

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie

Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher

Detektion verschiedener Adhäsionsmoleküle und deren Liganden (CD15s, CD44, N-Cadherin, Integrin β -1) in Kolonkarzinomen und deren Metastasen in klinischem Material

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Sven Nahrstedt
aus Osterburg

Hamburg, 2018

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.11.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Harriet Wikman- Kocher

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Arbeitshypothese und Fragestellung | 6 |
| 2. Einleitung | 7 |
| 2.1. Das kolorektale Karzinom | 7 |
| 2.1.1. Ätiologie und Epidemiologie | 7 |
| 2.1.2. Histologische Unterteilung | 8 |
| 2.1.3. Therapieoptionen..... | 9 |
| 2.1.4. Prognose | 10 |
| 2.2. Metastasierungskaskade | 11 |
| 2.3. Extravasation von Leukozyten im Vergleich zu Tumorzellen | 13 |
| 2.3.1. Rolling | 14 |
| 2.3.2. Adhäsion..... | 16 |
| 2.3.3. Diapedese | 17 |
| 2.4. Zelladhäsionsmoleküle..... | 19 |
| 2.4.1. CD15s | 19 |
| 2.4.2. CD44 | 21 |
| 2.4.3. N-Cadherin | 23 |
| 2.4.4. Integrin β -1 | 25 |
| 3. Material und Methoden..... | 27 |
| 3.1. Histologisches Untersuchungsmaterial | 27 |
| 3.2. Immunhistochemie | 27 |
| 3.2.1. Darstellung von CD15s..... | 28 |
| 3.2.2. Darstellung von CD44 | 29 |
| 3.2.3. Darstellung von N-Cadherin | 30 |
| 3.2.4. Darstellung von Integrin β -1 | 32 |
| 3.3. Histologische Auswertung..... | 33 |
| 3.4. Statistische Auswertung..... | 33 |
| 4. Ergebnisse | 34 |
| 4.1. Expression von CD15s..... | 34 |
| 4.2. Expression von CD44 | 36 |
| 4.3. Expression von N-Cadherin | 38 |
| 4.4. Expression von Integrin β -1 | 41 |
| 4.6. Korrelation..... | 44 |
| 4.6.1 Korrelation der Expression von Adhäsionsmolekülen bei Primärtumorzellen | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 4.6.2 Korrelation der Expression von Adhäsionsmolekülen bei Metastasezellen..... | 44 |
| 4.6.2.1 Korrelation der Expression von Adhäsionsmolekülen bei Peritonealkarzinosezellen | 45 |
| 4.6.2.2 Korrelation der Expression von Adhäsionsmolekülen bei Lebermetastasezellen..... | 45 |
| 5. Diskussion | 47 |
| 6. Zusammenfassung | 55 |
| 7. Literaturverzeichnis..... | 57 |
| 8. Danksagung | 69 |
| 9. Lebenslauf..... | 70 |
| 10. Eidesstattliche Versicherung | 71 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| bzw. | beziehungsweise |
| CAM | Zelladhäsionsmolekül |
| CD | Cluster designation molecule |
| d. h. | das heißt |
| ECM | extrazelluläre Matrix |
| g | Gramm |
| HCl | Salzsäure |
| HEP | Lebermetastase |
| kDa | Kilodalton |
| M | Molar |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| mol | Molekulargewicht |
| PER | Peritonealkarzinose |
| pH | pH-Wert |
| PUL | Lungenmetastase |
| TBS | Trispuffer |
| TBS+T | Trispuffer mit Zusatz von 01,% Tween 20 |

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Extravasation von Leukozyten bei Entzündungsreaktionen ist bis auf die molekulare Ebene detailreich geklärt und wurde vielfach beschrieben.

Vergleichsweise wenig ist hingegen über die Extravasation von Tumorzellen bekannt. Die Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel am Zielorgan der zukünftigen Metastase bzw. an das Mesothel der Bauchhöhle spielt dabei eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung. Zu dieser Anheftung benutzen die Karzinomzellen vermutlich die gleichen Moleküle, welche auch Leukozyten zur Anheftung an das Endothel im Rahmen eines entzündlichen Prozesses benutzen. Die nach der Anheftung aktivierte Signalkaskade ermöglicht einen Durchtritt der Entzündungs- bzw. Tumorzellen in das darunter gelegene Gewebe. Die Liganden von Leukozyten und Tumorzellen, die bei der Anheftung eine Rolle spielen, können immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Diese Dissertation soll die Expression von CD15s, CD44, N-Cadherin und Integrin β -1 auf Kolonkarzinomen und dessen Metastasen analysieren und dabei helfen die Grundlagen der Metastasierung vom Kolonkarzinom besser zu verstehen.

Folgende Fragen sollen konkret beantwortet werden:

- In welchem Umfang exprimieren Kolonkarzinome und dessen Metastasen die zu untersuchenden Adhäsionsmoleküle und deren Liganden der Leukozytenadhäsionskaskade?
- Gibt es Unterschiede in der Expression dieser Zelladhäsionsmoleküle zwischen Primärtumoren und deren Metastasen?
- Existiert eine Korrelation in der Expression der verschiedenen Adhäsionsmoleküle?

2. Einleitung

Krebserkrankungen sind in der Bevölkerung weit verbreitet. Einer von vier Deutschen stirbt an einem bösartigen Tumor. Dabei verursacht die ausgedehnte Metastasierung die große Mehrheit der Krebs-assoziierten Todesfälle. Doch der komplexe Prozess der Metastasierung bleibt immer noch der am wenigsten verstandene Aspekt der Krebsbiologie (Samatov et al., 2017, Lambert et al., 2017).

2.1. Das kolorektale Karzinom

2.1.1. Ätiologie und Epidemiologie

Weltweit erkranken jedes Jahr mehr als 1 Million Menschen an Darmkrebs, wobei Frauen und Männer fast gleichermaßen betroffen sind und seine Inzidenz ist steigend (Cunningham et al., 2010, Boyle und Ferlay, 2005).

Ab dem Jahr 2012 ist Darmkrebs die zweithäufigste Ursache von Krebs bei Frauen (9,2 % der Diagnosen) und die dritthäufigste bei Männern (10,0 %) und damit die vierthäufigste Ursache für einen krebsbedingten Tod, nach dem der Lunge, Magen und Leber (WHO, 2014).

Risikofaktoren Darmkrebs zu entwickeln sind Alter ab 40 Jahre, eine hohe Aufnahme von Fett, Alkohol, rotes oder verarbeitetes Fleisch, Fettleibigkeit, Rauchen, Mangel an körperlicher Bewegung, sowie geringer Verzehr von Ballaststoffen, Obst und Gemüse (Cunningham et al., 2010, Watson und Collins, 2011, Campos et al., 2005). Aufgrund der verschiedenen Ernährungsgewohnheiten in unterschiedlichen Kulturen ist Darmkrebs nicht in der ganzen Welt einheitlich verbreitet, sondern vor allem eine Krankheit der entwickelten Länder mit einer westlichen Kultur (Watson und Collins, 2011). Länder mit den höchsten Inzidenzraten sind Australien, Neuseeland, Kanada, die Vereinigten Staaten von Amerika und Teile Europas. Die Länder mit dem niedrigsten Risiko sind China, Indien und Teile von Afrika und Südamerika (Boyle und Langman, 2000). So treten mehr als 75-95 % der Darmkrebsfälle bei Menschen mit wenig oder keinem genetischen Risiko auf, sondern sind vor allem mit dem Lebensstil assoziiert (Watson und Collins, 2011, Cunningham et al., 2010). Außerdem zeigen Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Darmkrebs.

Dabei erhöht sich das Risiko Darmkrebs zu entwickeln mit längerer Dauer, dem Grad der Entzündung, dem Ausmaß der Colitis und einer koexistenten primär sklerosierenden Cholangitis (Kim und Chang, 2014, Eaden et al., 2001, Mikami et al., 2011). Diese Verbindung zwischen Entzündungen und Darmkrebs wird auch dadurch unterstützt, dass in Studien der entzündungshemmende Wirkstoff Aspirin mit einer Reduzierung des Darmkrebsrisikos einhergeht (Chan et al., 2012).

Patienten mit einer positiven Familienanamnese bei zwei oder mehr Verwandten des ersten Grades haben ein zwei- bis dreifach erhöhtes Krankheitsrisiko (Cunningham et al., 2010). Zusätzlich ist eine Reihe von genetischen Syndromen mit höheren Zahlen von Darmkrebserkrankungen assoziiert. Dazu zählen das hereditäre non-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC oder Lynch-Syndrom), das bei etwa 3 % der Menschen mit Darmkrebs vorliegt (Cunningham et al., 2010) und die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP). Für Menschen mit diesem Syndrom tritt Darmkrebs fast immer auf und verursacht etwa 1 % der Darmkrebsfälle (Half et al., 2009).

2.1.2. Histologische Unterteilung

Karzinome sind maligne Neoplasien, die von Zellen im Deckgewebe der Haut oder Schleimhaut, also dem Epithel, ausgehen (Samatov et al., 2017). Mehr als 90 % der kolorektalen Karzinome sind Adenokarzinome aus Drüsenepithelzellen, die den Dickdarm und das Rektum auskleiden. Es kann aus tubulären, kribriformen, azinären und papillären Strukturen bestehen und weist abhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors auch eine Schleimsekretion auf. Das konventionelle Adenokarzinom ist charakterisiert durch die Drüsenbildung, welche die Grundlage für die histologische Tumorabstufung bildet. Bei gut differenzierten Adenokarzinomen besteht >95 % des Tumors aus Drüsengewebe. Mäßig differenzierte Adenokarzinome zeigen 50-95 % Drüsenbildung und schlecht differenzierte Adenokarzinome <50 % Drüsenbildung. In der Praxis werden die meisten kolorektalen Adenokarzinome (~70 %) als mäßig differenziert diagnostiziert. Gut und schlecht differenzierte Karzinome machen 10 % bzw. 20 % aus. Dabei wird der Differenzierungsgrad als unabhängige prognostische Variable betrachtet. Ein schlecht differenzierter Tumor ist mit einem schlechten Überleben des Patienten verbunden (Compton, 1999).

Andere seltene Arten von kolorektalen Karzinomen sind neuroendokrine Karzinome, Plattenepithelzellkarzinome, adenosquamöse Karzinome, Spindelzellkarzinome und undifferenzierte Karzinome (Fleming et al., 2012).

2.1.3. Therapieoptionen

Der Behandlungsansatz von Dickdarmkrebs kann, wie bei allen anderen Krebsarten auch, kurativ oder palliativ sein. Die Entscheidung, welche Zielsetzung zu übernehmen ist, hängt von verschiedenen Faktoren ab, einschließlich der Gesundheit und Präferenzen des Patienten, sowie dem Stadium des Tumors (Stein et al., 2011).

Wenn der Darmkrebs frühzeitig erkannt wird, kann eine Operation kurativ sein. Dabei ist die angestrebte Behandlung eine vollständige chirurgische Entfernung mit adäquatem Sicherheitsabstand. Dies kann entweder durch eine offene Laparotomie oder manchmal sogar laparoskopisch erfolgen. Teils wird eine neoadjuvante Chemotherapie angewendet, um den Krebs zu schrumpfen und die chirurgische Resektion zu ermöglichen. Beim Rektumkarzinom kann dabei eine Kombination von Strahlen- und Chemotherapie sinnvoll sein. Bei der Lokalisation des Krebses im restlichen Darm ist die Verwendung von Strahlentherapie keine Routinemaßnahme. Dies liegt an der mangelnden Empfindlichkeit des Kolonkarzinoms gegenüber Strahlung (Cunningham et al., 2010).

Wenn sich der Krebs auf die Lymphknoten oder entfernten Organe ausgebreitet hat, ist die adjuvante Chemotherapie ein integraler Bestandteil der Behandlung. Die häufigsten Orte der Metastasierung sind dabei die Leber, die Lunge und das Peritoneum. Wenn es nur wenige Metastasen in der Leber oder Lunge gibt, kann man versuchen diese zu entfernen, um einen kurativen Therapieansatz zu verfolgen. Häufig ist so ein Ansatz bei bereits metastasiertem Kolonkarzinom nicht möglich und die Behandlung ist oft nur auf Linderung der Beschwerden gerichtet (Cunningham et al., 2010).

2.1.4. Prognose

Obwohl in Nordamerika, Neuseeland, Australien und Westeuropa die Sterblichkeit von Darmkrebs bei Männern und Frauen zurückgegangen ist, (Boyle und Ferlay, 2005) wird geschätzt, dass weltweit immer noch 394 000 Todesfälle pro Jahr durch Darmkrebs auftreten (Boyle und Langman, 2000).

In Europa liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate für Darmkrebs im Durchschnitt bei weniger als 60 %. Etwa ein Drittel der Menschen, welche an Darmkrebs erkranken, versterben auch daran. Die Überlebensraten von Darmkrebspatienten sind dabei stark abhängig von dem Krebsstadium bei der Diagnosestellung. Wenn das Karzinom symptomatisch wird, ist die Prognose bereits oft schon als schlecht einzustufen, weil das Karzinom dann schon weit fortgeschritten ist (Cunningham et al., 2010). Die Fünf-Jahres-Überlebensraten sind bei einem lokalisierten Karzinom größer als 70 %, sinken aber unter 10 % nach Metastasierung. Die Fähigkeit des Kolonkarzinoms zur Metastasierung verschlechtert die Heilungschancen also erheblich (Samatov et al., 2017).

Metastasen machen damit den Großteil der Krebs assoziierten Todesfälle (90 %) aus (Irving et al., 2014, Jemal et al., 2004, Lambert et al., 2017).

Es ist also von entscheidender Bedeutung, das Kolonkarzinom so früh wie möglich zu erkennen, bevor es zur Ausbildung von Metastasen kommt. Die bisherigen Methoden zur frühzeitigen Erkennung von Kolonkarzinomen sind entweder sehr invasiv (z. B. Koloskopie oder Sigmoidoskopie), zu unspezifisch oder unempfindlich für frühe Stadien. So müssen neue Methoden zur Früherkennung entwickelt werden, die weniger invasiv und besser zugänglich sind, um die weltweite Belastung dieser Erkrankung zu reduzieren (Irving et al., 2014). Für diese Früherkennung könnten Biomarker in Blut oder Stuhl hilfreich sein, welche mit Darmkrebs und präkanzerösen Läsionen assoziiert sind.

Um die Metastasierung zu verhindern und erfolgreich behandeln zu können, bedarf es eines gründlichen Verständnisses aller im Prozess involvierten Moleküle und Strukturen, infolgedessen dann eine zielgerichtete Therapie entwickelt werden kann (Valastyan und Weinberg, 2011, Samatov et al., 2017).

2.2. Metastasierungskaskade

Metastasen sind eine häufige Komplikation von Karzinomen, doch der Prozess, durch den zirkulierende Tumorzellen ferne Kolonien bilden, ist bisher noch unvollständig verstanden. Die Tumormetastasierung von einem Organ zu einem anderen ist ein hochkomplexer Prozess und beinhaltet eine mehrstufige Kaskade von Ereignissen in einer bestimmten Reihenfolge (Al-Mehdi et al., 2000, Hanley et al., 2005, Samatov et al., 2017, Valastyan und Weinberg, 2011).

Im ersten Schritt wird eine normale Epithelzelle bösartig, teilt sich unkontrolliert und es kommt zu einer Akkumulation dieser entarten Zellen. Der entstandene Zellhaufen sendet ab einer bestimmten Größe angiogene Signale an seine Umgebung, wodurch es zum Einwachsen von Blutgefäßen in den Tumor kommt. Dies ist nötig, um den größer werdenden Gewebeverband mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Die zukünftig metastatischen Tumorzellen lösen sich vom Verband der Primärtumorzellen und beginnen Proteasen zu sezernieren, welche die extrazelluläre Matrix auflösen (Miles et al., 2008). Die Tumorzellen brechen durch die Basalmembran und Gefäßwand der neu gebildeten Tumorgefäße, gelangen in die Blut- oder Lymphbahn und werden weiter transportiert (Samatov et al., 2017). Dort müssen sie die Zirkulation überleben und der Immunantwort entgehen (Miles et al., 2008).

