hazard Ratio	95% KI		p -Wert
		Unterer KI	Oberer KI	
Männlich vs. weiblich	9,623	0,001	-	0,994
<65J vs. > 65J	2,163	0,802	5,832	0,127
pT1/2 vs. pT3/4	3,585	0,804	15,974	0,094
pN0 vs. pN+	12,063	2,641	55,104	0,001

Abbildung 10 Überlebenswahrscheinlichkeit der DKK2 positiven und negativen Patienten nach neoadjuvanter Therapie und anschließender OP

Tabelle 5 Multivariate Cox-Regressions-Analyse für Patienten nach primärer OP

Faktor	Neoadjuvante Therapie			
	Hazard Ratio	95% KI		p- Wert
		Unterer KI	Oberer KI	
Männlich vs. weiblich	3,398	1,048	11,002	0,042
<65J vs. > 65J	1,203	0,724	2,000	0,475
pT1/2 vs. pT3/4	1,122	0,541	2,327	0,757
pN0 vs. pN+	2,246	1,284	3,929	0,005
DKK2 neg. vs. Pos.	1,895	1,12	3,208	0,017

Tabelle 6 Multivariate Cox-Regressions-Analyse für Patienten neoadjuvanter Therapie

4.3 miR-221 Ergebnisse und Gesamtüberleben

In der gesamten Patientenkohorte zeigte sich bei 59 Patienten eine Expression von miR-221 (33,5%). Die Anfärbung von miR-221 präsentierte sich ausschließlich intrazellulär, beispielhaft in Abb. 10 dargestellt.

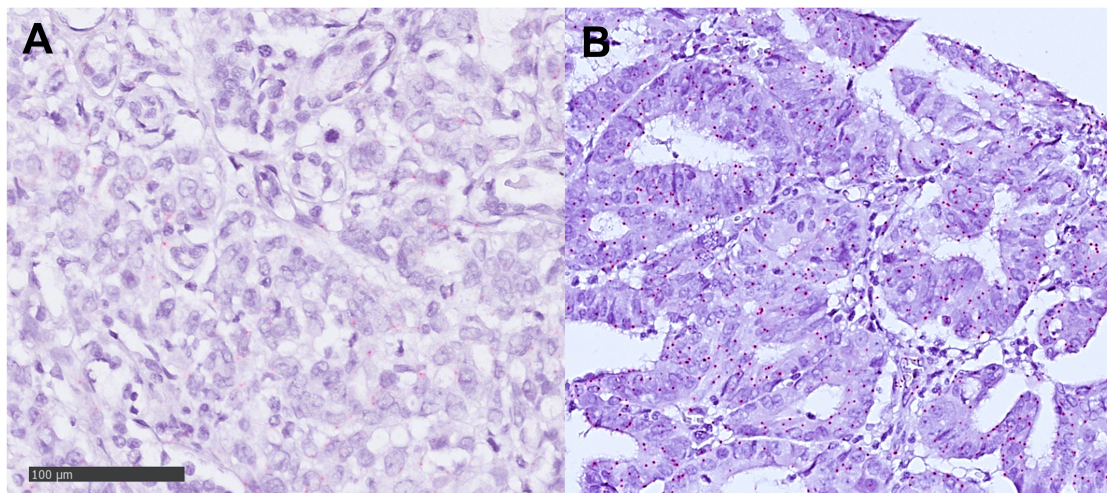


Abbildung 11 RNA-Scope-Analyse auf miR-221 in Adenokarzinomen des Ösophagus, Vergrößerung x 400. (A) negative Tumorzellen mit weniger als 1 roten Signal in 10 Tumorzellen; (B) mi-R221-Expression in Tumorzellen (rote Signale)

Wie bei der Expression von DKK2, zeigte sich auch zwischen der Expression von miR-221 und dem OS der gesamten Patientenkohorte kein signifikanter Unterschied (95% KI 8,92 – 32,63; $p = 0,922$), siehe Abb. 11.

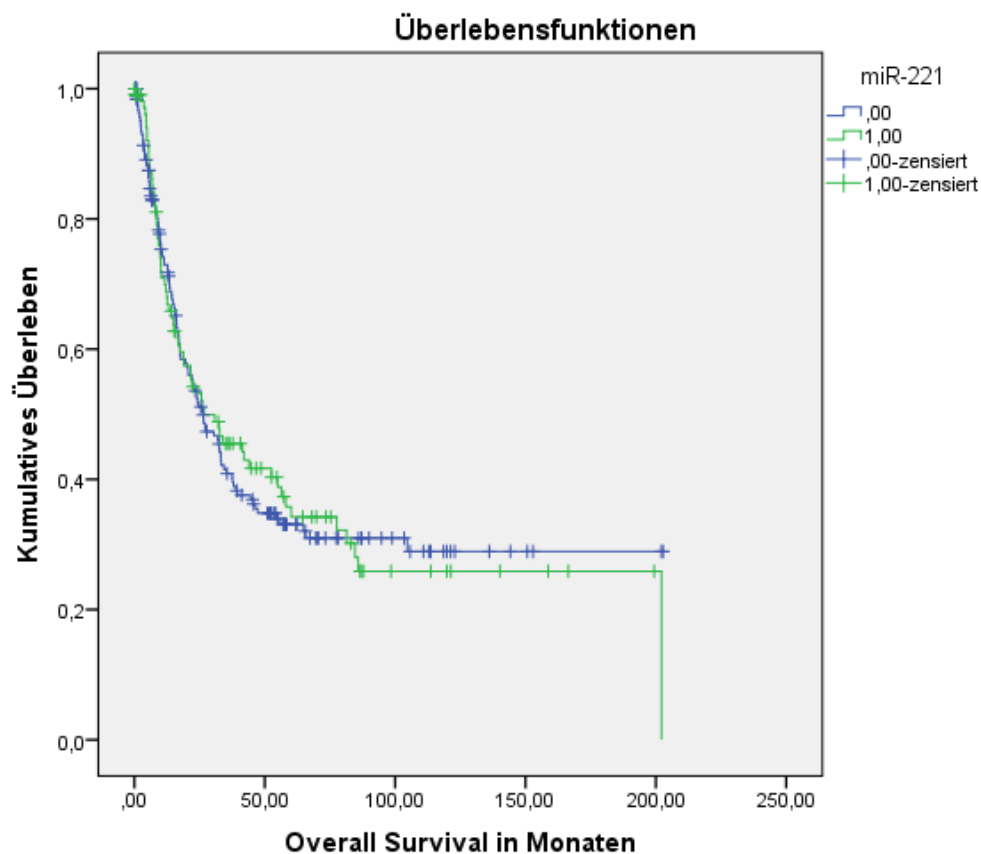


Abbildung 12 Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf Expression von miR-221

Bei der Subgruppenanalyse der Patientengruppe mit primärer OP zeigte sich eine Tendenz hin zu einem verkürzten Gesamtüberleben mit einem Median-OS von 22,1 Monaten (95% KI 13,4 – 30,8 Monate) in miR-221-positiven Patienten im Vergleich zu einem Median OS von 64,9 Monaten (95% KI nicht kalkulierbar) in miR-221-negativen Patienten, diese Tendenz stellte sich jedoch als nicht signifikant heraus ($p = 0,070$), siehe Abb. 12.

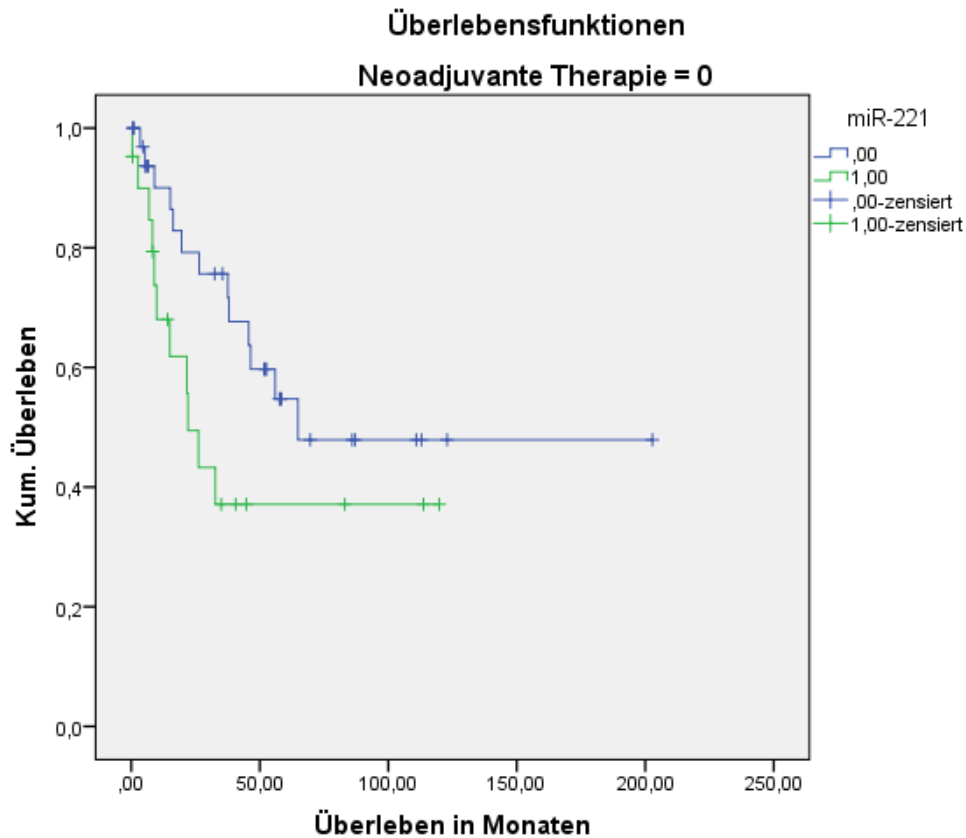


Abbildung 13 Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf Expression von miR-221 bei Patienten nach primärer OP

In der Subgruppenanalyse der Patienten mit neoadjuvanter Therapie zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben im Zusammenhang mit der Expression von miR-221 ($p = 0,819$). Die miR-221-negativen Patienten zeigten ein Median-OS von 22,7 Monaten (95% KI 15,3 – 30,1 Monate) im Vergleich zu einem Median-OS von 21,7 Monaten (95% KI 10,3 – 33,1 Monate) der miR-221-positiven Patienten, siehe Abb. 13.

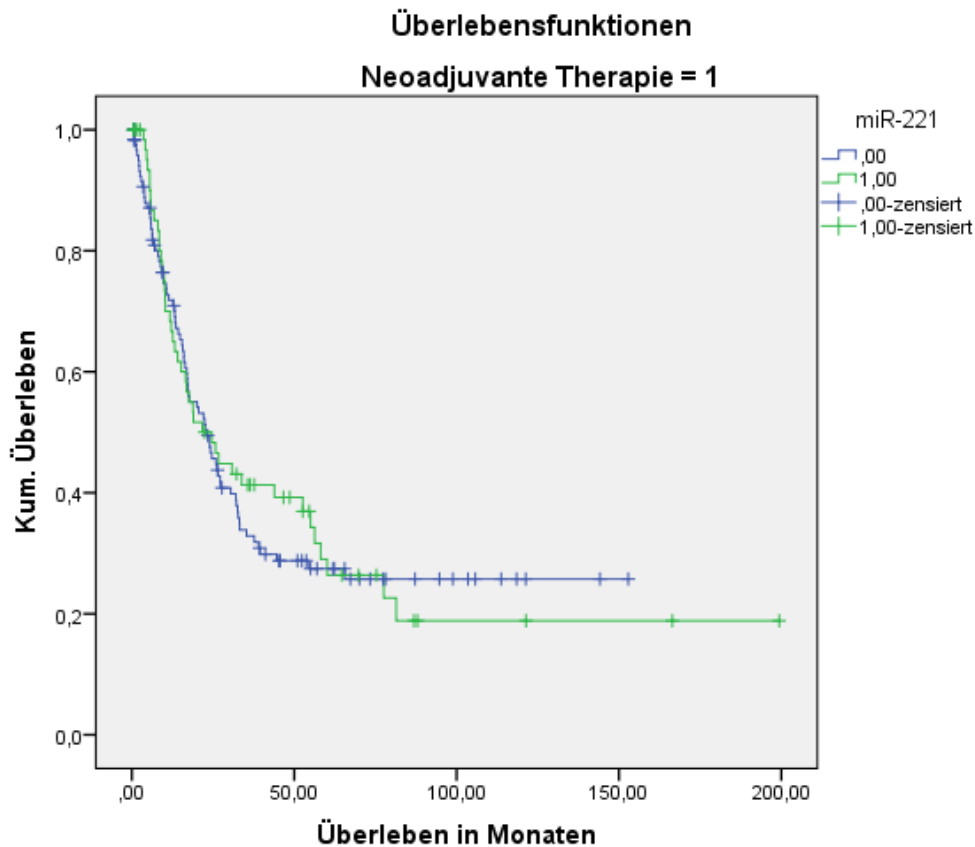


Abbildung 14 Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf Expression von miR-221 bei Patienten nach neoadjuvanter Therapie

5 Diskussion

Trotz großer Fortschritte in der onkologischen Therapie gehört das Ösophaguskarzinom weiterhin zu den aggressivsten Tumoren weltweit. Für das Jahr 2020 wurden knapp 19.000 Neuerkrankungen sowie circa 16.000 Todesfälle prognostiziert [1]. Dies spiegelt den dringenden Forschungsbedarf im Feld des Ösophaguskarzinoms wider. Eine Möglichkeit das Gesamtüberleben dieser Erkrankung zu verbessern, stellt eine verbesserte Stratifizierung der Patienten dar. Es ist heute bekannt, dass eine Vielzahl von Patienten in Rahmen multimodaler Therapiekonzepte behandelt werden, von denen ein signifikanter Anteil nicht von chemo- oder strahlentherapeutischen Konzepten profitiert. Durch eine genauere Bestimmung des individuellen Risikos und eine präzisere Stadieneinteilung könnten Rückschlüsse auf die Therapieansprechraten gezogen werden. Ein Mittel, dies zu realisieren, besteht in der prätherapeutischen Bestimmung von Prognosefaktoren.

Wang et al. untersuchten den Einfluss der miR-221 vermittelten Expression von DKK2 auf die Entstehung von Chemoresistenzen und konnten in ihrer Arbeit an Zellkulturen beweisen, dass die veränderte Expression von miR-221 eine Rolle bei der Progression von Adenokarzinomen des Ösophagus und der Entwicklung von Resistenzen gegen 5-FU-basierte chemotherapeutische Strategien spielt. Sie konnten zeigen, dass miR-221 Einfluss auf die Resistenz gegen 5-FU nimmt, indem es die DKK2 Expression direkt angreift und herab reguliert [4]. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen verschiedener anderer Studien zur Expression von DKK2 bei Patienten mit Magenkarzinom, Kolonkarzinom, Mammakarzinom oder Hepatozellulären Karzinom, in denen sich zeigte, dass DKK2 als Tumorsuppressor agiert, sein Verlust jedoch zur Aktivierung des Wnt-Signalswegs und daraufhin zur Tumorprogression führt [67-72, 78].

Aufbauend auf diesen Ergebnissen untersuchte unsere Studie den Einfluss der Expression von miR-221 und DKK2 in Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus in einem großen Patientenkollektiv und ob aufgrund dieses Einflusses das individuelle Risiko eines Patienten besser beurteilt werden kann.

Während sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben bei Expression von miR-221 (95% KI 8,92 – 32,63; $p = 0,922$) oder von DKK2 (95% KI 17,11 – 47,23; p -Wert = 0,694) für die Gesamtkohorte zeigte, konnten wir eine signifikante Verminderung des Gesamtüberlebens für neoadjuvant behandelte Patienten mit einer vermehrten DKK2 Expression zeigen (kalkulierte Hazard Ratio 1,895 (95% KI 1,120 – 3,208, p -Wert = 0,017)). Auch für die Expression von miR-221 bei neoadjuvant behandelten Patienten zeigte sich ein ähnlicher Trend. Dies stimmt mit oben genannten Ergebnissen zur miR-221- und DKK2-vermittelten Entwicklung von Chemoresistenzen überein.

Interessanterweise gestaltete sich dieser Zusammenhang genau umgekehrt in der Patientengruppe, die eine primäre Operation ohne neoadjuvante RCT erhielten. Hier zeigte sich ein verlängertes Gesamtüberleben von 202 Monaten im Gegensatz zu 55,9 Monaten. Dies lässt vermuten, dass eine neoadjuvante RCT die eigentlich tumorsuppressive Wirkung von DKK2 umzukehren und zu einem verminderten Gesamtüberleben zu führen scheint. Die dieser Wirkung zugrundeliegenden Mechanismen könnten in einer prospektiven Studie anhand von endoskopischen Biopsien untersucht werden.

Die Gründe für dieses beobachtete Phänomen sind anhand der aktuell vorliegenden Daten nicht abschließend zu beurteilen. Die durchgeführten Analysen erlauben derzeit keine Aussage über mögliche dynamische Regulationsvorgänge von DKK2 im Rahmen der Tumorprogression unter der Durchführung einer neoadjuvanten Therapie. Von daher ist es durch die hier durchgeführten Analysen nicht möglich zu unterscheiden, ob die nachgewiesenen Überlebensunterschiede in Abhängigkeit der neoadjuvanten Therapie durch die RCT induziert wurden oder ob es sich a priori um ein grundlegend unterschiedliches biologisches Verhalten in Abhängigkeit der DKK2 Expression handelt.

Es muss festgehalten werden, dass die bisherige Annahme der alleinigen Inhibition des Wnt-pathways durch DKK2 in der Form wahrscheinlich ein vereinfachtes Modell darstellt und die Regulationsmechanismen in der Tumorzelle komplexer sind als bislang angenommen. Eine aktuelle Studie zum CRC konnte einen Zusammenhang zwischen der Inhibition von natürlichen Killerzellen und CD8-positiven T-Zellen in Abhängigkeit von DKK2 nachweisen [79]. Inwiefern diese Aspekte beim Ösophaguskarzinom, insbesondere in Hinblick auf verabreichte perioperative Therapieschemata, eine Rolle spielen, ist zum aktuellen Zeitpunkt spekulativ. Die im CRC nachgewiesenen Effekte zeigen jedoch, dass die durch DKK2 vermittelten intrazellulären Effekte multipel reguliert sind und der Einfluss von DKK2 auf die Tumorprogression kontextabhängig bewertet werden muss. Das Beispiel der DKK2 Expression zeigt daher eindrücklich, dass die Ergebnisse der Expression von Tumormarkern immer im klinischen Kontext gesehen werden müssen. Dies gilt insbesondere bei Tumoren, welche im Rahmen neoadjuvanter Therapiekonzepte ausgeprägte epigenetischen Änderungen unterliegen.

Während in unserer Studie retrospektiv die Expression von miR-221 und DKK2 im Tumorgewebe nachgewiesen wurde, untersuchten Yau et al. eine andere Möglichkeit, miR-221 als Prognosefaktor zu verwenden: sie wiesen einen Zusammenhang zwischen der Entstehung eines CRC und dem Serumspiegel von miR-221 nach und schlussfolgerten, dass miR-221 als nicht-invasiver Biomarker für die Detektion eines CRC genutzt werden könne [64]. Dies

erscheint auch für das Adenokarzinom des Ösophagus ein interessanter Ansatz zu sein, der ebenfalls Gegenstand zukünftiger Studien sein könnte.