Am Zielort der Metastasierung müssen sich die Tumorzellen an das Endothel der Gefäße anheften, um den Blutkreislauf wieder zu verlassen und in das Zielorgan einzudringen (Miles et al., 2008). Dieser Schritt ist äußerst wichtig, denn Tumorzellen können nur eine begrenzte Zeit in der Blutbahn überleben. Wenn den Tumorzellen die Fähigkeit fehlt aus der Blutbahn zu extravasieren, können sich auch keine Metastasen ausbilden (Wicklein et al., 2013).

Um die Barriere der Endothelschicht zu überwinden, betreiben die Tumorzellen molekulares Mimikry. Das bedeutet, dass sie den Endothelzellen vortäuschen, dass es sich bei ihnen um Leukozyten handelt, welche im Körper vor allem an Orten auftauchen, an denen eine Entzündung stattfindet. Dies führt dazu, dass die Endothelzellen ihre Kontakte untereinander aufheben und die Tumorzelle in das Organ einwandern kann (Samatov et al., 2017).

Die eingekistete Tumorzelle kann sich unter lokalem Einfluss weiter teilen und so eine klinisch detektierbare Metastase bilden. Dieser Vorgang kann sich dann wiederholen, sodass eine Metastase von einer Metastase gebildet wird.

Die beschriebenen Prozesse sind nur durch eine hochspezifische molekulare Anpassung der Tumorzellen möglich. Ein wichtiger Vorgang dabei ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (Rosivatz et al., 2004). Normalerweise zeichnen sich Epithelzellen dadurch aus, dass sie fest mit ihrer Umgebung durch Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Matrix-Adhäsionsmoleküle verbunden sind. Im Rahmen der EMT werden diese Moleküle herunterreguliert, damit sich die Tumorzellen aus dem Gewebeverband lösen und in die Blutgefäße auswandern können. Eine andere Klasse der Adhäsionsmoleküle muss im Zuge der EMT vermehrt exprimiert werden, nämlich jene Zelladhäsionsmoleküle, welche normalerweise von Leukozyten exprimiert werden und die Tumorzellen befähigen, an Endothelzellen anzuheften und diese zu durchwandern.

Konnte die Tumorzelle erfolgreich das Endothel überwinden und in das Bindegewebe des neuen Organs einwandern, findet ein umgekehrter Prozess statt. Diesen Vorgang bezeichnet man als mesenchymal-epitheliale Transition (MET). Es wird wieder ein Epithelzellverband aufgebaut, welcher dem des Primärtumors ähnelt. So kann in vielen Fällen auch auf den Ursprung einer Metastase rückgeschlossen werden (Samatov et al., 2017).

Bei allen diesen beschriebenen Prozessen kommt es zu Zell-zu-Zell und Zell-zu-Matrix Interaktionen zwischen den Tumorzellen einerseits und dem umgebenden Gewebe andererseits. Deshalb spielen Zellmembranproteine der Tumorzellen, welche die Tumorzellen zu diesen Interaktionen befähigen, eine funktionelle Rolle.

Unklar ist, was die Metastasierung auslöst. Es sind durch Expressionsanalysen zwar eine Vielzahl von Molekülen identifiziert worden, die sich in einzelnen oder mehreren Studien als mehr oder weniger metastaseanzeigend erwiesen haben, ein grundsätzliches Prinzip fehlt jedoch gegenwärtig (Samatov et al., 2017).

2.3. Extravasation von Leukozyten im Vergleich zu Tumorzellen

Die Extravasation von Leukozyten ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem Zellen aus dem Blutstrom durch das vaskuläre Endothel in das umliegende Gewebe auswandern (Barthel et al., 2007). Die bekanntesten Arten von extravasierenden Zellen sind Leukozyten, d. h. Lymphozyten, natürliche Killer (NK) -Zellen, neutrophile Granulozyten und Monozyten. Diese Zellen müssen die Blutgefäße verlassen, um Gewebestellen von Entzündungen, Infektionen oder Verletzungen zu erreichen. Dabei ist die Extravasation von Leukozyten bis auf molekularer Ebene detailreich geklärt (Strell und Entschladen, 2008). Im Gegensatz dazu sind die zellulären Wechselwirkungen und molekularen Veränderungen, durch die Tumorzellen am Endothel haften und dieses überqueren und anschließend fremde Organe kolonisieren, noch nicht vollständig untersucht (Jassam et al., 2017, Miles et al., 2008).

Tumorzellen, die aus dem Blutstrom auswandern können, verwenden für die Extravasation vermutlich einen ähnlichen Mechanismus, wie er von extravasierenden weißen Blutkörperchen verwendet wird (Jassam et al., 2017, Köhler et al., 2010, Lange et al., 2014, Miles et al., 2008, Samatov et al., 2017). Dies konnten Köhler et al., (2009) und Wicklein et al., (2013) am Beispiel der Selektine zeigen, welche für die Extravasation und Organinfiltration von Kolonkarzinomzellen (Köhler et. al.) und von leukämischen Tumorzellen (Wicklein et al.) essentiell waren.

Den Extravasationsprozess kann man in drei Schritte unterteilen; Rolling, Adhäsion und Diapedese (Kawashima, 2006, Strell und Entschladen, 2008, Strell et al., 2007). Für diese drei Schritte werden unterschiedliche Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle benutzt. Sowohl Leukozyten als auch Tumorzellen vollziehen diese drei Schritte, wobei Tumorzellen dabei teils andere Moleküle benutzen als Leukozyten (Miles et al., 2008). Teilweise verwenden Tumorzellen sogar Leukozyten als Linker zum Endothel. Dies wurde anhand von neutrophilen Granulozyten gezeigt, die die Adhäsion von Brustkarzinomzellen an pulmonales Endothel förderten (Strell et al., 2007). Auch anderen Blutbestandteilen, wie z. B. den Thrombozyten, wurden bereits metastasefördernde Funktionen zugeschrieben (Borsig et al., 2001). Bei diesen Transmigrationsprozessen nimmt auch das Endothel aktiv am Extravasationsprozess

teil, indem eine Änderung ihrer Rezeptoren und Zell-zu-Zell-Kontakte diesen Prozess ermöglichen (Strell und Entschladen, 2008).

2.3.1. Rolling

In diesem Schritt zeigen die Tumorzellen nur eine lose Wechselwirkungen mit dem Endothel und werden noch mit dem Blutstrom transportiert, was zu einer Rollbewegung auf der Gefäßoberfläche führt (Strell und Entschladen, 2008). Die Tumorzellen rollen vor allem im Bereich der postkapillären Venolen, wo der Blutstrom langsam ist.

Einige Autoren beschrieben vor dem Rollen einen zusätzlichen Schritt, bei dem sich die Zellen an den Rand des Blutstromes bewegen und sich dem Endothel der postkapillären Venolen nähern. Dieser Schritt wird als „Margination“ bezeichnet. Bei Leukozyten entsteht dabei ein Gleichgewicht zwischen zirkulierenden und marginierenden Leukozyten (Iadocicco et al., 2002). Hierbei ist die Blutgeschwindigkeit am Rand des Gefäßes geringer als in der Mitte, wodurch das Marginieren und die Adhäsion begünstigt werden.

Das Rolling der Leukozyten und Tumorzellen wird hauptsächlich durch Selektine initiiert (Barthel et al., 2007, Köhler et al., 2010, Lange et al., 2014, Miles et al., 2008, Vestweber und Blanks, 1999), welche auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert werden. Im Gegensatz dazu besitzen Tumorzellen keine Selektine, sondern ihre jeweiligen Liganden (Strell und Entschladen, 2008).

Die Familie der Selektine besteht aus drei Mitgliedern: dem L-, P- und E-Selektin (CD62L, P, E) (Elangbam et al., 1997, Barthel et al., 2007, Vestweber und Blanks, 1999). Selektine sind Calcium-abhängige kohlenhydratbindende Transmembran-Glykoproteine (Barthel et al., 2007).

E-Selektin wird konstitutiv auf Endothelzellen der Haut- und Knochenmikrogefäße exprimiert. Zusätzlich werden E- und P-Selektine bei Entzündungen durch proinflammatorische Mediatoren hochreguliert (Elangbam et al., 1997, Barthel et al., 2007, Schweitzer et al., 1996). Außerdem kommen sie auch auf dem Mesothel der Bauchhöhle vor (Gebauer et al., 2013). Sie erkennen die sialo-fucosylierten Lewis-Kohlenhydrate (CD15s), die auf Protein-Lipid-Liganden von zirkulierenden

Leukozyten oder Tumorzellen exprimiert werden und vermitteln so den Rollingprozess (Barthel et al., 2007, Jassam et al., 2017, Lange et al., 2014). Ein Beispiel dieser P- und E-Selektin-Liganden, der mit Sialyl-Lewis X exprimiert ist, heißt PSGL-1 (P-Selectin-Glykoprotein-Ligand-1). Dieser kommt auf allen Blutlymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten vor. Das Sialyl-Lewis X exprimierende PSGL-1 heißt cutaneous Lymphozyten-Antigen (CLA), welches das „Haut-Homing“ von aktivierten T-Zell-Subtypen reguliert (Barthel et al., 2007). PSGL-1 wurde auch schon auf knochenmetastatischen Prostatatumorzellen gefunden und mit deren metastatischen Potential assoziiert (Dimitroff et al., 2005). Ein anderes Beispiel ist CD24, bei dem bei Mammakarzinomzellen gezeigt wurde, dass es, wenn es Sialyl-Lewis X exprimiert, die hämatogene Metastasenbildung fördert, aber weniger effizient als PSGL-1 ist (Aigner et al., 1998).

Weitere E-Selektin-Liganden wurden beschrieben, die beim Rollingprozess von Leukozyten und Tumorzellen beteiligt sind. HCELL (CD15s tragendes CD44) ist eines dieser Liganden, das an L- und E-Selektin bindet und bereits auf Kolonkarzinomzellen nachgewiesen wurde (Hanley et al., 2005). Dabei korrelierte die Expression dieses Liganden mit einem hohen Potential an Knochenmetastasen (Burdick et al., 2006). Außerdem wies HCELL die höchste Affinität aller E-Selektin-Liganden auf (Sackstein, 2004). Die Glykosylierung von HCELL mit CD15s ist Voraussetzung, um als Ligand für E-Selektin zu fungieren. Auch andere Isoformen von CD44 wurden auf Kolonkarzinomen nachgewiesen, die an L-, E- und P-Selektin binden und ein scheinbar verbessertes metastatische Potential erzeugten (Hanley et al., 2006, Napier et al., 2007, Hanley et al., 2005).

Weiterhin wurde anhand von Lungenendothelzellen aufgezeigt, dass N-Cadherin an dem Rollingprozess von neutrophilen Granulozyten und von Brustkrebszellen beteiligt ist und diesen Prozess, als auch die Adhäsion dieser Zellen, positiv fördert (Strell et al., 2007).

Dass es verschiedene Adhäsionsmoleküle gibt, welche den Rollingprozess vermitteln, ist wichtig, da es auch Selektin-unabhängige Beschreibungen des Extravasationsprozesses gibt (Strell und Entschladen, 2008). Außerdem gibt es Organe, in denen keine Selektine auf dem Endothel vorkommen, in denen aber trotzdem Leukozytenmigration stattfindet, wie z. B. in der Leber. Dort gibt es ein diskontinuierliches Endothel und die extravasierenden Zellen können direkt an die darunter liegende Basalmembran und Matrixkomponenten binden z. B. durch

Integrine, wie im nächsten Schritt beschrieben (Aird, 2007b, Aird, 2007a, Strell und Entschladen, 2008).

2.3.2. Adhäsion

Bei diesem Schritt heften die Zellen fest auf den Endothelzellen an (Strell und Entschladen, 2008).

Die im Adhäsionsprozess wichtigsten Adhäsionsmoleküle von Leukozyten gehören zur Integrin β -1 und Integrin β -2 Subfamilie. Leukozyten werden während des Rollingprozess von Chemokinen aktiviert und gehen dann mit Hilfe von Integrinen eine enge und feste Bindung an das Endothel ein. Diese Aktivierung der Leukozyten durch Chemokine während des Extravasationsprozesses wird von manchen Autoren als zusätzlicher Schritt namens „Aktivierung“ bezeichnet (Strell und Entschladen, 2008, Miles et al., 2008, Kawashima, 2006, Ley et al., 2007, Lange et al., 2014).

So wird beispielsweise im Rahmen einer Sepsis eine starke Adhäsion von neutrophilen Granulozyten über α 4 β 1-Integrin (= VLA-4 (very late antigen-4)) vermittelt, welches an das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül (VCAM) -1 bindet (Ibbotson et al., 2001). Ebenso können Integrine vom Endothel exprimiert werden und so an der Adhäsion beteiligt sein. Das auf dem Endothel präsentierte Integrin- α 5 β 1 (VLA-5) kann an L1-CAM binden, ein Molekül der Immunglobulin-Superfamilie auf Lymphozyten (Ruppert et al., 1995). Weitere Studien haben gezeigt, dass Integrine auch im Adhäsionsprozess von Tumorzellen beteiligt sind. Dabei wird die feste Adhäsion durch die Interaktionen zwischen Integrinen an der Tumorzelloberfläche und ihren endothelialen Gegenrezeptoren wie VCAM-1 bzw. ICAM-1 vermittelt (Lange et al., 2014). So kam es bei einer Untersuchung an Melanomzellen zu einer Adhäsion über α 4 β 1-Integrin an das VCAM-1 des Lungenendothels. Eine erhöhte Expression von α 4 β 1-Integrin auf den Melanomzellen steigerte auch dessen metastatisches Potential (Garofalo et al., 1995, Okahara et al., 1994).

Weiterhin kann CD44 auf den Tumorzellen das Thomsen-Friedrich Antigen präsentieren und damit an Galektin-3 auf den Endothelzellen binden, was zu einer erhöhten Tumorzelladhäsion führt (Yu, 2007). Die CD44-vermittelte Bindung an

Hyaluronan kann ebenfalls an der Tumorzelladhäsion beteiligt sein (Lange et al., 2014).

Am Beispiel von Melanomzellen wurde aufgezeigt, dass auch N-Cadherin eine Schlüsselrolle bei der Adhäsion im Extravasationsprozess spielt (Qi et al., 2005).

2.3.3. Diapedese

Eine feste Adhäsion führt vermutlich zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege, sowohl in den Leukozyten oder Tumorzellen als auch Endothelzellen, was zu einem vorübergehenden Abbau von Zell-Zell-Verbindungen zwischen Endothelzellen und zur aktiven Transmigration der Zellen durch die endotheliale Barriere führt (Lange et al., 2014). Dieser Schritt heißt Diapedese (Strell und Entschladen, 2008).

Leukozyten können sowohl parazellulär als auch transzellulär durch das Endothel gelangen (Garrido-Urbani et al., 2008). Beim parazellulären oder auch junctionalen Weg wandern die Leukozyten zwischen den Endothelzellen hindurch während sie beim transzellulären Weg durch eine Endothelzelle hindurchwandern.

Es ist nicht klar, zu welchen Teilen der eine oder der andere Weg benutzt wird. Dies hängt von Faktoren wie der Leukozyten-Subpopulation oder der Dauer der Endothelaktivierung durch Zytokine ab (Petri und Bixel, 2006, Vestweber, 2007, Ley et al., 2007). Wenn Leukozyten zwischen zwei Endothelzellen migrieren, müssen die Verbindungen zwischen den Endothelzellen vorübergehend aufgehoben und durch das entsprechende Bindungsmolekül auf der Leukozytenoberfläche ersetzt werden (Strell und Entschladen, 2008).

Leukozyten transmigrieren durch das Endothel ohne dabei die Integrität des Endothels irreversibel zu beeinträchtigen. Ein Unterschied von Tumorzellen und Leukozyten in der Diapedese ist, dass Tumorzellen im Vergleich zu Leukozyten das Endothel beim Durchtritt beschädigen. Dies liegt daran, dass Tumorzellen viel größer sind als Leukozyten und nicht zwischen Endothelzellen hindurchpassen ohne Schäden zu hinterlassen (Strell und Entschladen, 2008). Die Endothelzellen gehen dabei in die Apoptose, was vermutlich auf den Verlust der Zellkontakte zurückzuführen ist (Brandt et al., 2005).