Auch die sich aus den Ergebnissen zur diagnostischen Relevanz der Biomarker miR-221 und DKK2 ergebende potentielle therapeutische Relevanz stellt ein weiteres aussichtsreiches Forschungsthema dar. Dieses wurde von Farazi et al. in einem 2013 veröffentlichten Paper bereits angerissen [53]. Auch Di Martino und Kollegen beziehen sich in ihrem Review [80] auf vielversprechende Daten zu therapeutischen Möglichkeiten in der onkologischen Therapie durch Inhibition von miR-221 im HCC und Pankreaskarzinom [81, 82], was darauf hinweist, dass ähnliche Ansätze in der Therapie des Adenokarzinoms des Ösophagus möglich sein könnten.

Unsere Arbeit konnte zeigen, dass die Expression von DKK2 und miR-221 mit einem verminderten Gesamtüberleben bei neoadjuvant vorbehandelten Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus verbunden ist. Weiterführende Arbeiten zu diesem Thema sollten auf die genaue Untersuchung des Einflusses dieser beiden Faktoren auf das histo-pathologische Ansprechen in einer großen Patientenkohorte abzielen. Des Weiteren stellt die Erörterung von nicht nur diagnostischen, sondern auch von therapeutischen Möglichkeiten im Zusammenhang mit DKK2 und miR-221 einen interessanten Ansatzpunkt dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2020*. CA Cancer J Clin, 2020. 70(1): p. 7-30.
2. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2015*. CA Cancer J Clin, 2015. 65(1): p. 5-29.
3. Lagergren, J., E. Smyth, D. Cunningham, and P. Lagergren, *Oesophageal cancer*. Lancet, 2017. 390(10110): p. 2383-2396.
4. Wang, Y. and e. al., *miR-221 Mediates Chemoresistance of Esophageal Adenocarcinoma by Direct Targeting of DKK2 Expression*. Annals of Surgery, 2016: p. 804-814.
5. Rubenstein, J.H. and J.B. Taylor, *Meta-analysis: the association of oesophageal adenocarcinoma with symptoms of gastro-oesophageal reflux*. Aliment Pharmacol Ther, 2010. 32(10): p. 1222-7.
6. Tramacere, I., C. La Vecchia, and E. Negri, *Tobacco smoking and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma: a meta-analysis*. Epidemiology, 2011. 22(3): p. 344-9.
7. Sewram, V., F. Sitas, D. O'Connell, and J. Myers, *Tobacco and alcohol as risk factors for oesophageal cancer in a high incidence area in South Africa*. Cancer Epidemiol, 2016. 41: p. 113-21.
8. Choi, Y.J., S.K. Myung, and J.H. Lee, *Light Alcohol Drinking and Risk of Cancer: A Meta-Analysis of Cohort Studies*. Cancer Res Treat, 2018. 50(2): p. 474-487.
9. Turati, F., I. Tramacere, C. La Vecchia, and E. Negri, *A meta-analysis of body mass index and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma*. Ann Oncol, 2013. 24(3): p. 609-17.
10. Guh, D.P., W. Zhang, N. Bansback, Z. Amarsi, C.L. Birmingham, and A.H. Anis, *The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis*. BMC Public Health, 2009. 9: p. 88.
11. Ryan, A.M., M. Duong, L. Healy, S.A. Ryan, N. Parekh, J.V. Reynolds, and D.G. Power, *Obesity, metabolic syndrome and esophageal adenocarcinoma: epidemiology, etiology and new targets*. Cancer Epidemiol, 2011. 35(4): p. 309-19.
12. Leeuwenburgh, I., P. Scholten, J. Alderliesten, H.W. Tilanus, C.W. Looman, E.W. Steijerberg, and E.J. Kuipers, *Long-term esophageal cancer risk in patients with primary achalasia: a prospective study*. Am J Gastroenterol, 2010. 105(10): p. 2144-9.

13. Lagergren, J., R. Bergstrom, A. Lindgren, and O. Nyren, *Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma*. *N Engl J Med*, 1999. 340(11): p. 825-31.
14. Desai, T.K., K. Krishnan, N. Samala, J. Singh, J. Cluley, S. Perla, and C.W. Howden, *The incidence of oesophageal adenocarcinoma in non-dysplastic Barrett's oesophagus: a meta-analysis*. *Gut*, 2012. 61(7): p. 970-6.
15. *S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus, Langversion 2.0, 2018, AWMF Registernummer: 021/023OL*, ed. L. Onkologie. 2015: Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF).
16. Hori, K., H. Okada, Y. Kawahara, R. Takenaka, S. Shimizu, Y. Ohno, T. Onoda, Y. Sirakawa, Y. Naomoto, and K. Yamamoto, *Lugol-voiding lesions are an important risk factor for a second primary squamous cell carcinoma in patients with esophageal cancer or head and neck cancer*. *Am J Gastroenterol*, 2011. 106(5): p. 858-66.
17. Qumseya, B.J., H. Wang, N. Badie, R.N. Uzomba, S. Parasa, D.L. White, H. Wolfsen, P. Sharma, and M.B. Wallace, *Advanced imaging technologies increase detection of dysplasia and neoplasia in patients with Barrett's esophagus: a meta-analysis and systematic review*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013. 11(12): p. 1562-70 e1-2.
18. Thosani, N., H. Singh, A. Kapadia, N. Ochi, J.H. Lee, J. Ajani, S.G. Swisher, W.L. Hofstetter, S. Guha, and M.S. Bhutani, *Diagnostic accuracy of EUS in differentiating mucosal versus submucosal invasion of superficial esophageal cancers: a systematic review and meta-analysis*. *Gastrointest Endosc*, 2012. 75(2): p. 242-53.
19. Luo, L.N., L.J. He, X.Y. Gao, X.X. Huang, H.B. Shan, G.Y. Luo, Y. Li, S.Y. Lin, G.B. Wang, R. Zhang, G.L. Xu, and J.J. Li, *Endoscopic Ultrasound for Preoperative Esophageal Squamous Cell Carcinoma: a Meta-Analysis*. *PLoS One*, 2016. 11(7): p. e0158373.
20. Ba-Ssalamah, A., W. Matzek, S. Baroud, N. Bastati, J. Zacherl, S.F. Schoppmann, M. Hejna, F. Wrba, M. Weber, C.J. Herold, and R.M. Gore, *Accuracy of hydro-multidetector row CT in the local T staging of oesophageal cancer compared to postoperative histopathological results*. *Eur Radiol*, 2011. 21(11): p. 2326-35.
21. Choi, J., S.G. Kim, J.S. Kim, H.C. Jung, and I.S. Song, *Comparison of endoscopic ultrasonography (EUS), positron emission tomography (PET), and*

computed tomography (CT) in the preoperative locoregional staging of resectable esophageal cancer. Surg Endosc, 2010. 24(6): p. 1380-6.

22. Findlay, J.M., K.M. Bradley, E.J. Maile, B. Braden, J. Maw, J. Phillips-Hughes, R.S. Gillies, N.D. Maynard, and M.R. Middleton, *Pragmatic staging of oesophageal cancer using decision theory involving selective endoscopic ultrasonography, PET and laparoscopy. Br J Surg, 2015. 102(12): p. 1488-99.*

23. van Vliet, E.P., M.H. Heijenbrok-Kal, M.G. Hunink, E.J. Kuipers, and P.D. Siersema, *Staging investigations for oesophageal cancer: a meta-analysis. Br J Cancer, 2008. 98(3): p. 547-57.*

24. Sjoquist, K.M., B.H. Burmeister, B.M. Smithers, J.R. Zalcberg, R.J. Simes, A. Barbour, V. Gebski, and G. Australasian Gastro-Intestinal Trials, *Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis. Lancet Oncol, 2011. 12(7): p. 681-92.*

25. Pech, O., E. Bollschweiler, H. Manner, J. Leers, C. Ell, and A.H. Holscher, *Comparison between endoscopic and surgical resection of mucosal esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus at two high-volume centers. Ann Surg, 2011. 254(1): p. 67-72.*

26. Manner, H., O. Pech, Y. Heldmann, A. May, J. Pohl, A. Behrens, L. Gossner, M. Stolte, M. Vieth, and C. Ell, *Efficacy, safety, and long-term results of endoscopic treatment for early stage adenocarcinoma of the esophagus with low-risk sm1 invasion. Clin Gastroenterol Hepatol, 2013. 11(6): p. 630-5; quiz e45.*

27. Pech, O., A. May, H. Manner, A. Behrens, J. Pohl, M. Weferling, U. Hartmann, N. Manner, J. Huijsmans, L. Gossner, T. Rabenstein, M. Vieth, M. Stolte, and C. Ell, *Long-term efficacy and safety of endoscopic resection for patients with mucosal adenocarcinoma of the esophagus. Gastroenterology, 2014. 146(3): p. 652-660 e1.*

28. Omae, M., J. Fujisaki, Y. Horiuchi, N. Yoshizawa, Y. Matsuo, M. Kubota, T. Suganuma, K. Okada, A. Ishiyama, T. Hirasawa, Y. Yamamoto, T. Tsuchida, E. Hoshino, and M. Igarashi, *Safety, efficacy, and long-term outcomes for endoscopic submucosal dissection of early esophagogastric junction cancer. Gastric Cancer, 2013. 16(2): p. 147-54.*

29. Fitzgerald, R.C., M. di Pietro, K. Ragnath, Y. Ang, J.Y. Kang, P. Watson, N. Trudgill, P. Patel, P.V. Kaye, S. Sanders, M. O'Donovan, E. Bird-Lieberman, P. Bhandari, J.A. Jankowski, S. Attwood, S.L. Parsons, D. Loft, J. Lagergren, P. Moayyedi, G. Lyraopoulos, and J. de Caestecker, *British Society of Gastroenterology*

- guidelines on the diagnosis and management of Barrett's oesophagus*. Gut, 2014. 63(1): p. 7-42.
30. Li, B., J. Xiang, Y. Zhang, H. Li, J. Zhang, Y. Sun, H. Hu, L. Miao, L. Ma, X. Luo, S. Chen, T. Ye, and H. Chen, *Comparison of Ivor-Lewis vs Sweet esophagectomy for esophageal squamous cell carcinoma: a randomized clinical trial*. JAMA Surg, 2015. 150(4): p. 292-8.
31. Omloo, J.M., S.M. Lagarde, J.B. Hulscher, J.B. Reitsma, P. Fockens, H. van Dekken, F.J. Ten Kate, H. Obertop, H.W. Tilanus, and J.J. van Lanschot, *Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the mid/distal esophagus: five-year survival of a randomized clinical trial*. Ann Surg, 2007. 246(6): p. 992-1000; discussion 1000-1.
32. van Workum, F., J. van der Maas, F.J. van den Wildenberg, F. Polat, E.A. Kouwenhoven, M.J. van Det, G.A. Nieuwenhuijzen, M.D. Luyer, and C. Rosman, *Improved Functional Results After Minimally Invasive Esophagectomy: Intrathoracic Versus Cervical Anastomosis*. Ann Thorac Surg, 2017. 103(1): p. 267-273.
33. Kutup, A., M.F. Nentwich, E. Bollschweiler, D. Bogoevski, J.R. Izbicki, and A.H. Holscher, *What should be the gold standard for the surgical component in the treatment of locally advanced esophageal cancer: transthoracic versus transhiatal esophagectomy*. Ann Surg, 2014. 260(6): p. 1016-22.
34. Peyre, C.G., J.A. Hagen, S.R. DeMeester, N.K. Altorki, E. Ancona, S.M. Griffin, A. Holscher, T. Lerut, S. Law, T.W. Rice, A. Ruol, J.J. van Lanschot, J. Wong, and T.R. DeMeester, *The number of lymph nodes removed predicts survival in esophageal cancer: an international study on the impact of extent of surgical resection*. Ann Surg, 2008. 248(4): p. 549-56.
35. Biere, S.S., M.I. van Berge Henegouwen, K.W. Maas, L. Bonavina, C. Rosman, J.R. Garcia, S.S. Gisbertz, J.H. Klinkenbijn, M.W. Hollmann, E.S. de Lange, H.J. Bonjer, D.L. van der Peet, and M.A. Cuesta, *Minimally invasive versus open oesophagectomy for patients with oesophageal cancer: a multicentre, open-label, randomised controlled trial*. Lancet, 2012. 379(9829): p. 1887-92.
36. Ychou, M., V. Boige, J.P. Pignon, T. Conroy, O. Bouche, G. Lebreton, M. Ducourtieux, L. Bedenne, J.M. Fabre, B. Saint-Aubert, J. Geneve, P. Lasser, and P. Rougier, *Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial*. J Clin Oncol, 2011. 29(13): p. 1715-21.

37. Shapiro, J., J.J.B. van Lanschot, M. Hulshof, P. van Hagen, M.I. van Berge Henegouwen, B.P.L. Wijnhoven, H.W.M. van Laarhoven, G.A.P. Nieuwenhuijzen, G.A.P. Hospers, J.J. Bonenkamp, M.A. Cuesta, R.J.B. Blaisse, O.R.C. Busch, F.J.W. Ten Kate, G.M. Creemers, C.J.A. Punt, J.T.M. Plukker, H.M.W. Verheul, E.J.S. Bilgen, H. van Dekken, M.J.C. van der Sangen, T. Rozema, K. Biermann, J.C. Beukema, A.H.M. Piet, C.M. van Rij, J.G. Reinders, H.W. Tilanus, E.W. Steyerberg, and A. van der Gaast, *Neoadjuvant chemoradiotherapy plus surgery versus surgery alone for oesophageal or junctional cancer (CROSS): long-term results of a randomised controlled trial*. *Lancet Oncol*, 2015. 16(9): p. 1090-1098.
38. Cunningham, D., W.H. Allum, S.P. Stenning, J.N. Thompson, C.J. Van de Velde, M. Nicolson, J.H. Scarffe, F.J. Lofts, S.J. Falk, T.J. Iveson, D.B. Smith, R.E. Langley, M. Verma, S. Weeden, Y.J. Chua, and M.T. Participants, *Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer*. *N Engl J Med*, 2006. 355(1): p. 11-20.
39. Al-Batran, S.E., N. Homann, C. Pauligk, T.O. Goetze, J. Meiler, S. Kasper, H.G. Kopp, F. Mayer, G.M. Haag, K. Luley, U. Lindig, W. Schmiegel, M. Pohl, J. Stoehlmacher, G. Folprecht, S. Probst, N. Prasnika, W. Fischbach, R. Mahlberg, J. Trojan, M. Koenigsmann, U.M. Martens, P. Thuss-Patience, M. Egger, A. Block, V. Heinemann, G. Illerhaus, M. Moehler, M. Schenk, F. Kullmann, D.M. Behringer, M. Heike, D. Pink, C. Teschendorf, C. Lohr, H. Bernhard, G. Schuch, V. Rethwisch, L.F. von Weikersthal, J.T. Hartmann, M. Kneba, S. Daum, K. Schulmann, J. Weniger, S. Belle, T. Gaiser, F.S. Oduncu, M. Guntner, W. Hozaeel, A. Reichart, E. Jager, T. Kraus, S. Monig, W.O. Bechstein, M. Schuler, H. Schmalenberg, and R.D. Hofheinz, *Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial*. *Lancet*, 2019. 393(10184): p. 1948-1957.
40. van Hagen, P., M.C. Hulshof, J.J. van Lanschot, E.W. Steyerberg, M.I. van Berge Henegouwen, B.P. Wijnhoven, D.J. Richel, G.A. Nieuwenhuijzen, G.A. Hospers, J.J. Bonenkamp, M.A. Cuesta, R.J. Blaisse, O.R. Busch, F.J. ten Kate, G.J. Creemers, C.J. Punt, J.T. Plukker, H.M. Verheul, E.J. Spillenaar Bilgen, H. van Dekken, M.J. van der Sangen, T. Rozema, K. Biermann, J.C. Beukema, A.H. Piet, C.M. van Rij, J.G. Reinders, H.W. Tilanus, and A. van der Gaast, *Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer*. *N Engl J Med*, 2012. 366(22): p. 2074-84.

41. Conroy, T., M.P. Galais, J.L. Raoul, O. Bouche, S. Gourgou-Bourgade, J.Y. Douillard, P.L. Etienne, V. Boige, I. Martel-Lafay, P. Michel, C. Llacer-Moscardo, E. Francois, G. Crehange, M.B. Abdelghani, B. Juzyna, L. Bedenne, and A. Adenis, *Definitive chemoradiotherapy with FOLFOX versus fluorouracil and cisplatin in patients with oesophageal cancer (PRODIGE5/ACCORD17): final results of a randomised, phase 2/3 trial*. *Lancet Oncol*, 2014. 15(3): p. 305-14.
42. Chang, D.T., C. Chapman, J. Shen, Z. Su, and A.C. Koong, *Treatment of esophageal cancer based on histology: a surveillance epidemiology and end results analysis*. *Am J Clin Oncol*, 2009. 32(4): p. 405-10.
43. Karran, A., P. Blake, D. Chan, T.D. Reid, I.L. Davies, M. Kelly, S.A. Roberts, T. Crosby, and W.G. Lewis, *Propensity score analysis of oesophageal cancer treatment with surgery or definitive chemoradiotherapy*. *Br J Surg*, 2014. 101(5): p. 502-10.
44. Gkika, E., T. Gauler, W. Eberhardt, M. Stahl, M. Stuschke, and C. Pottgen, *Long-term results of definitive radiochemotherapy in locally advanced cancers of the cervical esophagus*. *Dis Esophagus*, 2014. 27(7): p. 678-84.
45. Ohri, N., M.K. Garg, S. Aparo, A. Kaubisch, W. Tome, T.J. Kennedy, S. Kalnicki, and C. Guha, *Who benefits from adjuvant radiation therapy for gastric cancer? A meta-analysis*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013. 86(2): p. 330-5.
46. Bollschweiler, E. and e. al., *Neoadjuvant treatment for advanced esophageal cancer: response assessment before surgery and how to predict response to chemoradiation before starting treatment*. 2015: p. 221-230.
47. Abate, E., S.R. DeMeester, J. Zehetner, A. Oezcelik, S. Ayazi, J. Costales, F. Banki, J.C. Lipham, J.A. Hagen, and T.R. DeMeester, *Recurrence after esophagectomy for adenocarcinoma: defining optimal follow-up intervals and testing*. *J Am Coll Surg*, 2010. 210(4): p. 428-35.
48. Bertz, J., S. Dahm, J. Haberland, K. Kraywinkel, B.-M. Kurth, and U. Wolf, *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 2010, Robert-Koch-Institut.
49. Bollschweiler, E. and e. al., *Molecular Markers for the Prediction of Minor Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Esophageal Cancer*. *Annals of Surgery*, 2016: p. 839-846.
50. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. 116(2): p. 281-97.