Es gibt wenige Berichte darüber, welche Adhäsionsmoleküle bei Tumorzellen in der Diapedese von Bedeutung sind. Jedoch wurde anhand einer Untersuchung von Melanomzellen vermutet, dass das Adhäsionsmolekül N-Cadherin auf die Tumorzell-diapedese Einfluss hat (Qi et al., 2005). Dort wird N-Cadherin eine Schlüsselrolle bei der transendothelialen Migration von Melanomzellen zugeschrieben, welches wie oben beschrieben, bereits im Rollingprozess und bei der Adhäsion eine Rolle zu spielen scheint. So ist die Rolle von N-Cadherin bei Tumorzellwalzen und Diapedese, hinsichtlich dessen Rezeptor-Beteiligung in jedem Schritt des Extravasationsprozesses bei Tumorzellen noch nicht so klar definiert wie bei Leukozyten (Strell und Entschladen, 2008). Es gibt auch Berichte dazu, dass eine Diapedese von Tumorzellen gar nicht nötig ist um Metastasen auszubilden. Al-Mehdi et al. (2000) zeigten in ihrem Experiment von Lungenmetastasen, dass die eigentliche Extravasation von Tumorzellen eher selten war und die extravasierten Tumorzellen schnell von den Immunzellen der Lunge entfernt wurden. Nur die intravasalen, an das Endothel gebundenen Tumorzellen, bildeten intravasale Sekundärtumoren bzw. Metastasen aus. So bleibt die Frage, ob eine Extravasation überhaupt nötig ist. Jedoch zeigten Heyder et al. (2002) an einem Beispiel von Blasenkarzinomzellen, dass diese erfolgreich durch eine Monoschicht von Nabelvenen-Endothelzellen transmigrierten. Dabei wurde das Endothel irreversibel geschädigt.

Nachdem die extravasierenden Leukozyten oder Tumorzellen das Endothel erfolgreich überschritten haben, müssen sie die Basalmembran durchdringen, um in das darunterliegende Gewebe zu gelangen. Dafür exprimieren Leukozyten und Tumorzellen Metalloproteinasen, welche die Basalmembran verdauen (Leppert et al., 1995) und eventuell auch zur Migration von Leukozyten im Gewebe beitragen (Friedl und Weigelin, 2008).

Abschließend scheinen die ersten beiden Schritte der Extravasation von Tumorzellen und Leukozyten, sprich Rolling und Adhäsion, Ähnlichkeiten in den beteiligten Mechanismen und Rezeptoren zu haben. Im Gegensatz dazu ist der dritte Schritt, die Diapedese, grundsätzlich unterschiedlich zwischen diesen beiden Zelltypen, wobei es einen Mangel an Wissen in Bezug auf Tumorzellen gibt. Außerdem lässt sich bei Tumorzellen nicht sicher sagen, welche Rezeptoren für welchen der drei Schritte benutzt werden, so wie es bei den Leukozyten der Fall ist (Strell und Entschladen, 2008). Darüber hinaus scheint es von der Tumorart abzuhängen, welcher molekulare

Weg im Rahmen der Diapedese durchlaufen wird bzw. welche Rezeptoren für das Rolling, die Adhäsion oder die Diapedese benutzt werden (Samatov et al., 2017).

2.4. Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle sind Glykoproteine, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden und eine wichtige Rolle beim normalen Gewebeszusammenhalt spielen. Daneben sind sie bei entzündlichen, wie auch bei neoplastischen Erkrankungen, von funktioneller Bedeutung. Es gibt vier Hauptgruppen von Zelladhäsionsmolekülen: die Integrin-Familie, die Immunglobulin-Superfamilie, die Selektin-Familie und die Cadherin-Familie (Elangbam et al., 1997). Auch bei der Metastasierung sind sie von besonderer Bedeutung. Ihre Modulation spielt eine wichtige Rolle bei der Ablösung metastatischer Tumorzellen vom Primärtumor, bei der Bildung von Tumorzellaggregaten im Blutstrom, sowie bei der Anheftung an Gefäßendothelien des Zielorgans und der Bildung solider Metastasen (Hart und Saini, 1992). Auch die peritoneale Tumoradhäsion ist von Adhäsionsmolekülen wie CD44 und den β -1-Integrinen abhängig. Dabei hängen sich die freien Krebszellen direkt an entferntes Mesothel an. Dieser Prozess wird durch Adhäsionsmoleküle wie CD44, Lymphozyten-Homing-Moleküle, Mitglieder der Integrin-Superfamilie, die Selektine und eine Vielzahl anderer Leukozyten-assoziiierter Adhäsionsmoleküle vermittelt (Jayne, 2003, Jayne, 2007).

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit untersuchten Adhäsionsmoleküle bzw. deren Liganden kurz vorgestellt werden.

2.4.1. CD15s

CD15s (= Sialyl-Lewis X) ist ein Tetrasaccharid-Molekül, das auf Glykoproteinen und Glykolipiden der Zelloberflächen exprimiert wird. Es wurde als wichtiger Blutgruppenantigen auf Erythrozyten und außerdem auf Neutrophilen, Monozyten, aktiven Th1-Zellen und Tumorzellen gefunden und ist ein wichtiger Ligand für E-Selektin (CD62E), L-Selektin (CD62L) und P-Selektin (CD62P) (Polley et al., 1991, Kitayama et al., 2000, Soejima und Koda, 2005, Kawashima, 2006). Die Mehrzahl

der Selektinliganden besteht aus verschiedenen Glykanstrukturen, welche die Tetrasaccharide Sialyl-Lewis X und Sialyl-Lewis A an einem Proteinrückgrat tragen (Oliveira-Ferrer et al., 2014).

Die CD15s Interaktion mit CD62E stellt einen zentrale Rolle bei dem Adhäsionsprozess von Tumorzellen an das Endothel dar (Vestweber und Blanks, 1999). Es wurde bereits gezeigt, dass metastatische Kolonkarzinomzellen durch die CD15s/CD62E-Interaktion an menschlichen Nabelvenen-Endothelzellen haften können (Burdick et al., 2003).

Außerdem spielt diese Interaktion eine Schlüsselrolle beim Homing Prozess von zirkulierenden Leukozyten (Jassam et al., 2017). So reichert sich CD15s im Rahmen von Entzündungen oder Verletzungen auf Leukozyten an und ermöglicht so eine erleichterte Adhäsion der Leukozyten an E-Selektin des Endothels und deren Extravasation. Darüber hinaus wurde CD15s auch auf dem Endothel entdeckt (Munro, 1993).

Außerdem wurde CD15s bereits 2003 von Wang et al. immunhistochemisch auf humanen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen (NSCPC), auf primären hepatozellulären Karzinomen (HCC) und auf deren Lymphknotenmetastasen nachgewiesen. Dabei lag die Anzahl der CD15s positiven Zellen beim NSCPC im Bereich von 75 % bis etwa 86 %. Beim humanen primären hepatozellulären Karzinom betrug die Expressionsraten 88,9 %. Obwohl Sialyl-Lewis X das häufigste und am stärksten erhöhte Lewis-Antigen auf der Oberfläche von NSCPC und HCC war, besonders in den Fällen mit schlechter Differenzierung und Metastasierung, gab es keine eindeutigen Hinweise darauf, dass die erhöhte Expression von CD15s mit einer schlechteren Differenzierung oder der Metastasierung zusammenhängt.

Ikeda et al. (1996) wiesen CD15s auf 60 % der Zellen im Primarius und auf 51 % der Zellen der Metastasen von Patienten mit Magenkarzinomen nach. Jedoch konnte er die Metastasierung nicht anhand der CD15s Expression vorhersagen, da sich eine heterogene Expression der Sialyl-verwandten Antigene in Primarius und Metastasen zeigte.

Anders als in den vorherigen Untersuchungen betrachtete Nakagoe et al. (2002) die Serumspiegel von CD15s bei Magenkarzinompatienten. Dabei zeigte er, dass hohe

Serumspiegel von Sialyl-Lewis X mit Lebermetastasen und Peritonealverbreitung assoziiert sind.

Dass mit der Hemmung von CD15s die Metastasenbildung reduziert werden kann, zeigten Kitayama et al. (2000). In ihrem Experiment behandelten sie Kolonkarzinomzellen mit anti-Sialyl-Lewis X vor, wodurch die Adhäsion der Zellen am Endothel signifikant gehemmt wurde.

Weiterhin wurde anhand von Gehirnmastasen von nicht kleinzelligen Lungentumoren gezeigt, dass die Interaktion von CD15s mit E-Selektin beim Adhäsionsprozess von Metastasen am Endothel eine entscheidende Rolle spielt. Dabei korrelierte die Expression von CD15s mit der Anzahl an Krebsmetastasen beim Vorhandensein von E-Selektin. Eine Immunblockierung von CD15s führte zu einer signifikant verringerten Krebszelladhäsion am Endothel (Jassam et al., 2017). Auch Matsumoto et al. (2002) zeigten, dass die Unterbindung der E-Selektin/CD15s-Wechselwirkung eine potentielle Therapieoption darstellt. In ihren Beobachtungen wurden Patienten mit kolorektalem Karzinom mit Cimetidin, einem Arzneistoff, der als H2-Antihistaminikum zur Dämpfung der Magensaftproduktion eingesetzt wird, behandelt. Cimetidin blockierte die Expression von E-Selektin auf vaskulärem Endothel und hemmte damit die Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel. Die Ergebnisse zeigten, dass die Cimetidin-Behandlung das Überleben bei kolorektalem Karzinom dramatisch verbesserte, wenn die Tumorzellen des Patienten hohe Mengen an Sialyl-Lewis X exprimierten.

2.4.2. CD44

CD44 ist ein Zelloberflächenglykoprotein und wird in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert. Dazu zählen u. a. Leukozyten, Erythrozyten verschiedene Epithelien, sowie Fibroblasten und glatte Muskelzellen. Es ist beteiligt an Zell-zu-Zell-Wechselwirkungen, Zell-zu-Matrix-Wechselwirkungen, Zelladhäsion und -migration (Assimakopoulos et al., 2002). So hat es u. a. Funktionen bei der Lymphozytenaktivierung, dem Leukozytenrolling, der Hämatopoese und der Tumormetastasierung. Außerdem ist es Rezeptor für Hyaluronan, Osteoponin, Kollagenen und Matrixmetalloproteinasen und unterstützt damit die Migration von Zellen durch die ECM und deren Ansiedlung in bestimmten Gewebekompartimenten. Durch verschiedene Spleißvarianten gibt es viele funktionell unterschiedliche

Isoformen von CD44 (Baggio et al., 2016). Eine spezielle Modifikation von CD44 ist HCELL (Hematopoietic Cell E-Selectin/L-Selectin Ligand). Sie stellt CD15s tragendes CD44 dar und ist die Selektin-bindende Glykoform von CD44 (Sackstein, 2004). HCELL wurde zuerst auf menschlichen hämatopoetischen Stammzellen und leukämischen Blasten entdeckt (Oxley und Sackstein, 2001) und später auch auf weiteren Tumorarten nachgewiesen (Burdick et al., 2006, Hanley et al., 2005, Hanley et al., 2006, Napier et al., 2007). HCELL wurde bereits in einigen Untersuchungen auf Darmkrebszellen gefunden, wo es als P-, L- und E-Selektin-Ligand und Fibrinrezeptor dient, die Bindung von Tumorzellen an Thrombozyten, Leukozyten und vaskulärem Endothel ermöglicht und damit die hämatogene Metastasierung reguliert (Alves et al., 2008, Hanley et al., 2005, Napier et al., 2007).

Es wurde am Beispiel von Kolonkarzinomen sogar postuliert, dass die Expression von HCELL, und die dadurch mögliche Tumorzellbindung an E- und L-Selektin, stabile Adhäsionswechselwirkungen mit dem Endothel hervorruft, welche für die hämatogene Krebsverbreitung unerlässlich sind (Burdick et al., 2006). Es zeigte sich, dass es ein scheinbar erhöhtes metastatisches Potential von Kolonkarzinomzellen gibt, auf denen CD44 überexprimiert ist (Hanley et al., 2006, Napier et al., 2007). Auch bei Leukämien wurde die Hochregulation von CD44 bereits mit einer erhöhten Disseminierungsneigung und einer schlechteren Prognose verbunden (Liu und Jiang, 2006).

Zahlreiche Studien wiesen also bereits darauf hin, dass es bei einigen Tumorarten zu einer Überexpression von CD44 kommt, die mit einer erhöhten Tumorprogression und Metastasierungsneigung verbunden ist.

CD44 wurde ebenfalls auf Ovarialzellkarzinomzellen nachgewiesen. Dabei wies eine hohe CD44-Expression jedoch auf einen gut differenzierten Frühstadiumtumor hin, der mit einem längeren Überleben der Patientinnen verbunden war (Sillanpaa et al., 2003).

Assimakopoulos et al. (2002) zeigten, dass in Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und des Halses die Expression einiger CD44 Spleißvariant-Isoformen herunterreguliert wurde und dass die reduzierte Expression von CD44 den Tumorzellen Wachstumsvorteile und bösartige Eigenschaften verliehen. Auch Miyake et al. (1998) beobachteten beim menschlichen Prostatakarzinom, dass CD44 angereicherte Tumorzellen eine verminderte Malignität und ein vermindertes

metastatisches Potential besitzen und vermuteten daher, dass eine CD44 Herabregulierung zur Entwicklung dieser Tumorentität beiträgt.

So wird verdeutlicht, dass es verschiedene Spleißvarianten der CD44-Familie gibt, deren unterschiedliche Ausprägung in den Tumoren zu unterschiedlichen Auswirkungen führen.

Da CD44 bei einigen Tumorentitäten hochreguliert wird und diese Hochregulation mit einer schlechteren Prognose korreliert, ist es bereits als mögliches therapeutisches Ziel im Falle von Leukämie (Liu und Jiang, 2006) diskutiert worden. Durch die verschiedenen Spleißvarianten könnte es auch einige tumorspezifische Varianten geben, welche dann als therapeutisches Ziel dienen könnten (Eibl et al., 1995) An solchen, gegen CD44 gerichteten Therapien, wird zurzeit intensiv geforscht (Baggio et al., 2016).

2.4.3. N-Cadherin

Cadherine sind kalziumabhängige transmembranale Glykoproteine. Sie gehören zur Gruppe der homophilen Adhäsionsproteine. Damit sind sie Teil von Adherens Junctions und Desmosomen und bewirken Zellkontakte in fast jedem Gewebe des Körpers (Ivanov et al., 2001). Sie spielen eine Rolle bei der Stabilisierung von Zell-zu-Zellkontakten, der Erhaltung der Zellpolarität, Signaltransduktion und der embryonalen Morphogenese.

Mehr als 80 verschiedene Cadherine konnten bislang beim Menschen identifiziert werden. Die wichtigsten darunter, welche bereits vielfach untersucht wurden, sind E-, N-, P- und VE-Cadherin (Gumbiner, 2005, Takeichi, 1988, Hatta et al., 1987, Elangbam et al., 1997, Ivanov et al., 2001).

Das N-Cadherin (neuronales Cadherin) ist erstmals 1982 von Grunwald als ein 130 kDa großes Molekül aus der Hühnerretina isoliert worden. Cadherine und insbesondere das neuronale Zelladhäsionsmolekül N-Cadherin spielen eine wichtige Rolle bei der Zellmigration. Die Zellmigration ist ein Prozess, der während der embryonalen Entwicklung, während des Erwachsenenlebens und in einigen pathologischen Zuständen essentiell ist (Derycke und Bracke, 2004). So konnten Hatta et al. (1987) und Takeichi (1988) N-Cadherin in Nervengewebe, in Herz- und Skelettmuskel und in der Linse eines Embryos nachweisen. Im adulten Organismus

wird es unter anderem in Nervengewebe und der Retina gebildet (Derycke und Bracke, 2004).

N-Cadherin wird außerdem in Endothelzellen exprimiert und spielt eine wesentliche Rolle bei der Reifung und Stabilisierung von normalen Gefäßen und Tumor-assoziierten Gefäßen und damit auch bei dem Extravasationsprozess von Leukozyten und Tumorzellen (Mariotti et al., 2007).

Wie bereits erwähnt spielen Cadherine bei der malignen Progression eine wichtige Rolle. Eine Störung ihrer Expression oder ihrer Funktion kann zu unkontrollierter Zellmigration und Proliferation während der Tumorentwicklung führen (Ivanov et al., 2001). Bei Tumoren kontrollieren Cadherine das Gleichgewicht zwischen Unterdrückung und Förderung der Invasion. E-Cadherin fungiert als Invasions-Suppressor und wird bei den meisten Karzinomen herunterreguliert, während N-Cadherin als Invasions-Promotor in der Regel hochreguliert wird. Die Herunterregulierung von E-Cadherin bewirkt die Ablösung von ursprünglichem Gewebe. Die vermehrte Expression von N-Cadherin in Epithelzellen induziert Veränderungen in der Morphologie zu einem fibroblastischen Phänotyp, wodurch die Zellen beweglicher und invasiver werden (Lascombe et al., 2006, Derycke und Bracke, 2004). Der Verlust von E-Cadherin und die de-novo-Expression von N-Cadherin kann deshalb auch als mesenchymaler Marker im EMT-Prozess angesehen werden (Bezdenezhnykh et al., 2017, Rosivatz et al., 2004, Mariotti et al., 2007, Samatov et al., 2017). N-Cadherin fördert also das Überleben der Tumorzelle, die Migration und die Invasion, sodass ein hohes Maß an Expression oft mit einer schlechten Prognose verbunden ist (Mariotti et al., 2007, Nagi et al., 2005).

Lascombe et al. (2006) identifizierten in ihren Untersuchungen N-Cadherin als unabhängigen prognostischen Marker bei der Progression oberflächlicher urothelialer Tumoren. Auch in diesem Experiment war eine erhöhte N-Cadherin-Expression und der Verlust der E-Cadherin-Expression mit invasiven Tumoren assoziiert.

Weiterhin zeigte sich bei Untersuchungen von Mammakarzinomen, dass N-Cadherin mit Tumor-Aggressivität und metastatischem Potential assoziiert ist und zur Tumorprogression beitragen kann (Nagi et al., 2005).

Im Gegensatz dazu ist bei einigen Tumorarten, wie z. B. dem Osteosarkom, N-Cadherin ein Tumorsuppressor. N-Cadherin kann also, abhängig vom zellulären Kontext, mehrere Funktionen besitzen (Derycke und Bracke, 2004).

2.4.4. Integrin β -1

Integrine sind heterodimere Proteine aus Alpha- und Beta-Untereinheiten. Mindestens 18 Alpha- und acht Beta-Untereinheiten wurden bei Säugetieren beschrieben. Integrin-Familienmitglieder sind Membranrezeptoren, die Zell-zu-Zell-, Zell-zu-extrazelluläre Matrix- und Zell-zu-Pathogen-Wechselwirkungen vermitteln (Luo et al., 2007). So sind sie an der Zelladhäsion und Zellerkennung an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, einschließlich Embryogenese, Hämostase, Gewebereparatur, Immunantwort und metastatischer Diffusion von Tumorzellen (Hynes, 1992).

Integrine verbinden die extrazelluläre Matrix mit dem Aktin-Zytoskelett und vermitteln so transmembranale Signale von außen in die Zelle (Sastry und Horwitz, 1993). Umgekehrt können Signale auch vom Zellinneren über Integrine nach außen geleitet werden. Über diesen Prozess, der als Inside-Out-Signalisierung bezeichnet wird, kann die Integrin-vermittelte Adhäsion von Zellen gesteuert werden (Luo et al., 2007). Dabei sind Chemokine die stärksten physiologischen Aktivatoren der Integrin-vermittelten Adhäsion (Laudanna et al., 2002). Diese induzieren bei den Integrinen eine Konformationsänderung, was dazu führt, dass ihre Adhäsionsfunktion, durch Änderung der Ligandenbindungsaffinität, schnell und reversibel verändert werden kann (Arnaout et al., 2005).

Die Integrin-Rezeptor-Familie ist nach den Beta-Ketten in acht Gruppen unterteilt. Integrin β -1 (= CD29) ist das am häufigsten vorkommende β -Integrin und assoziiert mit mindestens zehn verschiedenen Integrin α -Untereinheiten (Hynes, 1992). Es wird auch als sehr spätes Aktivierungsantigen (VLA) bezeichnet und vermittelt hauptsächlich Zell-Matrix-Wechselwirkungen (Strell und Entschladen, 2008). Integrin β -1 kann über alternatives Spleißen als verschiedene Isoformen existieren. Es wurde auch schon vielfach in Tumoren untersucht.

Tiermodelle haben gezeigt, dass es bei Melanomzellen zu einer Adhäsion über α 4 β 1-Integrin an das VCAM-1 des Lungenendothels kam und dass eine erhöhte Expression von α 4 β 1-Integrin auf den Melanomzellen die metastatische Kapazität erhöhte (Garofalo et al., 1995).

Außerdem zeigte sich beispielsweise beim Triple negativen Brustkrebs (TNBC), dass es eine positive Korrelation zwischen Integrin β -1-Expression und malignen Verhaltensweisen wie Zellmigration, Invasion und Arzneimittelresistenz gibt und die

Integrin β -1 Expression damit ein potentieller prognostischer Biomarker im TNBC-Patientenüberleben sein könnte (Yin et al., 2016).

Oliveira-Ferrer et al. (2014) zeigten in ihren Experimenten, dass es bei c-FOS-überexprimierenden Ovarialkarzinomzellen zu einer signifikant reduzierten Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagen I, IV), an E-Selektin, Endothel- und Mesothelzellen kommt. C-FOS ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Genexpression beteiligt ist. Die verminderte Adhäsion wurde damit begründet, dass durch die c-FOS-Überexpression im Tumorgewebe eine reduzierte Expression von Integrin β -1 und des E-Selektin-Liganden Sialyl-Lewis X zu beobachten war. Eine hohe c-FOS-Protein-Expression im Tumorgewebe war dabei mit einem signifikant verlängerten rezidivfreien und Gesamtüberleben verbunden, einer verminderten Metastasierungsneigung und hatte einen unabhängigen positiven Einfluss auf die Tumorprogression. Damit zeigen Oliveira-Ferrer et al. (2014) indirekt, dass Integrin β -1 und CD15s maßgeblich an der Adhäsion von Ovarialkarzinomzellen beteiligt zu sein scheinen, deren reduzierte Expression im Tumorgewebe den Krankheitsprozess signifikant verbessert und die Metastasierung von Ovarialkarzinomen vermindern könnte.

3. Material und Methoden

3.1. Histologisches Untersuchungsmaterial

Freundlicherweise wurden uns aus dem Labor von Herrn PD Dr. Angele aus München 64 in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben zur immunhistochemischen Untersuchung zugesandt. Von jeder Probe standen insgesamt elf Gewebeschnitte zur Verfügung.

Von den 64 Gewebeproben enthielten vier kein Tumorgewebe und waren damit für unsere Untersuchungen nicht zu verwenden. Vier weitere wurden für die Etablierung des Färbeprozesses der verschiedene Antikörper verwendet. Übrig blieben 18 Präparate von Primärtumoren und 38 Präparate von Metastasen des Kolonkarzinoms. Die 38 Metastasen bestanden aus 15 Peritonealkarzinosen, 22 Lebermetastasen und einer Lungenmetastase.

3.2. Immunhistochemie

Zunächst wurden die sich auf dem Objektträger befindenden Gewebeschnitte im Automaten (Shandon Varistain 24-4, Thermo Elektron Cooperation, Gerät nr.: 67835) mit Xylol (Diatec, Bamberg, Dtl.) entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihenfolge (Ethanol (Walter CMP GmbH und Co.KG, Kiel, Dtl.)) für die nachfolgende Färbung und Reaktion rehydriert. Alle Inkubationen wurden, soweit nicht anders beschrieben, in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt.

Das Spülen bzw. Waschen der Schnitte erfolgte immer zwei mal fünf Minuten in TBS+T, anschließend einmal fünf Minuten in TBS (pH 7,6). TBS (Tris HCL Puffer für Immunhistochemie) besteht aus Trizma Base, 60,57 g / 50 mM (Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Dtl.), NaCl 87,09 g / 150 mM (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland) und 200 ml HCl, 2 N (Chem solute, Th. Geyer GmbH und Co. KG, Remmingen Dtl.). TBS+T hat einen Zusatz von 0,1 % Tween 20 (Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Dtl.).

Die Verdünnung der verwendeten Antikörper erfolgte in „Antibody Diluent with Background Reducing Components“ (AK Diluent) (DAKO, North America, Carpinteria, USA).

Zur Kontrolle der Intensität der Enzymfärbereaktion wurde in jeder Serie jeweils ein Schnitt eines Falles, der zuvor positiv für den jeweiligen Antikörper war, mitgefärbt.

3.2.1. Darstellung von CD15s

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden nach dem, zuvor an Probegewebsschnitten des Kolonkarzinoms etablierten, CSA (Catalyzed Signal Amplifikation System) (DAKO, North America, Carpinteria, USA) Färbeprotokoll für CD15s (BD Pharmingen, San Diego, USA, Konz.: 500 µg/ml) immunhistochemisch gefärbt.

Eine Vorbehandlung für die immunhistochemische Färbung mit CD15s war nicht erforderlich. Es erfolgte eine Blockierung der unspezifischen Bindungen. Dafür wurden die Proben für jeweils 15 Minuten zuerst mit Avidin-Block, dann mit Biotin-Block und abschließend mit Proteinblock (DAKO, North America, Carpinteria, USA) inkubiert. Zwischen diesen Schritten wurde jeweils gespült, nach dem Proteinblock jedoch nicht. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper und der Isotypkontrolle. Dazu wurde der CD15s Primärantikörper 1:500 in Antibody Diluent verdünnt und je nach Gewebegröße auf dem Objektträger, 100 µl bis 200 µl des verdünnten Antikörpers auf das Gewebe pipettiert. Die Isotypkontrolle Maus IgM (DAKO, North America, Carpinteria, USA) wurde 1:300 in Antibody Diluent verdünnt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei vier °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte zur Entfernung von überschüssigen Antikörpern gewaschen. Dabei wurden die Isotypkontrollen von den eigentlichen Proben getrennt gewaschen. Es wurde der Streptavidin-Biotin-Komplex (DAKO, North America, Carpinteria, USA), bestehend aus einem ml Streptavidin K1500, 40 µl A und 40 µl B, vorbereitet. Es folgte die Inkubation mit dem 1:200 verdünnten, biotinmarkierten, sekundären Kaninchen-anti-Maus Antikörper (DAKO, North America, Carpinteria, USA) für 15 Minuten. Nach erneutem Waschen wurde der zuvor angesetzte Streptavidin-Biotin-Komplex auf die Gewebeschnitte pipettiert und für 15 Minuten inkubiert. Es wurde wiederum gespült und anschließend das Biotinyl Tyramid Amplifikationsreagenz/TNB-Verstärkung (DAKO, North America, Carpinteria, USA) aufpipettiert. Dieses wurde zuvor 1:10 mit einer Mischung aus fünf ml TBS und 25 µl Proteinblock verdünnt. Das Biotinyl Tyramid Amplifikationsreagenz verblieb für 15 Minuten auf den Schnitten. Danach wurden die

Schnitte gewaschen. Jetzt kam es zur 15 minütigen Inkubation mit der 1:200 in TBS verdünnten Strept-Avidin-alkalischen Phosphatase (Konz. 2 mg/ml) (S2890, Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Dtl.). Nach einem weiteren Spülgang wurden die Schnitte für 15 Minuten mit Permanent Red (DAKO, North America, Carpinteria, USA), zur Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase, benetzt. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Schnitte für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Kernfärbung erfolgte für zehn Sekunden mit Hämalaun (Merck, Darmstadt, Dtl.) unter einem Abzug. Die Schnitte wurden wieder für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Proben entwässert. Dies geschieht mit Hilfe eines Automaten (Shandon Varistain 24-4, Thermo Elektron Cooperation, Gerätnr.: 67835). Nun konnten die Schnitte mit Eukitt (O Kindler GmbH, Freiburg Dtl.) und Deckgläsern (Menzel Gläser, Thermo Scientific, Braunschweig, Dtl.) eingedeckelt werden.

3.2.2. Darstellung von CD44

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden nach dem, zuvor an Probegewebsschnitten des Kolonkarzinoms etablierten, CSA Färbeprotokoll für CD44 (BD Pharmingen, Cat. 550392, Konz.: 250 µg/ml) immunhistochemisch gefärbt.

Zur Vorbehandlung wurden die Schnitte in Citratpuffer (pH 6,0) (Merck, Darmstadt, Dtl., M= 210,14 g/mol) für zehn Minuten in einem Dampfkochtopf (Pascal Steamer von DAKO, North America, Carpinteria, USA) bei 100 °C vorbehandelt. Danach mussten die Proben auf Zimmertemperatur abkühlen und wurden dann in der oben erwähnten Methode gewaschen. Es erfolgte eine Blockierung der unspezifischen Bindungen. Dafür wurden die Proben für jeweils 15 Minuten zuerst mit Avidin-Block, dann mit Biotin-Block und abschließend mit Proteinblock inkubiert. Zwischen diesen Schritten wurde jeweils gespült, nach dem Proteinblock jedoch nicht. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper und der Isotypkontrolle. Dazu wurde der CD44 Primärantikörper 1:5000 (= 0,05 µg/ml) in Antibody Diluent verdünnt und je nach Gewebegröße auf dem Objektträger, 100 µl bis 200 µl des verdünnten Antikörpers auf das Gewebe pipettiert. Die Isotypkontrolle Maus-IgG2b (Konz. 100 mg/l) (DAKO, North America, Carpinteria, USA) wurde 1:2000 (= 0,05 µg/ml) in Antibody Diluent verdünnt.

Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei vier °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte zur Entfernung von überschüssigen Antikörpern gewaschen. Dabei wurden die Isotypkontrollen von den eigentlichen Proben getrennt gewaschen. Es wurde der Streptavidin-Biotin-Komplex, bestehend aus einem ml Streptavidin K1500, 40 µl A und 40 µl B, vorbereitet. Es folgte die Inkubation mit dem 1:200 verdünnten, biotinmarkierten, sekundären Kaninchen-anti-Maus Antikörper für 15 Minuten. Nach erneutem Waschen wurde der zuvor angesetzte Streptavidin-Biotin-Komplex auf die Gewebeschnitte pipettiert und für 15 Minuten inkubiert. Es wurde wiederum gespült und anschließend das Biotinyl Tyramid Amplifikationsreagenz/TNB- Verstärkung aufpipettiert. Dieses wurde zuvor 1:10 mit einer Mischung aus fünf ml TBS und 25 µl Proteinblock verdünnt. Das Biotinyl Tyramid Amplifikationsreagenz verblieb für 15 Minuten auf den Schnitten. Danach wurden die Schnitte gewaschen. Jetzt kam es zur 15 minütigen Inkubation mit der 1:1000 in TBS verdünnten Strept-Avidin-alkalischen Phosphatase (Konz. 2 mg/ml). Nach einem weiteren Spülgang wurden die Schnitte für 15 Minuten im Entwicklungscocktail unter Lichtabschluss, zur Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase, belassen. Der Entwicklungscocktail besteht aus 300 mg Natrium-Nitrit-Pulver, 7,5 ml Aqua dest., 300 µl Neufuchsin, 150 ml Trispuffer (pH 8,24), 20-30 mg Naphthol AS, 750 µl Dimethylformamid und 200 µl Tween 20 (alles Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Dtl.). Zum Stoppen der Reaktion wurden die Schnitte für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Kernfärbung erfolgte für zehn Sekunden mit Hämalaum unter einem Abzug. Die Schnitte wurden wieder für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Proben entwässert. Nun konnten die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt werden.

3.2.3. Darstellung von N-Cadherin

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden nach dem, zuvor an Probegewebsschnitten des Kolonkarzinoms etablierten, CSA Färbeprotokoll für N-Cadherin (abcam, #18203) immunhistochemisch gefärbt.