51. Kawakita, A. and e. al., *MicroRNA-21 Promotes Oral Cancer Invasion via the Wnt/ β -Catenin Pathway by Targeting DKK2*. Pathology and Oncology Research, 2014: p. 253-261.
52. Tsuchiya, S., Y. Okuno, and G. Tsujimoto, *MicroRNA: biogenetic and functional mechanisms and involvements in cell differentiation and cancer*. J Pharmacol Sci, 2006. 101(4): p. 267-70.
53. Farazi, T.A., J.I. Hoell, P. Morozov, and T. Tuschl, *MicroRNAs in human cancer*. Adv Exp Med Biol, 2013. 774: p. 1-20.
54. Galardi, S., N. Mercatelli, E. Giorda, S. Massalini, G.V. Frajese, S.A. Ciafre, and M.G. Farace, *miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1*. J Biol Chem, 2007. 282(32): p. 23716-24.
55. Fornari, F., L. Gramantieri, M. Ferracin, A. Veronese, S. Sabbioni, G.A. Calin, G.L. Grazi, C. Giovannini, C.M. Croce, L. Bolondi, and M. Negrini, *MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2008. 27(43): p. 5651-61.
56. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. Science, 2002. 297(5589): p. 2056-60.
57. Garofalo, M., C. Quintavalle, G. Romano, C.M. Croce, and G. Condorelli, *miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy*. Curr Mol Med, 2012. 12(1): p. 27-33.
58. Lu, J., G. Getz, E.A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B.L. Ebert, R.H. Mak, A.A. Ferrando, J.R. Downing, T. Jacks, H.R. Horvitz, and T.R. Golub, *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. 435(7043): p. 834-8.
59. Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, and V.N. Kim, *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. 425(6956): p. 415-9.
60. Gregory, R.I., K.P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch, and R. Shiekhattar, *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. 432(7014): p. 235-40.
61. Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, and T. Tuschl, *Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs*. Mol Cell, 2004. 15(2): p. 185-97.

62. Liao, D., T. Li, C. Ye, L. Zeng, H. Li, X. Pu, C. Ding, Z. He, and G.L. Huang, *miR-221 inhibits autophagy and targets TP53INP1 in colorectal cancer cells*. *Exp Ther Med*, 2018. 15(2): p. 1712-1717.
63. Sarlinova, M., M. Halasa, D. Mistuna, L. Musak, R. Iliev, O. Slaby, J. Mazuchova, V. Valentova, L. Plank, and E. Halasova, *miR-21, miR-221 and miR-150 Are Deregulated in Peripheral Blood of Patients with Colorectal Cancer*. *Anticancer Res*, 2016. 36(10): p. 5449-5454.
64. Yau, T.O., C.W. Wu, Y. Dong, C.M. Tang, S.S. Ng, F.K. Chan, J.J. Sung, and J. Yu, *microRNA-221 and microRNA-18a identification in stool as potential biomarkers for the non-invasive diagnosis of colorectal carcinoma*. *Br J Cancer*, 2014. 111(9): p. 1765-71.
65. Niehrs, C., *Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators*. *Oncogene*, 2006. 25(57): p. 7469-81.
66. Nusse, C.Y.L.a.R., *THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE*. *AR Reviews in Advance*, 2004: p. 781-810.
67. Maass, T., J. Marquardt, J.S. Lee, M. Krupp, P. Scholz-Kreisel, C. Mogler, P. Schirmacher, M. Muller, H. Westphal, P.R. Galle, and A. Teufel, *Increased liver carcinogenesis and enrichment of stem cell properties in livers of Dickkopf 2 (Dkk2) deleted mice*. *Oncotarget*, 2016. 7(20): p. 28903-13.
68. Wang, L., H. Wang, X. Duan, P. Dai, and J. Li, *Comprehensive Analysis of the Canonical and Non-canonical Wnt Signaling Pathways in Gastric Cancer*. *Dig Dis Sci*, 2019. 64(10): p. 2830-2842.
69. Lin, Y.F., L.H. Li, C.H. Lin, M.H. Tsou, M.T. Chuang, K.M. Wu, T.L. Liao, J.C. Li, W.J. Wang, A. Tomita, B. Tomita, S.F. Huang, and S.F. Tsai, *Selective Retention of an Inactive Allele of the DKK2 Tumor Suppressor Gene in Hepatocellular Carcinoma*. *PLoS Genet*, 2016. 12(5): p. e1006051.
70. Mu, J., T. Hui, B. Shao, L. Li, Z. Du, L. Lu, L. Ye, S. Li, Q. Li, Q. Xiao, Z. Qiu, Y. Zhang, J. Fan, G. Ren, Q. Tao, and T. Xiang, *Dickkopf-related protein 2 induces G0/G1 arrest and apoptosis through suppressing Wnt/beta-catenin signaling and is frequently methylated in breast cancer*. *Oncotarget*, 2017. 8(24): p. 39443-39459.
71. Wang, C., Y. Yue, B. Shao, Z. Qiu, J. Mu, J. Tang, X. Han, T. Xiang, and G. Ren, *Dickkopf-Related Protein 2 is Epigenetically Inactivated and Suppresses Colorectal Cancer Growth and Tumor Metastasis by Antagonizing Wnt/beta-Catenin Signaling*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. 41(5): p. 1709-1724.

72. Rao, X., G. Di Leva, M. Li, F. Fang, C. Devlin, C. Hartman-Frey, M.E. Burow, M. Ivan, C.M. Croce, and K.P. Nephew, *MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways*. *Oncogene*, 2011. 30(9): p. 1082-97.
73. Schiffmann, L.M., H. Loeser, A.S. Jacob, M. Maus, H. Fuchs, Y. Zhao, L. Tharun, A. Essakly, A. Iannos Damanakis, T. Zander, R. Buttner, W. Schroder, C. Bruns, A. Quaas, and F. Gebauer, *Dickkopf-2 (DKK2) as Context Dependent Factor in Patients with Esophageal Adenocarcinoma*. *Cancers (Basel)*, 2020. 12(2).
74. Simon, R. and G. Sauter, *high-throughput molecular profiling of tumors*. *Experimental Hematology*, 2002: p. 1365-1372.
75. Giltane, J.M. and D.L. Rimm, *Technology Insight: identification of biomarkers with tissue microarray technology*. *Nature Clinical Practice Oncology*, 2004: p. 104-111.
76. Larissa ErbenMing-Xiao HeAnnelies Laeremans, E.P., Andres Buonanno, *A Novel Ultrasensitive In Situ Hybridization Approach to Detect Short Sequences and Splice Variants with Cellular Resolution*. *Molecular Neurobiology*, 2018: p. 6169–6181.
77. Company, G. *How RNA ISH assays can solve the difficulties in other technologies?* 2015 [cited 2019 11.01.2019]; Available from: http://www.genehk.com/rc/news/news_20150327_1.php.
78. Shao, Y.C., X.C. Nie, G.Q. Song, Y. Wei, P. Xia, and X.Y. Xu, *Prognostic value of DKK2 from the Dickkopf family in human breast cancer*. *Int J Oncol*, 2018. 53(6): p. 2555-2565.
79. Xiao, Q., J. Wu, W.J. Wang, S. Chen, Y. Zheng, X. Yu, K. Meeth, M. Sahraei, A.L.M. Bothwell, L. Chen, M. Bosenberg, J. Chen, V. Sexl, L. Sun, L. Li, W. Tang, and D. Wu, *DKK2 imparts tumor immunity evasion through beta-catenin-independent suppression of cytotoxic immune-cell activation*. *Nat Med*, 2018. 24(3): p. 262-270.
80. Di Martino, M.T., M. Rossi, D. Caracciolo, A. Gulla, P. Tagliaferri, and P. Tassone, *Mir-221/222 are promising targets for innovative anticancer therapy*. *Expert Opin Ther Targets*, 2016. 20(9): p. 1099-108.
81. Tanaka, R., M. Tomosugi, M. Horinaka, Y. Sowa, and T. Sakai, *Metformin Causes G1-Phase Arrest via Down-Regulation of MiR-221 and Enhances TRAIL Sensitivity through DR5 Up-Regulation in Pancreatic Cancer Cells*. *PLoS One*, 2015. 10(5): p. e0125779.

82. Moshiri, F., E. Callegari, L. D'Abundo, F. Corra, L. Lupini, S. Sabbioni, and M. Negrini, *Inhibiting the oncogenic mir-221 by microRNA sponge: toward microRNA-based therapeutics for hepatocellular carcinoma*. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2014. 7(1): p. 43-54.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Flussdiagramm zu Diagnose, Staging und Therapie [46].....	16
Abbildung 2 Einfluss von miR-221/222 auf die Entstehung und Progression von Krebs: miR-221/222 agieren als „oncomiRs“ indem sie Tumorsuppressorgene inhibieren. Dadurch induziert die Überexpression von miR-221/222 Zellproliferation. Außerdem nehmen sie Einfluss auf die Entstehung von Chemoresistenzen über Aktivierung des Wnt-β-Catenin-Signalwegs [57].	20
Abbildung 3 Überblick zur Erstellung von TMAs: Passende, archivierte Paraffinblöcke werden herausgesucht. Ein Pathologe wählt die zutreffenden Regionen jedes „Spenderblocks“ (Donor) aus und sticht Stanzzylinder aus. Die Stanzzylinder werden dann in den „Empfängerblock“ (Recipient) übertragen. µm-dünne Scheiben des „Empfängerblocks“ werden geschnitten und auf einen Objektträger gebracht. Hierauf kann dann der Biomarker-Status durch immunhistochemische oder ISH-Verfahren dargestellt werden. Die Biomarker-Expression wird durch manuelle oder automatisierte Analysen bewertet und mit klinischen Informationen verglichen. Der Graf zeigt ein Histogramm und eine Kaplan-Meier Überlebenskurve [75]......	25
Abbildung 4 Ablauf der RNAscope In Situ Hybridisierung: Die Schnitte werden auf Objektträgern fixiert und mit dem RNAscope Pretreatment Kit behandelt, um die Ziel-RNA zu demaskieren. Im zweiten Schritt werden die RNAscope Ziel-RNAs mit 20 genspezifischen Doppel-Z-Proben-Paaren hybridisiert, um die Ziel RNAs darstellen zu können. Es folgt die Amplifikation und immunhistochemische Anfärbung der Schnitte, welche dann mikroskopisch untersucht werden. Die Signale können entweder manuell oder durch eine spezielle Software quantifiziert werden [77]......	26
Abbildung 5 Immunhistochemische Färbung auf DKK2 in ösophagealen Adenokarzinomen. (A) Die Verteilung der DKK2-Expression ließ sich ausschließlich intrazellulär darstellen. (B) Beispiel eines Tumors ohne immunhistochemisch nachgewiesene Expression von DKK2	31
Abbildung 6 Immunhistochemische Färbung auf DKK2 in ösophagealen adenokarzinomen in Anlehnung an ein 4-Scoring System; Vergrößerung x400. (A) keine Färbung auf DKK2 in den Tumorzellen (Score 0); (B) schwache Färbung auf DKK2 in den Tumorzellen (Score 1+); (C) schwache bis moderate Färbung in den meisten Tumorzellen (Score 2+); (D) starke Färbung auf DKK2 in >30% der Tumorzellen (Score 3+)	32
Abbildung 7 Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf Expression von DKK2	33
Abbildung 8 Überlebenswahrscheinlichkeit der DKK2 positiven und negativen Patienten nach primärer OP.....	33

Abbildung 9 Überlebenswahrscheinlichkeit der DKK2 positiven und negativen Patienten nach neoadjuvanter Therapie und anschließender OP.....	34
Abbildung 9 Überlebenswahrscheinlichkeit der DKK2 positiven und negativen Patienten nach neoadjuvanter Therapie und anschließender OP.....	34
Abbildung 10 RNA-Scope-Analyse auf miR-221 in Adenokarzinomen des Ösophagus, Vergrößerung x 400. (A) negative Tumorzellen mit weniger als 1 roten Signal in 10 Tumorzellen; (B) mi-R221-Expression in Tumorzellen (rote Signale).....	35
Abbildung 11 Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf Expression von miR-221	36
Abbildung 12 Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf Expression von miR-221 bei Patienten nach primärer OP.....	37
Abbildung 13 Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf Expression von miR-221 bei Patienten nach neoadjuvanter Therapie	38

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klinische Klassifikation der Ösophaguskarzinome, eingeschlossen Karzinome des ösophagogastralen Übergangs nach der TNM-Klassifikation [15].....	13
Tabelle 2 UICC-Stadien/ 5-Jahres-Überlebensrate [24].....	13
Tabelle 3 Klinisch-pathologische Charakteristika der Patientenkohorte in Bezug auf DKK2.....	30
Tabelle 4 Klinisch-pathologische Charakteristika der Patientenkohorte in Bezug auf miR-221.....	31
Tabelle 5 Multivariate Cox-Regressions-Analyse für Patienten nach primärer OP	34
Tabelle 6 Multivariate Cox-Regressions-Analyse für Patienten neoadjuvanter Therapie	35

8 Vorabveröffentlichung

8.1 Publikation

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in *Cancers* eingereicht und zur Publikation angenommen. Auf den folgenden Seiten ist das Manuskript der Originalpublikation Schiffmann, L. et al. „Dickkopf-2 (DKK2) as Context Dependent Factor in Patients with Esophageal Adenocarcinoma“ abgedruckt.

Dickkopf-2 (DKK2) as prognostic factor in patients with esophageal adenocarcinoma in the context of neoadjuvant treatment

Lars M. Schiffmann^{1*}, Heike Loeser^{2*}, Anne Sophie Jacob¹, Lars Tharun², Ahlem Essakly², Hans Fuchs¹, Christiane Bruns¹, Martin Maus¹, Yue Zaho¹, Wolfgang

Schröder¹, Thomas Zander³, Reinhard Buettner² , Alexander Quaas^{2*}, Florian Gebauer^{1*}

¹ Department of General, Visceral and Cancer Surgery, University of Cologne, Germany

² Institute of Pathology, University of Cologne, Germany

³ Department I of Internal Medicine, Center for Integrated Oncology Aachen Bonn Cologne Duesseldorf; Gastrointestinal Cancer Group Cologne GCGC, University of Cologne, Germany

* contributed equally to this work

Gastrointestinal Cancer Group Cologne (GCGC)

Correspondence:

Florian Gebauer, Department of General, Visceral and Cancer Surgery, University of Cologne, Germany Kerpener Strasse 62, 50937 Cologne, Germany

phone: +49-221-478-4803

Fax:+49-221-478-6258

email: florian.gebauer@uk-koeln.de

running title: DKK2 in esophageal adenocarcinoma

Word count: 3319

Abstract

Background

Dickkopf-2 (DKK2) has been described as Wnt/beta-catenin pathway antagonist and its expression is mediated by micro RNA-221 (miRNA-221). So far, there is only limited data characterizing the role of DKK2 expression in esophageal cancer.

Methods

A tissue micro array of 192 patients with esophageal adenocarcinoma was analyzed immunohistochemically for DKK2, miRNA-221 expression by RNA scope and GATA6 amplification by fluorescence in-situ hybridization. The data was correlated with clinical, pathological and molecular data (TP53, HER2, *c-myc*, *GATA6*, *PIK3CA* and *KRAS* amplifications).

Results

DKK2 expression was detectable in 21.7% and miRNA-221 expression in 33.5% of the patients. We observed no correlation between DKK2 or miRNA-221 expression and clinico-pathological data. DKK2 expression was correlated with TP53 mutations and amplification of *GATA6*. We did not detect a survival difference in dependence of DKK2 for the total cohort, however, in patients without neoadjuvant treatment DKK2 expression correlated with a prolonged survival (median overall-survival 202 vs. 55 months, $p = 0.012$) which turned opposite in patients that underwent neoadjuvant treatment. High amounts of miRNA-221 were in trend associated with a prolonged overall-survival ($p = 0.070$).

Conclusions

DKK2 as a Wnt antagonist is associated with prolonged survival in patients without neoadjuvant treatment and changes its prognostic value to the contrary in patients after neoadjuvant therapy. The modulatory effects of neoadjuvant treatment in connection with DKK2 expression are not fully understood, but when considering DKK2 as a tumor marker, it is necessary to see it in the context of neoadjuvant therapy.

Keywords

response prediction, DKK2, *GATA6*, EAC

Mini-abstract

In this work DKK2 is identified as a complex prognostic factor that is highly relevant in patients with resectable esophageal adenocarcinoma but has to be interpreted carefully and in a context dependent manner.

Introduction

Esophageal adenocarcinoma (EAC) is one of the most lethal malignancies in the gastrointestinal system and overall-survival is hardly improving despite advances in personalized medicine (15). [15]Currently, decisions for or against neoadjuvant treatment regimens are based on clinical parameters obtained during staging routines (15). As treatment response is of immense importance for patient's overall outcome,

ongoing studies focus on optimizing multimodal treatment concepts with the aim to improve response rates and thereby overall survival (2,3). It would be of similar importance to improve our ability to predict response rates to multimodal EAC therapy concepts as of today overall response rates to neoadjuvant treatment are only around 50% and a significant number of patients receive neoadjuvant therapy, which is associated with significant toxicity effects without any benefit for non-responder (4). Dickkopf 2 (DKK2) is a member of the Dickkopf family and was identified as a modulator in the Wnt-beta-catenin pathway via binding of the lipoprotein receptor-related protein 5/6 (5,7). The Wnt-pathway latter has been described to be dysregulated in many human diseases including cancer, and its hyperactivation can lead to aberrant cell growth and tumor progression (8). It was shown that DKK2 expression is modulated by expression of micro RNA-221 (miRNA-221) in esophageal cancer (9). So far, it has been assumed that DKK2 is a Wnt-antagonist and that, accordingly, inactivation of DKK2 increases Wnt activity with accelerating tumor progression.

The aim of the present study was to assess the impact of miRNA-221 and DKK2 expression in EAC in a large patient cohort with respect to correlation with clinical parameters and overall-survival, pathological and molecular data.

Material and Patients

Patients and tumor samples

Formalin-fixed and paraffin embedded material of 192 patients with esophageal adenocarcinomas that underwent primary surgical resection or resection after neoadjuvant therapy between 1999-2014 at the Department of General, Visceral and Cancer Surgery, University of Cologne, Germany were analyzed. The standard surgical procedure consisted of a transthoracic en-bloc esophagectomy with two-field lymphadenectomy (abdominal and mediastinal lymph nodes), reconstruction was done by formation of a gastric tube with intrathoracic esophagogastrostomy (Ivor-Lewis esophagectomy) (10). The abdominal phase was predominantly performed as a laparoscopic procedure (hybrid Ivor-Lewis esophagectomy). Technical details of this operation are described elsewhere (11-13). Patients with locally advanced esophageal cancer (cT3) or evidence for loco regional lymph node metastasis in clinical staging

received preoperative chemoradiation (5-Fluouracil, cisplatin, 40Gy) or chemotherapy. Follow-up data were available for all patients (table 1).

Single spot tissue micro arrays (TMA) were built for immunohistochemical analyses. TMA construction was performed as previously described (20, 21). In brief, tissue cylinders with a diameter of 1.2 mm each were punched from selected tumor tissue blocks using a self-constructed semi-automated precision instrument and embedded in empty recipient paraffin blocks. Four μm sections of the resulting TMA blocks were transferred to an adhesive coated slide system (Instrumedics Inc., Hackensack, NJ) for immunohistochemistry.

Expression of DKK2 was correlated with molecular profiles of EAC including analysis of TP53, Her2, c-myc, GATA6, *PIK3CA* mutations and *KRAS* amplification.

Immunohistochemistry for DKK2

Immunohistochemistry (IHC) was performed on TMA slides using the DKK2 rabbit IgG polyclonal antibody (ab38594; dilution 1:200; Abcam, UK). All immunohistochemical stainings were performed using the Leica BOND-MAX stainer (Leica Biosystems, Germany) according to the protocol of the manufacturer.

The TMA was scored manual by two pathologists (A.Q. and H.L.) according to a 4-tier-scoring system. We defined Score 3+ as a strong staining of $\geq 30\%$ of tumor cells or moderate staining $\geq 70\%$. Score 2+ was defined as weak staining in $> 70\%$ or moderate staining in > 30 and $\leq 70\%$ or as strong staining in $\leq 30\%$ of tumor cells. Score 1+ was assigned when $\leq 70\%$ of tumor cells were weakly positive or $\leq 30\%$ were moderately stained. Less staining was defined as negative (Score 0). Discrepant results were resolved by consensus review

RNAscope for miRNA221

The RNAscope assay was performed according to manufacturer's instruction (27).