Zur Vorbehandlung wurden die Schnitte in 0,1%igem Trypsin (Biochrom AG, Berlin, Dtl.) (0,2 g in 200 ml TBS verdünnt) für zehn min in einem 37 °C warmen Wasserbad belassen. Die Reaktion wurde dann für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gestoppt. Danach wurde in der oben erwähnten Methode

gewaschen. Es erfolgte eine Blockierung der unspezifischen Bindungen. Dafür wurden die Proben für jeweils 15 Minuten zuerst mit Avidin-Block, dann mit Biotin-Block und abschließend mit Proteinblock inkubiert. Zwischen diesen Schritten wurde jeweils gespült, nach dem Proteinblock jedoch nicht. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper und der Isotypkontrolle. Dazu wurde der N-Cadherin Primärantikörper 1:10000 in Antibody Diluent verdünnt und je nach Gewebegröße auf dem Objektträger, 100 µl bis 200 µl des verdünnten Antikörpers auf das Gewebe pipettiert. Die Isotypkontrolle Kaninchen-IgG1 (DAKO, North America, Carpinteria, USA) wurde 1:200000 in Antibody Diluent verdünnt.

Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei vier °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte zur Entfernung von überschüssigen Antikörpern gewaschen. Dabei wurden die Isotypkontrollen von den eigentlichen Proben getrennt gewaschen. Es wurde der Streptavidin-Biotin-Komplex, bestehend aus einem ml Streptavidin K1500, 40 µl A und 40 µl B, vorbereitet. Es folgte die Inkubation mit dem 1:200 verdünnten, biotinmarkierten, sekundären Schwein-anti-Kaninchen Antikörper (DAKO, North America, Carpinteria, USA) für 30 Minuten. Nach erneutem Waschen wurde der zuvor angesetzte Streptavidin-Biotin-Komplex auf die Gewebeschnitte pipettiert und für 15 Minuten inkubiert. Es wurde wiederum gespült und anschließend das Biotinyl Tyramid Amplifikationsreagenz/TNB-Verstärkung aufpipettiert. Dieses wurde zuvor 1:10 mit einer Mischung aus fünf ml TBS und 25 µl Proteinblock verdünnt. Das Biotinyl Tyramid Amplifikationsreagenz verblieb für 15 Minuten auf den Schnitten. Danach wurde die Schnitte gewaschen. Jetzt kam es zur 15 minütigen Inkubation mit der 1:500 in TBS verdünnten Strept-Avidin-alkalischen Phosphatase (Konz. 2 mg/ml). Nach einem weiteren Spülgang wurden die Schnitte für 15 Minuten im Entwicklungscocktail mit 60 mg Levamisol (Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Dtl.) unter Lichtabschluss, zur Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase, belassen. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Schnitte für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Kernfärbung erfolgte für zehn Sekunden mit Hämalaum unter einem Luftabzug. Die Schnitte wurden wieder für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Proben entwässert. Nun konnten die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt werden.

3.2.4. Darstellung von Integrin β -1

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden nach dem, zuvor an Probegewebsschnitten des Kolonkarzinoms etablierten, Färbeprotokoll für Integrin β -1 (abcam, ab3167) immunhistochemisch gefärbt.

Zur Vorbehandlung wurden die Gewebeschnitte für fünf Minuten mit dem Fast Enzym (Zytomed Systems, Berlin Dtl.) vorbehandelt. Es folgte eine Spülung bei leichtem Schwenken für zwei mal fünf Minuten in TBS+T und einmal fünf Minuten in TBS. Danach wurde der primäre Integrin β -1 Antikörper auf die Schnitte pipettiert. Je nach Größe des Gewebes auf dem Objektträger 100 μ l bis 200 μ l. Dieser wurde zuvor 1:100 in AK Diluent verdünnt. Gleichzeitig erfolgte die Benetzung der Isotypkontrollen mit Mause IgG1. Diese wurde 1:50 mit AK Diluent verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurden die Schnitte gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Dabei wurden die Schnitte, die mit dem Primärantikörper benetzt wurden, getrennt von der Isotypkontrolle gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit einem biotinmarkierten, sekundären Kaninchen-anti-Maus Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 in TBS für 30 Minuten inkubiert. In der Zeit der Inkubation wurde ABC-AP (= Avidin-Biotin-Komplex) angesetzt. Dieses besteht aus 2,5 ml TBS, einem Tropfen Avidin und einem Tropfen Biotin (beides DAKO, North America, Carpinteria, USA). Der Avidin-Biotin-Komplex muss 30 Minuten vor Benutzung angesetzt werden. Es folgte eine erneute Spülung. Jetzt wurde der ABC-AP Komplex für 30 Minuten hinzugefügt. Nach einem weiteren Spülgang wurden die Schnitte für 20 Minuten mit Permanent Red, zur Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase, benetzt. Die Reaktion wurde für fünf Minuten unter fließendem Wasser gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte für zwei Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte für fünf bis zehn Sekunden mit Hämalaum unter einem Luftabzug. Die Schnitte wurden wieder für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser und für zwei Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Proben entwässert. Nun konnten die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt werden.

3.3. Histologische Auswertung

Alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurde mit einem Axioplan Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet. Zur Befunddokumentation wurden einzelne Tumorschnitte mit der digitalen AxioCam MRc5 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) fotografiert. Bei der histologischen Auswertung wurde in allen Schnitten der prozentuale Anteil der angefärbten Tumorzellen bestimmt und zur besseren Veranschaulichung anschließend in vier Abstufungen gestaffelt. Dabei erfolgte eine Abstufung in kleiner gleich 5 % ($\leq 5\%$), größer fünf bis kleiner 40 % ($>5\%$ bis $<40\%$), größer gleich 40 % bis kleiner 80 % ($\geq 40\%$ bis $<80\%$) und größer gleich 80 % ($\geq 80\%$).

Bei der Berechnung der Mittelwerte und bei der Bestimmung der Korrelation wurde nicht auf die Staffelung in vier Stufen zurückgegriffen. Es wurden hier die konkret bestimmten Werte der prozentualen Anfärbung der Tumorzellen von jedem Schnitt benutzt. Die Standardabweichung ist in Klammern hinter die Mittelwerte gesetzt.

3.4. Statistische Auswertung

Als nächstes wurde analysiert, ob es Korrelationen zwischen der Expression der Adhäsionsmoleküle auf den Tumorzellen der verschiedenen Gewebe gibt. Dabei wurde jedes untersuchte Adhäsionsmolekül mit jedem anderen in Korrelation gebracht. Zuerst wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle hinsichtlich deren Vorkommen auf den Tumorzellen der Primärtumoren und auf denen der Gesamtheit der Metastasen, also unabhängig vom Ort der Metastasierung, miteinander korreliert. Danach wurde bei der Berechnung der Korrelationen nach Metastasenarten unterschieden, das heißt Lebermetastasen und Peritonealkarzinosen getrennt betrachtet. Es wurde der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient mit Hilfe von Graphpad Prism ermittelt. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Expression von CD15s

Von den 18 Primärtumoren wiesen sieben eine CD15s-Expression der Tumorzellen von $\leq 5\%$, drei von $>5\%$ bis $<40\%$, acht von $\geq 40\%$ bis $<80\%$ und keiner von $\geq 80\%$ auf. Bei Betrachtung der Gesamtheit der 38 Metastasen lag die CD15s-Expression der Tumorzellen von 22 Metastasen bei $\leq 5\%$, von zehn bei $>5\%$ bis $<40\%$, von sechs bei $\geq 40\%$ bis $<80\%$ und bei keiner von $\geq 80\%$. Teilt man nach den Ort der Metastasierung auf, so ergab sich für die 22 Lebermetastasen, dass elf Metastasen eine CD15s-Expression der Tumorzellen von $\leq 5\%$ aufwiesen, sechs von $>5\%$ bis $<40\%$, fünf von $\geq 40\%$ bis $<80\%$ und keine $\geq 80\%$. Die Lungenmetastase wies eine CD15s-Expression von $\geq 40\%$ bis $<80\%$ der Tumorzellen auf. Eine CD15s-Expression von $\leq 5\%$ der Tumorzellen zeigten von den 15 Peritonealkarzinosen elf, bei $>5\%$ bis $<40\%$ waren es vier, bei $\geq 40\%$ bis $<80\%$ war es keine und bei $\geq 80\%$ auch keine (Abb. 1).

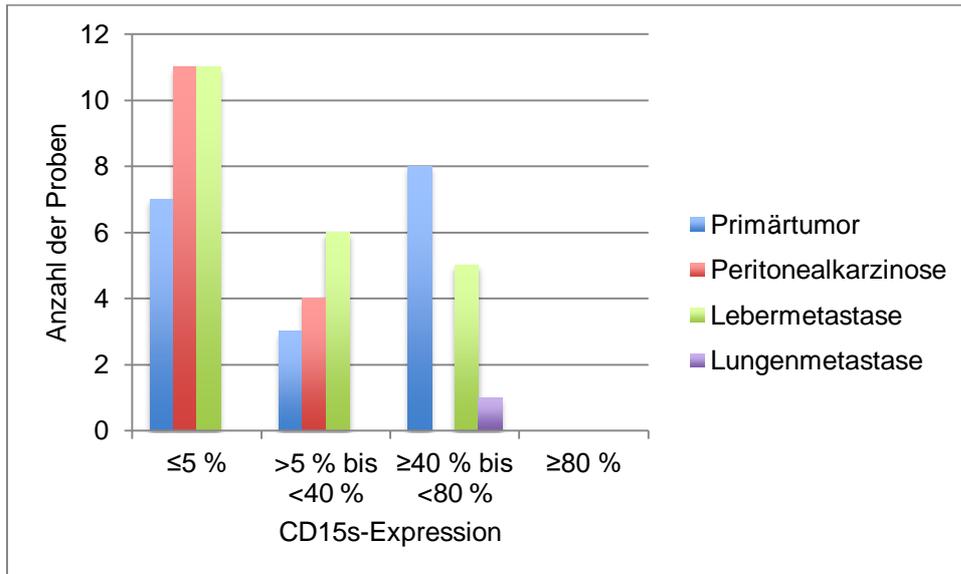


Abbildung 1: Expression von CD15s von den Tumorzellen der Primärtumoren (n= 18), der Peritonealkarzinosen (n= 15), der Lebermetastasen (n= 22) und der Lungenmetastase (n= 1) gestaffelt in $\leq 5\%$, $>5\%$ bis $<40\%$, $\geq 40\%$ bis $<80\%$ und $\geq 80\%$ (Gesamtzahl: n= 56). Im Gegensatz zu den anderen Adhäsionsmolekülen war die CD15s-Expression vor allem auf den Tumorzellen der Primärtumoren erhöht. Ein großer Teil der Primärtumore wies eine CD15s-Expression der Tumorzellen von $\geq 40\%$ bis $<80\%$ auf. Dagegen besaßen die Tumorzellen der Lebermetastasen und Peritonealkarzinosen mehrheitlich eine CD15s-Expression von $<40\%$, der Großteil sogar $\leq 5\%$. Im Vergleich zu den anderen Adhäsionsmolekülen war die Expression von CD15s in den Tumorzellen jedoch recht niedrig. Keine der Proben hatte eine CD15s-Expression von $\geq 80\%$.

Bei Berechnung der Mittelwerte zeigte die Gesamtheit der im Untersuchungsgut enthaltenen Tumorzellen eine durchschnittliche CD15s-Expression von 18% ($\pm 23\%$). Betrachtet man nur die Primärtumorzellen, ergibt sich eine durchschnittliche CD15s-Expression von 27% ($\pm 26\%$). Bei der Gesamtheit der untersuchten Metastasen zeigte sich eine durchschnittliche CD15s-Expression in den Tumorzellen von 14% ($\pm 20\%$). Unterteilt man die Metastasen nach dem Ort der Metastasierung, zeigte sich, dass die Tumorzellen der Peritonealkarzinosen im Mittel zu 4% ($\pm 4\%$) CD15s exprimierten. Bei den Tumorzellen der Lebermetastasen waren es 19% ($\pm 23\%$) und bei der Lungenmetastase 50% der Tumorzellen (Tabelle 1).

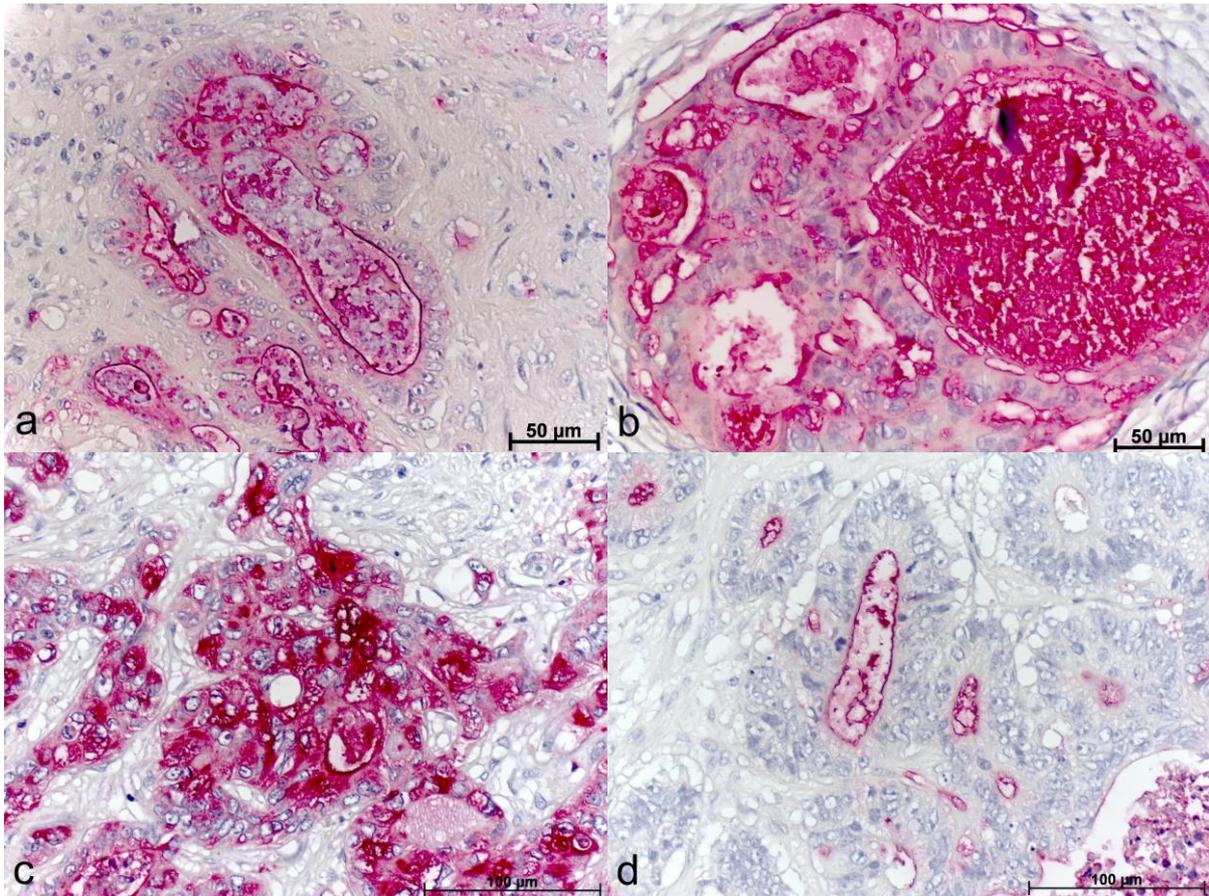


Abbildung 2: immunhistochemische Färbung von CD15s an Primärtumor- und Lebermetastaseschnitten von Kolonkarzinomen. Bilder (a) und (b) zeigen Tumorzellen aus Primärtumoren, welche positiv hinsichtlich der Expression von CD15s sind. In Bild (b) umschließen die Tumorzellen eine stark gefärbte Nekrosezone. Bilder (c) und (d) sind Ausschnitte aus einem einzelnen Lebermetastaseschnitt. Während im Bild (c) die Tumorzellen stark positiv hinsichtlich ihrer CD15s-Expression sind, weisen die Tumorzellen in Bild (d) keine CD15s-Expression auf. Nur einige Tumorzellen sind apikal gefärbt. Dies verdeutlicht die Heterogenität der Expression von Adhäsionsmolekülen und deren Liganden, hier von CD15s, selbst innerhalb einer Metastase. Vergrößerung 40-fach.