In brief, paraffin-embedded TMA blocks were cut in 5 μm sections, pretreated according to an extended protocol (30 minutes for pretreatment 2 and 3), digested and hybridized at 40°C in the HybEZ oven with human miRNA-221 mRNA probe provided by *Advanced Cell Diagnostics Europe*. Incubation time with Hematoxylin was 10 seconds.

Target expression was compared to both negative (dapB) and positive (PPIB) controls. Scoring of signals was done as recommend by the manufacturer with no staining or

less than one molecule per 10 cells = score 0; 1-3 dots/cell = score 1; 4-9 dots/cell = score 2; 10-15 dots/cell = score 3 and >15 dots/cell = score 4. DapB score was 0 and PPIB score was 2. Positivity was defined as a score > 0.

The evaluation of immunohistochemical expression and RNAscope was assessed manually by two pathologists (AQ and HL). Discrepant results, which occurred only in a small number of samples, were resolved by consensus review.

Fluorescence in-situ hybridization for GATA6

The GATA6-20-GR (Green) probes from Empire Genomics and the Zytolight probe (CEN18) (ZytoVision Bremerhaven, Germany) were used to determine GATA6 amplification. GATA6 amplification was defined as gene copy clusters in > 50% of carcinoma cells or gene copy number (> 6)

Genomic data analysis

Genomic data were analyzed by cBioPortal (cbioportal.org) and plotted for visualization of interactions between DKK2 and GATA6 (14, 15). Underlying genetic data were extracted from the TCGA dataset for esophageal cancer (16).

Statistical Analysis

Clinical data were collected prospectively according to a standardized protocol. SPSS Statistics for Mac (Version 21, SPSS) was used for statistical analysis. Interdependence between stainings and clinical data were calculated using the chi-squared and Fisher's exact tests, and displayed by cross-tables. Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method and analyzed using the log-rank test. All tests were two-sided. P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Patients' baseline characteristics

A total of 175 patients of 192 on the TMA were immunohistochemically interpretable for DKK2 and 176 patients for miRNA-221. Reasons for non-informative cases (16 and 17 spots; 8.3% and 8.9% on the TMA) included lack of tissue samples or absence of unequivocal cancer tissue in the TMA spot. Clinicopathological data is summarized within Table 1. Patients were predominantly men (male n=175, 91.1%, female n=17, 8.9%). The median age of the entire patients' cohort was 65.2 years (range 33.6 - 85.6

years) at time of diagnosis. Neoadjuvant treatment (chemo- or radiochemotherapy) was administered in 142 patients (73.6%) before operation.

miRNA-221 and DKK2 expression in esophageal adenocarcinoma

Expression of DKK2 was detectable in 38 patients (21.7%) and 59 patients (33.5%) for miRNA-221, both showed an intracellular staining pattern (figure 1A and figure 2). Amplification of GATA6 was detectable in 18 patients (10.7%) A correlation between clinicopathological data and DKK2 or miRNA-221 expression could not be revealed by cross-table analysis (table 1). DKK2 expression was correlated with TP53 wild-type tumors ($p = 0.034$) and GATA6 amplification ($p = 0.033$). We observed no correlation between Her2 expression or amplification of myc, PIK3CA, kras and DKK2 expression.

DKK2 expression is associated with shortened overall-survival in patients after neoadjuvant treatment

Observing the entire patient cohort, a significant difference between patients with and without DKK2 expression could not be observed (figure 3A). In patients without neoadjuvant treatment, there was a survival difference between patients with and without DKK2 expression. Patients with the presence of DKK2 expression showed a median OS of 202 months (95%CI not calculable) and patients without DKK2 expression a median OS of 55.9 months (95%CI 26.1 – 85.8 months, $p = 0.012$) (figure 3B). However, in patients receiving neoadjuvant treatment, tumors with DKK2 expression showed a significant shortened OS compared to patients without DKK2 expression. The median OS in patients with DKK2 expression was 26.2 months (95% confidence interval (CI) 13.4 - 39.2 months) while median OS was 32.8 months (95% CI 13.8 - 51.3 months, $p = 0.022$) in patients without DKK2 expression (figure 3C). Expression of miRNA-221 was not correlated with OS in the present patient cohort, however, in patients without neoadjuvant treatment miRNA-221 positive tumors showed a strong trend towards shortened OS ($p = 0.070$) with a median OS of 64.0 months in miRNA-221 negative patients (95%CI not calculable) compared to a median OS of 22.1 month (95%CI 13.3 - 30.8 months). Amplification of GATA6 did not serve as prognostic marker, either for the entire patients group or stratified in patients with or without neoadjuvant treatment. The missing statistical relevance could be based on a rather small number of positive patients in the group of patients underwent upfront surgery, since none of the patients in this particular group with amplification of GATA6

died during the follow-up period. In a multivariate cox-regression analysis, DKK2 serves as independent prognostic marker in the neoadjuvant group ($p = 0.017$) with a calculated hazard ratio of 1.895 (95%CI 1.120 - 3.208) but not in the group of patients after primary surgery (table 2).

Genomic data analysis

Possible interactions between DKK2 and GATA6 were analyzed on genomic level and visualized in figure 4A. Regulation of the Wnt pathway by LRP binding becomes evident. We observed a strong correlation between DKK2 and GATA6 genomic alterations on genomic level supporting the immunohistochemical and FISH data on our own data set (figure 4B).

Discussion

In the present study, we focused on the prognostic impact of DKK2 and miRNA-221 expression in EAC by analyzing a large patient collective by TMA technique. DKK2 expression was found in EAC in 21.7% of the patients, however, there was no correlation between clinical or pathological features (e.g. pT and pN stage) and the expression of DKK2. We found no difference in survival with regard to the DKK2 expression in the entire cohort. However, distinct subgroup analysis revealed that an influence of DKK2 on survival was present upon a multimodal treatment concept. DKK2 expression was associated with a shortened OS in those patients who underwent neoadjuvant treatment while in patients that underwent upfront surgery, DKK2 positive patients had a prolonged OS.

Our results for patients after a primary resection are consistent with previous studies for gastric, colon, breast and hepatocellular carcinoma, where DKK2 was found as a tumor suppressor and its loss is associated with activation of the Wnt-pathway and consecutive tumor progression (17-22). However, this effect is turned opposite in patients after neoadjuvant radiochemotherapy. In these patients, neoadjuvant radiochemotherapy seems to reverse the effects of the tumor suppressor DKK2. Patients after neoadjuvant radiochemotherapy showed a worsened overall survival depending on DKK2 expression than patients without DKK2 detection. As already shown by the study from Xiao et al., the role of DKK2 in cancer and its regulation on the Wnt-pathway seems to be regulated more complexly than previously assumed (23). The authors revealed a completely novel role of DKK2 by Wnt independent

suppression of cytotoxic immune-cell activation. Accordingly, blockade of DKK2 reinforced anti-tumoral action of NK cells and tumor-associated T-cells. It can only be speculated that tumor cell DKK2 acts in a context-dependent manner which depends on the local tumor stage and the tumor microenvironment also in esophageal cancer. Primarily resected patients typically have a lower T-stage and lower rates of lymph node metastasis which might represent a different tumor biological situation than pretreated T3-T4 N+ tumors. Hypothetically in untreated, earlier stages where the tumor microenvironment is under dynamic changes during progressing tumor growth, DKK2 acts as a tumor suppressor by suppressing Wnt activity. However, we could not reveal an association between the UICC stage, DKK2 expression and survival time, the DKK2 dependent survival difference is only found in dependence to neoadjuvant treatment in our analysis. In higher stages that critically involve immunomodulatory processes such as immunosuppressive, pro-angiogenic neutrophils or macrophages DKK2 acts as a pro-tumorigenic protein by e.g. either activating Wnt or suppressing anti-tumor immunity or both. In the context of neoadjuvant therapy, extensive immunomodulatory effects occur which barely have been understood so far. We know from our own work that after completion of neoadjuvant therapy, the immune infiltration of tumors is significantly lower than in tumor specimens of primary resected tumors (24). However, it is well conceivable that activation of DKK2 and the associated inhibition of cytotoxic cells has an influence on tumor progression in the group of neoadjuvant tumors. Whether the intracellular DKK2-dependent signaling changes by the administration of neoadjuvant (radio-) chemotherapy cannot be definitively proven by our study, but the strong effect on overall survival suggests that the intracellular DKK2 mediated functions are more complex than previously assumed. In addition, our study cannot answer the question of whether neoadjuvant therapy leads to induction of DKK2 expression or whether the effect of basal overexpression of DKK2 in tumor cells is turned on its opposite depending on neoadjuvant therapy. This requires further functional investigations. The association between DKK2 expression and high GATA6 levels cannot be elucidated at this point. An overexpression of the transcription factor GATA6 is associated with an aggressive phenotype in different tumors. Recent studies have shown an influence on the cell cycle in gastric carcinoma, where a depletion of GATA6 led to a cycle arrest in the M-phase and thus to significantly slower tumor growth. A link to DKK2 has not yet been described and possible synergistic effects remain speculative. One study could show a direct influence of GATA6 on DKK1 and

thus on Wnt regulation in pancreatic carcinoma. In the work of Zhong and colleagues, the binding of GATA6 to the DKK1 promoter leads to a down-regulation of DKK1 and thus to a consecutive activation of the Wnt pathways and associated tumor progression (25). A direct influence of GATA6 on the Wnt pathway has been described during embryonic heart development (26). Whether these mechanisms also apply in malignancies and in esophageal carcinoma in particular, as well as in DKK2, is unknown and needs further investigation.