4.2. Expression von CD44

Von den 18 Primärtumoren wiesen sieben eine CD44-Expression der Tumorzellen von $\leq 5\%$, sieben von $>5\%$ bis $<40\%$, zwei von $\geq 40\%$ bis $<80\%$ und zwei von $\geq 80\%$ auf. Bei Betrachtung der Gesamtheit der 38 Metastasen lag die CD44-Expression der Tumorzellen von 15 Metastasen bei $\leq 5\%$, von elf bei $>5\%$ bis $<40\%$, von acht bei $\geq 40\%$ bis $<80\%$ und von vier bei $\geq 80\%$. Teilt man nach den Ort der Metastasierung auf, so ergab sich für die 22 Lebermetastasen, dass neun Metastasen eine CD44-Expression der Tumorzellen von $\leq 5\%$ aufwiesen, drei von

>5 % bis <40 %, sechs von ≥ 40 % bis <80 % und vier von ≥ 80 %. Die Lungenmetastase wies eine CD44-Expression von ≤ 5 % der Tumorzellen auf. Eine CD44-Expression von ≤ 5 % der Tumorzellen zeigten von den 15 Peritonealkarzinosen fünf, bei >5 % bis <40 % waren es acht, bei ≥ 40 % bis <80 % waren es zwei und bei ≥ 80 % keine (Abb. 3).

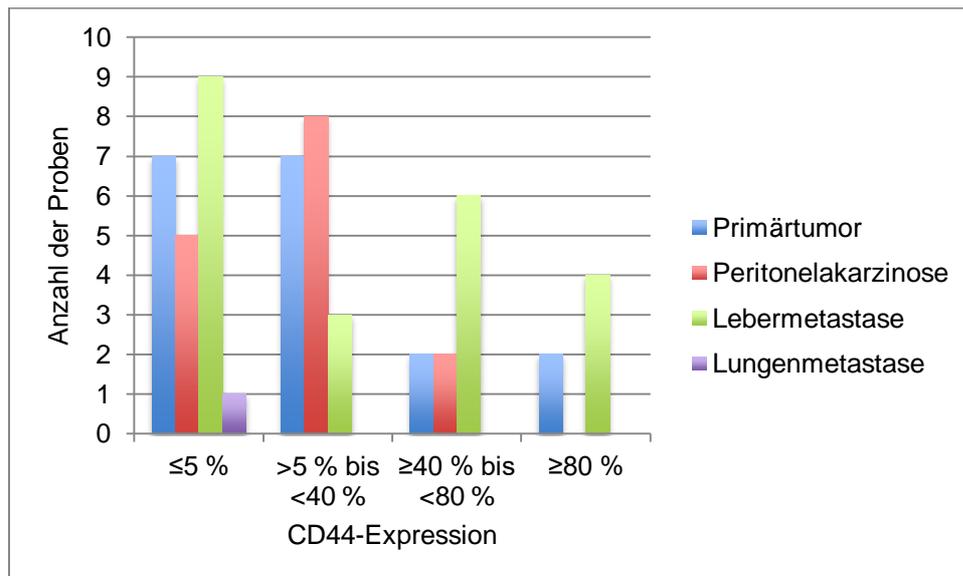


Abbildung 3: Expression von CD44 von den Tumorzellen der Primärtumoren (n= 18), der Peritonealkarzinosen (n= 15), der Lebermetastasen (n= 22) und der Lungenmetastase (n= 1) gestaffelt in ≤ 5 %, >5 % bis <40 %, ≥ 40 % bis <80 % und ≥ 80 % (Gesamtzahl: n= 56). Die Primärtumoren und Peritonealkarzinosen zeigten mehrheitlich eine CD44-Expression der Tumorzellen von ≤ 5 % oder >5 % bis <40 %. Höhere CD44-Expressionen kamen nur bei wenigen Primärtumoren oder Peritonealkarzinosen vor. Die Lebermetastasen wiesen dagegen zu annähernd gleichen Teilen eine CD44-Expression der Tumorzellen von entweder ≤ 5 % oder von ≥ 40 % auf.

Bei Berechnung der Mittelwerte zeigte die Gesamtheit der im Untersuchungsgut enthaltenen Tumorzellen eine durchschnittliche CD44-Expression von 25 % (± 29 %). Betrachtet man nur die Primärtumorzellen, ergibt sich eine durchschnittliche CD44-Expression von 24 % (± 29 %). Bei der Gesamtheit der untersuchten Metastasen zeigte sich eine durchschnittliche CD44-Expression in den Tumorzellen von 26 % (± 29 %). Unterteilt man die Metastasen nach dem Ort der Metastasierung, zeigte sich, dass die Tumorzellen der Peritonealkarzinosen im Mittel zu 18 % (± 17 %) CD44 exprimierten. Bei den Tumorzellen der Lebermetastasen waren es 33 % (± 34 %) und bei der Lungenmetastase 2,5 % der Tumorzellen (Tabelle 1).

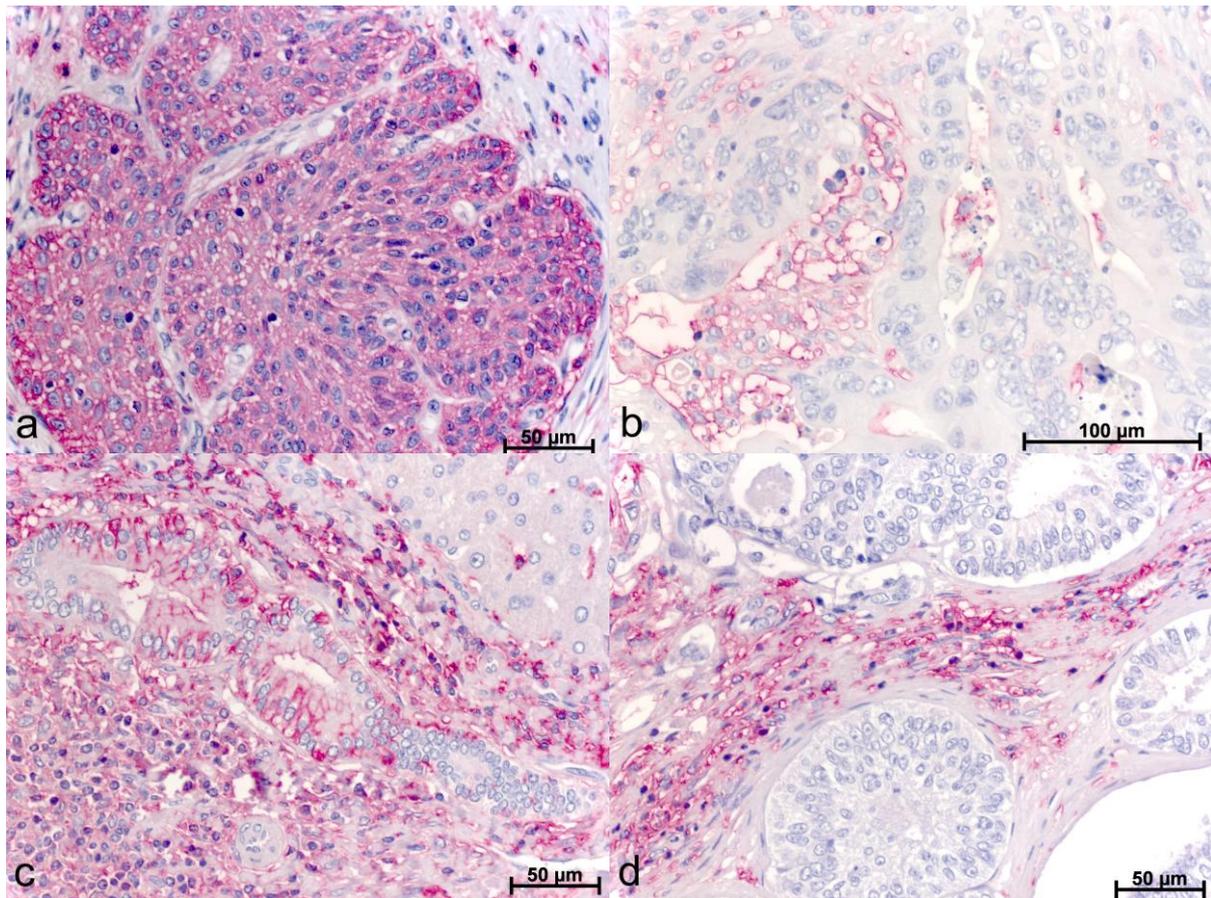


Abbildung 4: immunhistochemische Färbung von CD44 an Primärtumor-, Peritonealkarzinose- und Lebermetastaseschnitten von Kolonkarzinomen. Bild (a) zeigt Tumorzellen aus einem Primärtumor, welche stark positiv hinsichtlich der Expression von CD44 sind. Bild (b) zeigt Tumorzellen einer Peritonealkarzinose, welche zum Großteil keine CD44-Expression aufweisen. Bilder (c) und (d) sind Ausschnitte aus einem einzelnen Lebermetastaseschnitt. Während im Bild (c) die Tumorzellen stark positiv hinsichtlich ihrer CD44-Expression sind, weisen die Tumorzellen in Bild (d) keine CD44-Expression auf. Dies verdeutlicht die Heterogenität der Expression von Adhäsionsmolekülen und deren Liganden, hier von CD44, selbst innerhalb einer Metastase. Vergrößerung 40-fach.

4.3. Expression von N-Cadherin

Von den 18 Primärtumoren wiesen zwei eine N-Cadherin-Expression der Tumorzellen von $\leq 5\%$, sechs von $>5\%$ bis $<40\%$, acht von $\geq 40\%$ bis $<80\%$ und zwei von $\geq 80\%$ auf. Bei Betrachtung der Gesamtheit der 38 Metastasen lag die N-Cadherin-Expression der Tumorzellen von acht Metastasen bei $\leq 5\%$, von acht bei $>5\%$ bis $<40\%$, von zehn bei $\geq 40\%$ bis $<80\%$ und von zwölf bei $\geq 80\%$. Teilt man nach den Ort der Metastasierung auf, so ergab sich für die 22 Lebermetastasen, dass vier Metastasen eine N-Cadherin-Expression der Tumorzellen von $\leq 5\%$ aufwiesen, vier von $>5\%$ bis $<40\%$, fünf von $\geq 40\%$ bis $<80\%$ und neun von $\geq 80\%$.

Die Lungenmetastase wies eine N-Cadherin-Expression von $\geq 40\%$ bis $< 80\%$ der Tumorzellen auf. Eine N-Cadherin-Expression von $\leq 5\%$ der Tumorzellen zeigten bei den 15 Peritonealkarzinosen vier, bei $> 5\%$ bis $< 40\%$ waren es vier, bei $\geq 40\%$ bis $< 80\%$ waren es vier und bei $\geq 80\%$ drei (Abb. 5).

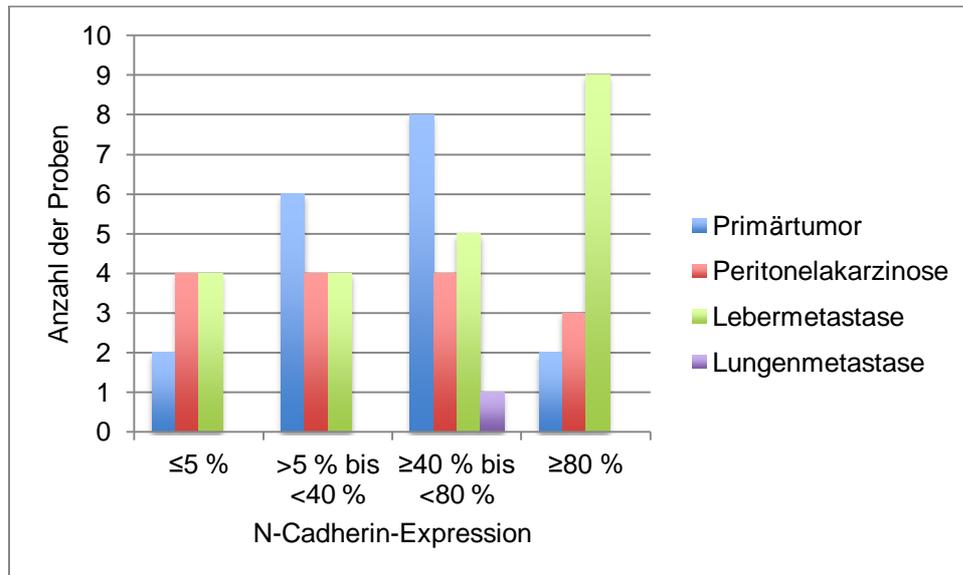


Abbildung 5: Expression von N-Cadherin von den Tumorzellen der Primärtumoren (n= 18), der Peritonealkarzinosen (n= 15), der Lebermetastasen (n= 22) und der Lungenmetastase (n= 1) gestaffelt in $\leq 5\%$, $> 5\%$ bis $< 40\%$, $\geq 40\%$ bis $< 80\%$ und $\geq 80\%$ (Gesamtzahl: n= 56). Im Gegensatz zu den anderen Adhäsionsmolekülen war die N-Cadherin-Expression sowohl auf den Tumorzellen der Primärtumoren, als auch auf denen der Metastasen, recht hoch. So wiesen viele der Proben eine N-Cadherin-Expression der Tumorzellen von $\geq 40\%$ auf. Gerade von den Lebermetastasen zeigten viele sogar eine N-Cadherin-Expression der Tumorzellen von $\geq 80\%$. Dagegen gab es nur wenige Primärtumoren mit einer N-Cadherin-Expression der Tumorzellen von $\geq 80\%$. Diese besaßen vor allem N-Cadherin-Expressionen von $> 5\%$ bis $< 40\%$ oder $\geq 40\%$ bis $< 80\%$. Die Tumorzellen der Peritonealkarzinosen zeigten sich sehr heterogen bezüglich ihrer N-Cadherin-Expression und verteilten sich recht gleichmäßig auf die vier Gruppen.

Bei Berechnung der Mittelwerte zeigte die Gesamtheit der im Untersuchungsgut enthaltenen Tumorzellen eine durchschnittliche N-Cadherin-Expression von 46% ($\pm 34\%$). Betrachtet man nur die Primärtumorzellen, ergibt sich eine durchschnittliche N-Cadherin-Expression von 42% ($\pm 29\%$). Bei der Gesamtheit der untersuchten Metastasen zeigte sich eine durchschnittliche N-Cadherin-Expression in den Tumorzellen von 48% ($\pm 36\%$). Unterteilt man die Metastasen nach dem Ort der Metastasierung, zeigte sich, dass die Tumorzellen der Peritonealkarzinosen im

Mittel zu 42 % (\pm 35 %) N-Cadherin exprimierten. Bei den Tumorzellen der Lebermetasen waren es 52 % (\pm 38 %) und bei der Lungenmetastase 50 % der Tumorzellen (Tabelle 1).