MiRNA-221- positive, neoadjuvant treated tumors showed a strong trend towards a shortened OS ($p = 0.070$) supporting previous results where miRNA-221 expression is associated with 5-fluouracil resistance and tumor growth (9). In the study by Wang and colleagues, DKK2 expression decreased under prolonged stimulation with 5-fluourcil leading to an increased Wnt/b-catenin signaling and consecutives tumor progression. Due to the design of the present study we can not assess whether DKK2 changes under administration of neoadjuvant treatment. It would be interesting to investigate whether DKK2 expression underlies dynamic changes during neoadjuvant treatment or not.

Our study repeatedly shows the necessity of specific subgroup analysis in EAC, which is possible in this case due to the large number of analyzed cases. In summary, our study identifies DKK2 and miRNA-221 expression in neoadjuvant treated EAC as prognostic factors predicting a detrimental prognosis. Mechanistic studies have to clarify the complex context-dependent role of DKK2 in EAC to offer safe and reliable future treatment concepts involving this pathway.

References

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
2. Shapiro, J., et al., *Neoadjuvant chemoradiotherapy plus surgery versus surgery alone for oesophageal or junctional cancer (CROSS): long-term results of a randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(9): p. 1090-1098.
3. Al-Batran, S.E., et al., *Histopathological regression after neoadjuvant docetaxel, oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin versus epirubicin, cisplatin, and fluorouracil or capecitabine in patients with resectable gastric or gastro-oesophageal junction*

- adenocarcinoma (FLOT4-AIO): results from the phase 2 part of a multicentre, open-label, randomised phase 2/3 trial.* *Lancet Oncol*, 2016. **17**(12): p. 1697-1708.
4. Cocolini, F., et al., *Neoadjuvant chemotherapy in advanced gastric and esophago-gastric cancer. Meta-analysis of randomized trials.* *Int J Surg*, 2018. **51**: p. 120-127.
 5. Mao, B. and C. Niehrs, *Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling.* *Gene*, 2003. **302**(1-2): p. 179-83.
 6. Li, L., et al., *Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled.* *J Biol Chem*, 2002. **277**(8): p. 5977-81.
 7. Mao, B., et al., *LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins.* *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 321-5.
 8. Attisano, L. and E. Labbe, *TGFbeta and Wnt pathway cross-talk.* *Cancer Metastasis Rev*, 2004. **23**(1-2): p. 53-61.
 9. Wang, Y., et al., *miR-221 Mediates Chemoresistance of Esophageal Adenocarcinoma by Direct Targeting of DKK2 Expression.* *Ann Surg*, 2016. **264**(5): p. 804-814.
 10. Schroder, W., et al., *Ivor-Lewis esophagectomy with and without laparoscopic conditioning of the gastric conduit.* *World J Surg*, 2010. **34**(4): p. 738-43.
 11. Holscher, A.H., et al., *Laparoscopic ischemic conditioning of the stomach for esophageal replacement.* *Ann Surg*, 2007. **245**(2): p. 241-6.
 12. Messenger, M., et al., *Laparoscopic Gastric Mobilization Reduces Postoperative Mortality After Esophageal Cancer Surgery: A French Nationwide Study.* *Ann Surg*, 2015. **262**(5): p. 817-22; discussion 822-3.
 13. Mariette, C., et al., *Hybrid Minimally Invasive Esophagectomy for Esophageal Cancer.* *N Engl J Med*, 2019. **380**(2): p. 152-162.
 14. Gao, J., et al., *Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal.* *Sci Signal*, 2013. **6**(269): p. p1.
 15. Cerami, E., et al., *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data.* *Cancer Discov*, 2012. **2**(5): p. 401-4.
 16. Liu, J., et al., *An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics.* *Cell*, 2018. **173**(2): p. 400-416 e11.
 17. Wang, C., et al., *Dickkopf-Related Protein 2 is Epigenetically Inactivated and Suppresses Colorectal Cancer Growth and Tumor Metastasis by Antagonizing Wnt/beta-Catenin Signaling.* *Cell Physiol Biochem*, 2017. **41**(5): p. 1709-1724.

18. Maass, T., et al., *Increased liver carcinogenesis and enrichment of stem cell properties in livers of Dickkopf 2 (Dkk2) deleted mice*. *Oncotarget*, 2016. **7**(20): p. 28903-13.
19. Shao, Y.C., et al., *Prognostic value of DKK2 from the Dickkopf family in human breast cancer*. *Int J Oncol*, 2018. **53**(6): p. 2555-2565.
20. Mu, J., et al., *Dickkopf-related protein 2 induces G0/G1 arrest and apoptosis through suppressing Wnt/beta-catenin signaling and is frequently methylated in breast cancer*. *Oncotarget*, 2017. **8**(24): p. 39443-39459.
21. Lin, Y.F., et al., *Selective Retention of an Inactive Allele of the DKK2 Tumor Suppressor Gene in Hepatocellular Carcinoma*. *PLoS Genet*, 2016. **12**(5): p. e1006051.
22. Wang, L., et al., *Comprehensive Analysis of the Canonical and Non-canonical Wnt Signaling Pathways in Gastric Cancer*. *Dig Dis Sci*, 2019.
23. Xiao, Q., et al., *DKK2 imparts tumor immunity evasion through beta-catenin-independent suppression of cytotoxic immune-cell activation*. *Nat Med*, 2018. **24**(3): p. 262-270.
24. Schlosser, H.A., et al., *B cells in esophago-gastric adenocarcinoma are highly differentiated, organize in tertiary lymphoid structures and produce tumor-specific antibodies*. *Oncoimmunology*, 2019. **8**(1): p. e1512458.
25. Zhong, Y., et al., *GATA6 activates Wnt signaling in pancreatic cancer by negatively regulating the Wnt antagonist Dickkopf-1*. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e22129.
26. Afouda, B.A., et al., *GATA transcription factors integrate Wnt signalling during heart development*. *Development*, 2008. **135**(19): p. 3185-90.

Figure legends

Figure 1: Immunohistochemical staining of DKK2 in esophageal adenocarcinoma. The distribution of DKK2 expression was exclusively intracellular (A). Example of a tumour without detection of DKK2 in immunohistochemistry (B).

Figure 2: Visualization of miRNA221 detection using basescope technique

Figure 3: Kaplan-Meier survival analysis and survival plots for DKK2 expression and the entire cohort (A), patients after neoadjuvant treatment (B) and patients after primary surgery without neoadjuvant treatment (C).

Figure 4: Visualization of the connection of DKK2 and GATA6 on gene level based on TCGA data, analyzed by cBioportal (A). Correlation of gene amplification between DKK2 and GATA6 in esophageal adenocarcinoma (B).

Tables

Table 2. Multivariate cox-regression analysis for patients after primary surgery and neoadjuvant treatment.

Factor	Primary Surgery			Neoadjuvant Treatment		
	Hazard Ratio	95% Confidence Interval	p Value	Hazard Ratio	95% Confidence Interval	p Value
sex:male vs. female	9.623	0.001	0.994	3.398	1.048	0.042
age groups <65 yrs vs. ≥65 yrs	2.163	0.802	0.127	1.203	0.724	0.475
Tumor stage pT1/2 vs. pT3/4	3.585	0.804	0.094	1.122	0.541	0.757
lymph node metastasis pN0 vs. pN+	12.063	2.641	0.001	2.246	1.284	0.005
DKK2 neg. vs. pos.	0.001	0.001	0.959	1.895	1.12	0.017

Table 1. Clinico-pathological parameters for the entire patients' cohort.

Factor	DKK2 Expression				miRNA-221 Expression				GATA 6							
	Negative	Positive	p Value		Negative	Positive	p Value		Negative	Positive	p Value					
sex																
female	15	8.6%	13	86.7%	2	13.3%			7	50.0%	7	50.0%	12	80.0%	3	20.0%
male	160	91.4%	124	77.5%	36	22.5%	0.529		110	67.9%	52	32.1%	138	90.2%	15	9.8%
age group																
<65 yrs	90	53.6%	69	76.7%	21	23.3%			56	63.6%	32	36.4%	77	88.5%	10	11.5%
>65 yrs	78	46.4%	64	82.1%	14	17.9%	0.449		54	68.4%	25	31.6%	66	89.2%	8	10.8%
Tumor stage																
pT1	24	13.7%	19	79.2%	5	20.8%			21	75.0%	7	25.0%	18	81.4%	4	18.2%
pT2	10	5.7%	7	70.0%	3	30.0%			6	60.0%	4	40.0%	8	80.0%	2	20.0%
pT3	133	76.0%	104	78.2%	29	21.8%			83	63.8%	47	36.2%	116	90.6%	12	9.4%
pT4	8	4.6%	7	87.5%	1	0.6%	0.846		6	85.7%	1	14.3%	8	100%	0	0%
Lymph node metastasis																
pN0	70	40.0%	51	72.9%	19	27.1%			50	69.4%	22	30.6%	59	86.8%	9	13.2%
pN+	105	60.0%	86	81.9%	19	18.1%	0.818		67	64.4%	37	35.6%	91	91.0%	9	9.0%
UICC stage																
I	36	20.7%	27	75.0%	9	25.0%			24	68.6%	11	31.4%	30	85.7%	5	14.3%
II	35	20.1%	24	68.6%	11	31.4%			23	69.7%	10	30.3%	31	31.2%	3	8.8%
III	78	44.8%	64	82.1%	14	17.9%			45	61.6%	28	38.4%	65	89.0%	8	11.0%
IV	25	14.4%	21	84.0%	4	16.0%	0.349		16	66.7%	8	33.3%	23	92.0%	2	8.0%
neoadjuvant therapy																
no	60	34.3%	50	83.3%	10	16.7%			38	66.7%	19	33.3%	55	94.8%	3	5.2%
yes	115	65.7%	87	75.7%	28	24.3%	0.334		70	64.2%	39	35.8%	95	86.4%	15	13.6%

Name der Druckerei: entfällt bei elektronischer Veröffentlichung
Druck- / Verlagsort: entfällt bei elektronischer Veröffentlichung