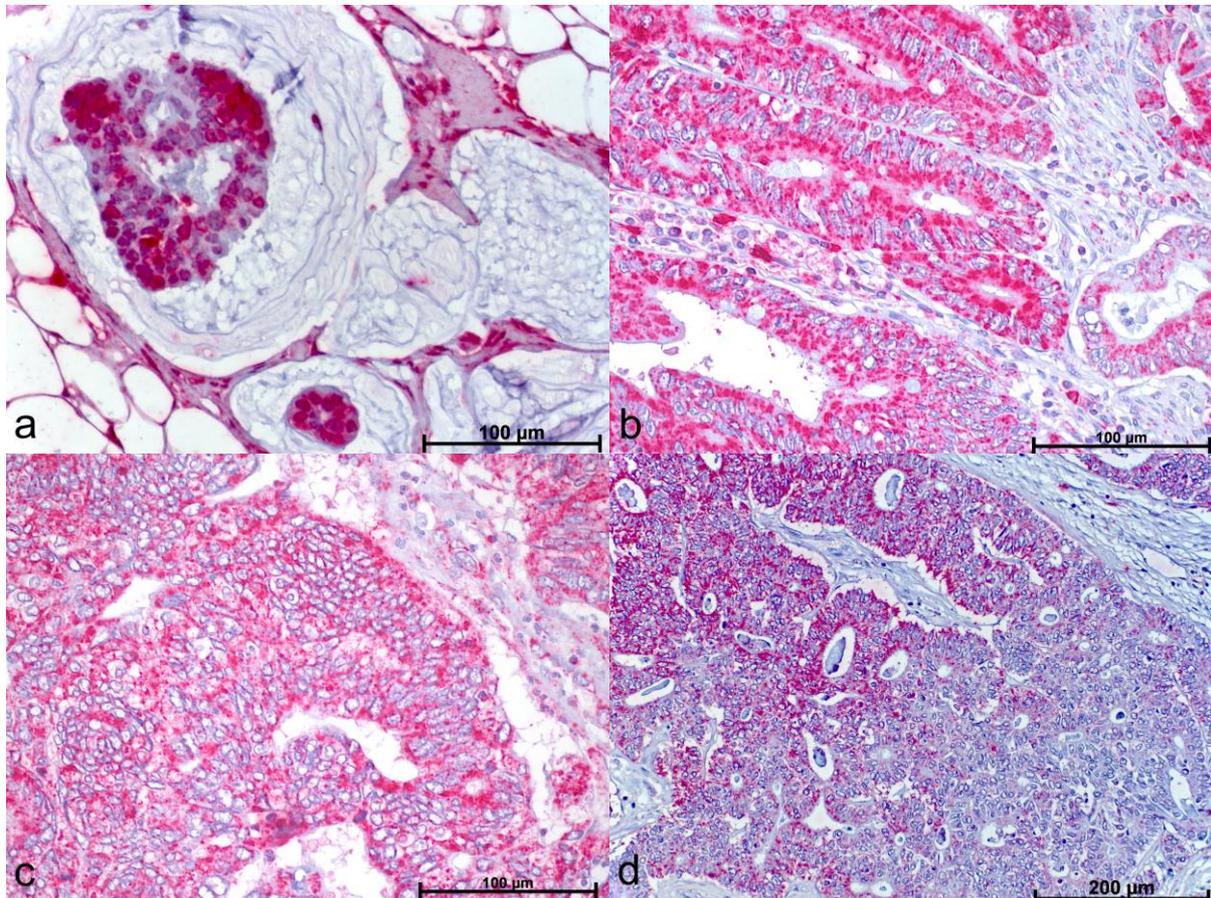


Abbildung 6: immunhistochemische Färbung von N-Cadherin an Primärtumor-, Peritonealkarzinose- und Lebermetastaseschnitten von Kolonkarzinomen. Bild (a) zeigt Tumorzellen aus einem Primärtumor, welche stark positiv hinsichtlich der Expression von N-Cadherin sind. Die Tumorzellen sind von Schleim umgeben. Bild (b) zeigt Tumorzellen einer Peritonealkarzinose und Bild (c) Tumorzellen einer Lebermetastase, welche stark positiv in der Expression von N-Cadherin sind. In Bild (d) sieht man einen Ausschnitt aus einer Lebermetastase. Während die Tumorzellen im oberen linken Bildabschnitt eine ausgeprägte N-Cadherin-Expression aufweisen, sind viele der Tumorzellen im unteren rechten Bildabschnitt negativ hinsichtlich ihrer N-Cadherin-Expression. Dies verdeutlicht die Heterogenität der Expression von Adhäsionsmolekülen und deren Liganden, hier von N-Cadherin, selbst innerhalb einer Metastase. Vergrößerung 40-fach, Bild (d) 20-fach.

4.4. Expression von Integrin β -1

Von den 18 Primärtumoren wiesen neun eine Integrin β -1-Expression der Tumorzellen von $\leq 5\%$, sechs von $>5\%$ bis $<40\%$, drei von $\geq 40\%$ bis $<80\%$ und keiner von $\geq 80\%$ auf. Bei Betrachtung der Gesamtheit der 38 Metastasen lag die Integrin β -1-Expression der Tumorzellen von 23 Metastasen bei $\leq 5\%$, von sechs bei $>5\%$ bis $<40\%$, von acht bei $\geq 40\%$ bis $<80\%$ und von einer bei $\geq 80\%$. Teilt man nach den Ort der Metastasierung auf, so ergab sich für die 22 Lebermetastasen, dass elf Metastasen eine Integrin β -1-Expression der Tumorzellen von $\leq 5\%$ aufwiesen, vier von $>5\%$ bis $<40\%$, sechs von $\geq 40\%$ bis $<80\%$ und eine von $\geq 80\%$. Die Lungenmetastase wies eine Integrin β -1-Expression der Tumorzellen von $\leq 5\%$ auf. Eine Integrin β -1-Expression von $\leq 5\%$ der Tumorzellen zeigten von den 15 Peritonealkarzinose elf, bei $>5\%$ bis $<40\%$ waren es zwei, bei $\geq 40\%$ bis $<80\%$ waren es zwei und bei $\geq 80\%$ keine (Abb. 7).

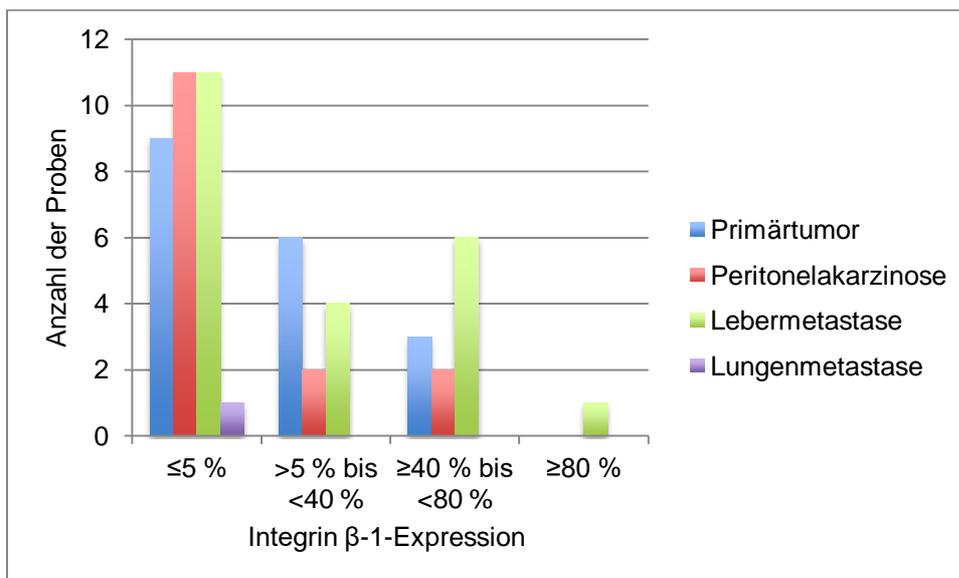


Abbildung 7: Expression von Integrin β -1 von den Tumorzellen der Primärtumoren (n= 18), der Peritonealkarzinosen (n= 15), der Lebermetastasen (n= 22) und der Lungenmetastase (n= 1) gestaffelt in $\leq 5\%$, $>5\%$ bis $<40\%$, $\geq 40\%$ bis $<80\%$ und $\geq 80\%$ (Gesamtzahl: n= 56). Es zeigte sich, dass ein großer Teil der Proben eine Integrin β -1-Expression der Tumorzellen von $\leq 5\%$ aufwies, sowohl von den Primärtumoren, als auch von den Metastasen. Erhöhte Integrin β -1-Expressionen kamen in ähnlichem Maße weniger bei den Primärtumoren und den Metastasen vor. Eine Integrin β -1-Expression der Tumorzellen von $\geq 80\%$ zeigte sich nur bei einer Lebermetastase. Letztlich konnte man bei allen vier Adhäsionsmolekülen beobachten, dass es sowohl Primärtumoren, als auch Metastasen gab, auf deren Tumorzellen die Adhäsionsmoleküle in hohem Maße exprimiert waren, und solche, auf denen sie in geringem Maße exprimiert waren. Auch dies zeigt die Heterogenität in der Expression von Adhäsionsmolekülen und deren Liganden auf.

Bei Berechnung der Mittelwerte zeigte die Gesamtheit der im Untersuchungsgut enthaltenen Tumorzellen eine durchschnittliche Integrin β -1-Expression von 18 % (\pm 25 %). Betrachtet man nur die Primärtumorzellen, ergibt sich eine durchschnittliche Integrin β -1-Expression von 15 % (\pm 19 %). Bei der Gesamtheit der untersuchten Metastasen zeigte sich eine durchschnittliche Integrin β -1-Expression in den Tumorzellen von 19 % (\pm 27 %). Unterteilt man die Metastasen nach dem Ort der Metastasierung, zeigte sich, dass die Tumorzellen der Peritonealkarzinosen im Mittel zu 11 % (\pm 22 %) Integrin β -1 exprimierten. Bei den Tumorzellen der Lebermetasen waren es 25 % (\pm 29 %) und bei der Lungenmetastase 2,5 % der Tumorzellen (Tabelle 1).

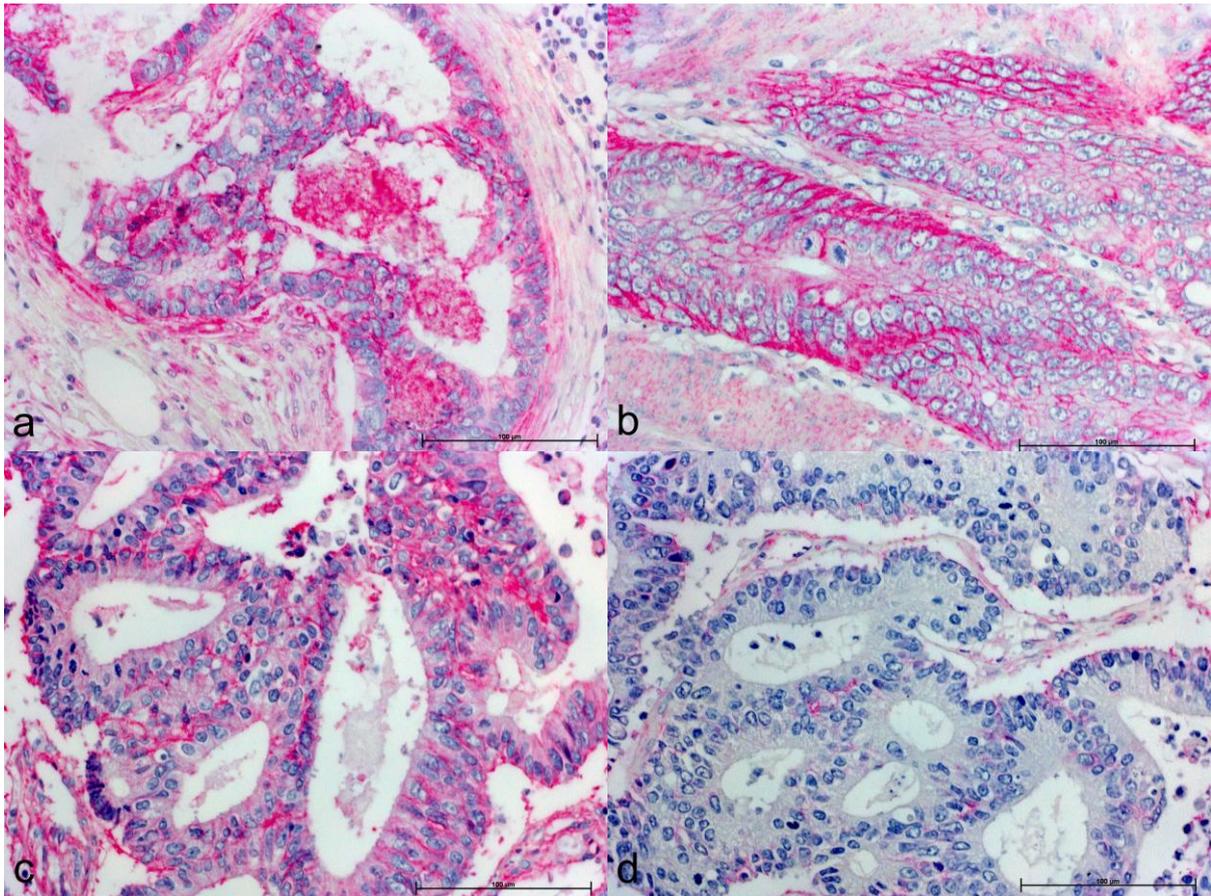


Abbildung 8: immunhistochemische Färbung von Integrin β -1 an Primärtumor-, Peritonealkarzinose- und Lebermetastaseschnitten von Kolonkarzinomen. Bild (a) zeigt Tumorzellen aus einem Primärtumor und Bild (b) Tumorzellen einer Peritonealkarzinose, welche stark positiv hinsichtlich der Expression von Integrin β -1 sind. Bilder (c) und (d) sind Ausschnitte aus einem einzelnen Lebermetastaseschnitt. Während im Bild (c) die Tumorzellen stark positiv hinsichtlich ihrer Integrin β -1-Expression sind, weisen die Tumorzellen in Bild (d) keine Integrin β -1-Expression auf. Dies verdeutlicht die Heterogenität der Expression von Adhäsionsmolekülen und deren Liganden, hier von Integrin β -1, selbst innerhalb einer Metastase. Vergrößerung 40-fach.

Tabelle 1: Durchschnittliche Expression von CD15s, CD44, N-Cadherin und Integrin β -1 von den Tumorzellen der Primärtumoren, der Gesamtheit der Metastasen und der Metastasen aufgeteilt nach Metastasenlokalisierung in Peritonealkarzinosen, Lebermetastasen und Lungenmetastase in Dezimalzahlen. Die Standardabweichung ist in Klammern gesetzt.

| Mittelwerte | CD15s | CD44 | N-Cadherin | Integrin β -1 |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Mittelwert Primärtumoren | 0,27 (\pm 0,26) | 0,24 (\pm 0,29) | 0,42 (\pm 0,29) | 0,15 (\pm 0,19) |
| Mittelwert Metastasen gesamt | 0,14 (\pm 0,2) | 0,26 (\pm 0,29) | 0,48 (\pm 0,36) | 0,19 (\pm 0,27) |
| Mittelwert PER | 0,04 (\pm 0,04) | 0,18 (\pm 0,17) | 0,42 (\pm 0,35) | 0,11 (\pm 0,22) |
| Mittelwert HEP | 0,19 (\pm 0,23) | 0,33 (\pm 0,34) | 0,52 (\pm 0,38) | 0,25 (\pm 0,29) |
| Expression PUL | 0,5 | 0,025 | 0,5 | 0,025 |
| Mittelwert aller Proben | 0,18 (\pm 0,23) | 0,25 (\pm 0,29) | 0,46 (\pm 0,34) | 0,18 (\pm 0,25) |

4.6. Korrelation

4.6.1 Korrelation der Expression von Adhäsionsmolekülen bei Primärtumorzellen

Zunächst betrachteten wir die Tumorzellen der 18 Primärtumoren und untersuchten, ob sich die Expression der Adhäsionsmoleküle auf den Primärtumorzellen korrelierte. Dabei konnten wir keine signifikante Korrelation feststellen.

4.6.2 Korrelation der Expression von Adhäsionsmolekülen bei Metastasezellen

Als nächstes betrachteten wir die 38 Metastasen in ihrer Gesamtheit ohne sie nach ihrem Metastasierungsort zu unterscheiden. Es zeigte sich eine signifikante positive Korrelation ($p= 0,009$) in der Expression von N-Cadherin und CD44 bei den Tumorzellen der Metastasen von $r= 0,417$ (Abbildung 9).

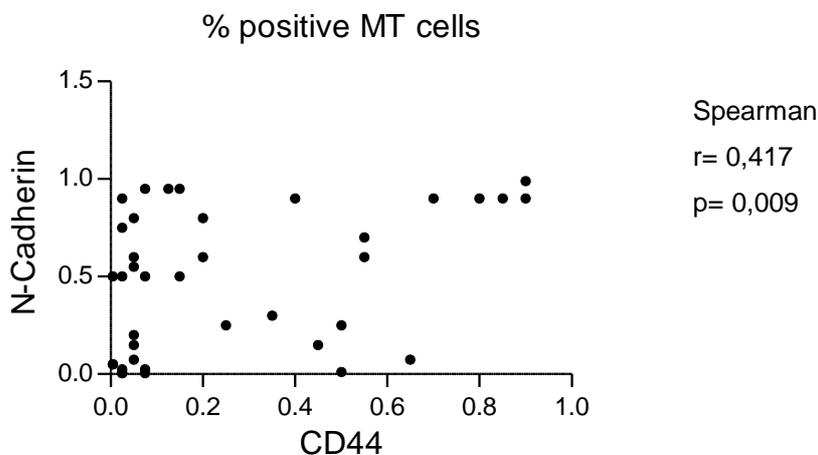


Abbildung 9: Es zeigte sich eine signifikante positive Korrelation ($p= 0,009$) von $r= 0,417$ in der Expression von N-Cadherin und CD44 auf den Tumorzellen der Gesamtheit der Metastasen ($n= 38$).

Danach betrachteten wir die Metastasen aufgeteilt nach dem Ort ihrer Metastasierung.

4.6.2.1 Korrelation der Expression von Adhäsionsmolekülen bei Peritonealkarzinosezellen

Bei der Betrachtung der Tumorzellen der 15 Peritonealkarzinosen konnten wir eine tendenzielle positive Korrelation ($p= 0,085$) von $r= 0,460$ in der Expression von Integrin β -1 und CD44 feststellen (Abbildung 10).

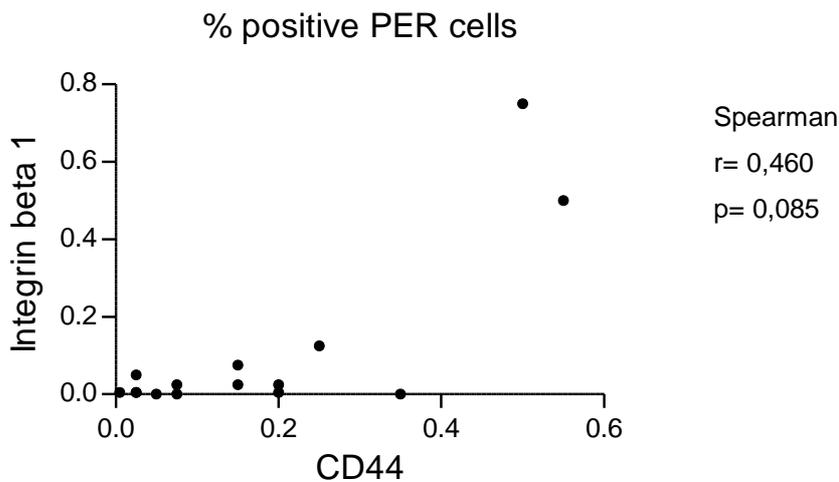


Abbildung 10: Es zeigte sich eine tendenzielle positive Korrelation ($p= 0,085$) von $r= 0,460$ in der Expression von Integrin β -1 und CD44 auf den Tumorzellen der Peritonealkarzinosen ($n= 15$).

4.6.2.2 Korrelation der Expression von Adhäsionsmolekülen bei Lebermetastasezellen

Bei der Betrachtung der Tumorzellen der 22 Lebermetastasen konnten wir eine signifikante positive Korrelation ($p= 0,026$) von $r= 0,473$ in der Expression von N-Cadherin und CD44 feststellen (Abbildung 11).

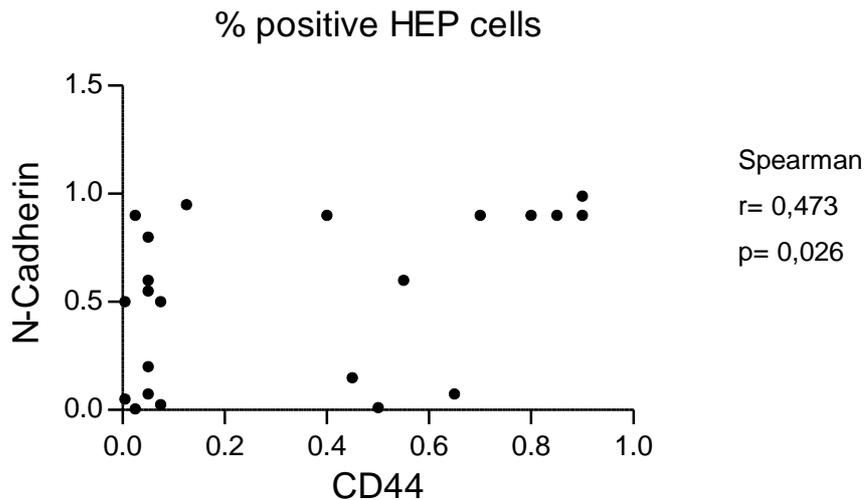


Abbildung 11: Es zeigte sich eine signifikante positive Korrelation ($p= 0,026$) von $r= 0,473$ in der Expression von N-Cadherin und CD44 auf den Tumorzellen der Lebermetastasen ($n= 22$)

Bei der Betrachtung von N-Cadherin und CD44 auf den Tumorzellen der Peritonealkarzinosen und von Integrin β -1 und CD44 auf den Tumorzellen der Lebermetastasen und der Gesamtheit der Metastasen ließ sich keine signifikante Korrelation feststellen. Die Untersuchungen der Korrelationen zwischen CD15s und CD44, CD15s und Integrin β -1, CD15s und N-Cadherin und N-Cadherin und Integrin β -1 ergaben keine signifikanten Ergebnisse, weder auf den Tumorzellen der Peritonealkarzinosen, der Lebermetastasen, oder der Gesamtheit der Metastasen (Daten nicht dargestellt).

5. Diskussion

Die Tumormetastasierung ist ein komplexer mehrstufiger Prozess, der die Ablösung einzelner oder mehrerer Tumorzellen von der primären Tumormasse, die Intravasation, die Extravasation und die Etablierung neuer Tumoren in einem entfernten Organ umfasst. Alle diese Schritte beinhalten komplizierte Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen. Folglich spielen Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle bei der Tumormetastasierung, wobei es während dieses Prozesses zu Veränderungen ihrer Expression kommt, welche für die Ausbildung von Metastasen essentiell sind (Christofori, 2003, Lambert et al., 2017).

Ziel dieser Arbeit war es, funktionell wichtige Zelladhäsionsmoleküle bzw. deren Liganden auf Kolonkarzinomzellen nachzuweisen, welche die Extravasation von Leukozyten durch das Endothel vermitteln und von denen schon Erkenntnisse vorlagen, dass sie auch bei der Metastasierung von Karzinomzellen bedeutend sein könnten, da vermutet wird, dass die Extravasation von Leukozyten und Tumorzellen durch ähnliche Mechanismen und Adhäsionsmoleküle vermittelt wird (Jassam et al., 2017, Köhler et al., 2010, Miles et al., 2008, Samatov et al., 2017, Wicklein et al., 2013).

Um funktionelle Aufschlüsse über die Mechanismen der Metastasierung zu erhalten, wurden immunhistochemische Färbungen der Adhäsionsmoleküle CD15s, CD44, N-Cadherin und Integrin β -1 auf humanen Kolonkarzinomen und deren Metastasen in Leber, Peritoneum und Lunge durchgeführt. Dadurch konnte ermittelt werden, welche Tumoren die zu untersuchenden Adhäsionsmoleküle der Leukozytenadhäsionskaskade exprimieren und in welchem Umfang. Nun konnten eventuell vorhandene Zusammenhänge oder Korrelationen in der Expression dieser Zelladhäsionsmoleküle in Primärtumorzellen und deren Metastasezellen untersucht werden.

Bei Betrachtung der durchschnittlichen Expressionen fielen bei den untersuchten Adhäsionsmolekülen Gemeinsamkeiten auf. Dabei verhielten sich drei der vier Adhäsionsmoleküle ähnlich hinsichtlich ihrer durchschnittlichen Expression auf den untersuchten Geweben.

Von CD44, N-Cadherin und Integrin β -1 war die Expression auf den Tumorzellen der Lebermetastasen durchschnittlich höher als auf denen der Primärtumoren (siehe Tabelle 1).

Diese Veränderungen im Expressionsniveau scheinen vor dem Hintergrund, dass Tumorzellen eine EMT durchlaufen und damit einen mesenchymalen, beweglichen und invasiven Phänotyp annehmen müssen, erklärlich. Für die Extravasation ist eine EMT notwendig, da die adhäsiven Wechselwirkungen zwischen zirkulierenden Tumorzellen und Endothelzellen durch heterophile Zell-zu-Zell-Kontakte, die für mesenchymale Zellen typisch sind, gesteuert werden (Lange et al., 2014).

N-Cadherin, welches schon länger als typischer mesenchymaler Marker im EMT Prozess (Bezdenezhnykh et al., 2017, Mariotti et al., 2007, Nagi et al., 2005, Rosivatz et al., 2004, Samatov et al., 2017) bekannt ist, war damit auch auf den von uns untersuchten Kolonkarzinomzellen und Metastasezellen im Durchschnitt am stärksten exprimiert. Auch CD44 wurde kürzlich als Marker beschrieben, welcher den EMT Status von Tumorzellen anzeigt (Bezdenezhnykh et al., 2017). Daher ist ihre vermehrte Expression in Lebermetastasezellen gegenüber Primärtumorzellen nachvollziehbar.

Folglich fanden wir passend dazu, eine signifikante positive Korrelation von $r= 0,473$ ($p= 0,026$) für die CD44- und N-Cadherin-Expression auf den Tumorzellen der Lebermetasen (siehe Abb. 11) und auf den Tumorzellen der Gesamtheit der untersuchten Metastasen (also Lebermetastasen zusammen mit Peritonealkarzinosen und der Lungenmetastase) eine signifikante positive Korrelation von $r= 0,417$ ($p= 0,009$) (siehe Abb. 9), welche ihre Gemeinsamkeiten als EMT förderliche Moleküle unterstützt und zeigt, dass sich N-Cadherin und CD44 ähnlich verhalten. Auch Bezdenezhnykh et al., 2017 zeigten in ihren Experimenten an Kolonkarzinomen kürzlich, dass CD44 zusammen mit N-Cadherin bei einem invasiv-metastatischen Phänotyp von Kolonkarzinomzellen vermehrt vorkommen. Gleichzeitig wurde das gemeinsame Absinken beider Adhäsionsmoleküle auf medikamentöse Therapie beschrieben.

Auch Integrin β -1 wurde bereits eine metastasefördernde Funktionen mit malignen Merkmalen, wie z. B. eine erhöhte Zellmigration und Invasion, am Beispiel von Triple negativen Brustkrebs (TNBC), zugeschrieben (Yin et al., 2016) und reiht sich damit in diesen Zusammenhang ein.

So fanden wir eine tendenziell positive Korrelation von $r = 0,460$ ($p = 0,085$) für die CD44- und Integrin β -1-Expression auf den Tumorzellen der Peritonealkarzinosen (siehe Abb. 10). Vor dem zusätzlichen Hintergrund, dass CD44 und Integrin β -1 beides Adhäsionsmoleküle sind, welche an Bestandteile der extrazellulären Matrix binden (Bellis, 2011, Baggio et al., 2016), scheint diese Korrelation nachvollziehbar.

Hinsichtlich des Ausmaßes der durchschnittlichen Expression zeigen die Peritonealkarzinosen im Vergleich zu Lebermetastasen ein gegensätzliches Bild. Bei allen vier untersuchten Adhäsionsmolekülen zeigte sich, dass ihre durchschnittlichen Expressionsraten auf den Tumorzellen der Peritonealkarzinosen deutlich geringer als auf denen der Lebermetastasen waren (siehe Tabelle 1). Dieser prinzipiell interessante Unterschied könnte sich durch die unterschiedliche Anatomie der Gefäße in Leber und Peritoneum bzw. auf die Anwesenheit von unterschiedlichen Adhäsionsmolekülen oder Liganden für Adhäsionsmoleküle auf den Endothelien der Leber und des Peritoneums erklären lassen.

Die Gefäße der Leber weisen ein fenestriertes, diskontinuierliches Endothel mit freiliegender ECM auf. Dort können die extravasierenden Zellen direkt an die darunter liegende Basalmembran und Matrixkomponenten binden z. B. durch Integrine oder CD44. Außerdem fehlt dem Extravasationsprozess in der Leber die Rollphase und auf dem Endothel der Leber kommen keine Selektine vor. So muss dort der Prozess der Extravasation über andere Adhäsionsmoleküle und Liganden vermittelt werden im Vergleich zum Peritoneum (Aird, 2007b, Aird, 2007a, Strell und Entschladen, 2008). Im Gegensatz dazu zeigten Gebauer et al. (2013), dass das Mesothel und die Endothelzellen des menschlichen Peritoneums eine kontinuierliche Expression von E- und P-Selektin aufweisen. CD15s und CD15s tragendes CD44 (HCELL) sind dabei klassische Liganden für Selektine. Daher scheint es erklärlich, dass es Unterschiede in der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Tumorzellen von Lebermetastasen und Peritonealkarzinosen gibt. Trotzdem beschreiben Oliveira-Ferrer et al. (2014), dass neben der Adhäsion am Mesothel die Adhäsion an Komponenten des zugrundeliegenden ECM eine Rolle bei der peritonealen Metastasierung spielt. Auch Jayne zeigte (2003 und 2007), dass in Tumor-Mesothel-Interaktionen mehrere Adhäsionsmoleküle, wie CD44, Integrin β -1 und Selektine, involviert sind. Hinzu kommt, dass Adhäsionsmoleküle von Tumoren als Liganden für

weitere Moleküle fungieren können (Samatov et al., 2017). So wurde $\alpha 4\beta 1$ -Integrin u.a. auch als Ligand für das endotheliale VCAM-1, im Rahmen von Lungenmetastasen bei Melanomen (Garofalo et al., 1995) beschrieben oder CD44 als Ligand für Galektin-3 auf Endothelzellen (Yu, 2007). Durch diese Tatsache wird es schwierig zu bestimmen, welche Adhäsionsmoleküle in welchem Ausmaß an der Ausbildung einer Metastase beteiligt sind. Zudem erschwert es die ursächlichen Gründe der unterschiedlichen Adhäsionsmolekülexpressionen in den von uns untersuchten Metastaselokalisationen zu ermitteln. Auch sind deutlich mehr Moleküle an der Extravasation und Ausbildung einer Metastase beteiligt, als von uns untersucht worden sind. Auf diese Schwierigkeit gehen wir weiter unten spezifischer ein.

CD15s verhielt sich in der durchschnittlichen Expression anders als die anderen Adhäsionsmoleküle. Obwohl CD15s der bisher bekannteste Selektinligand ist, war seine Expression auf den Tumorzellen der Metastasen geringer als auf denen der Primärtumoren.

Die Tatsache, dass das Leberendothel keine Selektine exprimiert, wie eben erwähnt, könnte auch erklären warum CD15s, welches als klassischer Ligand für Selektine im Rollprozess fungiert (Köhler et al., 2010), das einzige der von uns untersuchten Adhäsionsmoleküle war bei dem die durchschnittliche Expressionsrate auf den Tumorzellen der Lebermetastasen geringer war als auf denen der Primärtumoren. Leider erklärt dieser Befund nicht, warum die Tumorzellen der Lebermetastasen durchschnittlich trotzdem mehr CD15s exprimierten als die der Peritonealkarzinosen (siehe Tabelle 1), obwohl die Lebergefäße keine Selektine besitzen an denen CD15s als Ligand fungieren kann, Mesothel- und Endothelzellen des Peritoneums jedoch eine kontinuierliche Expression von E- und P-Selektin aufweisen, wie bereits erwähnt (Gebauer et al., 2013). Doch es ist auch seit Jahrzehnten bekannt, dass die Anwesenheit von Sialyl-Lewis X allein nicht ausreichend ist, um als Selektin-Ligand zu funktionieren (Varki, 1997).

So konnten auch Nakagoe et al. (2002) bei Magenkarzinompatienten zeigen, dass hohe Serumspiegel von CD15s mit Lebermetastasen und Peritonealverbreitung assoziiert sind.

Obwohl sowohl CD15s, als auch CD15s tragendes CD44 (HCELL als Homingrezeptor für hämatopoetische Stammzellen), als Liganden für Selektine fungieren, ergaben unsere Korrelationsberechnungen keinen Zusammenhang zwischen der Expression von CD15s und CD44, sowohl auf Primärtumorzellen, als auch auf Metastasezellen von Kolonkarzinomen. So lässt sich vermuten, dass die Expression von CD15s und CD44 unabhängig voneinander ist. Als Gemeinsamkeit konnten wir lediglich feststellen, dass bei beiden die durchschnittliche Expression bei den Peritonealkarzinosezellen geringer war als bei den Primärtumorzellen.

Oliveira-Ferrer et al. (2014) konnten bei Ovarialkarzinomen feststellen, dass eine Überexpression des Transkriptionsfaktors c-FOS im Tumorgewebe eine reduzierte Expression von sowohl Integrin β -1, als auch von CD15s zur Folge hatte, was Gemeinsamkeiten in deren Expressionsverhalten vermuten lässt. In unseren Fällen von Kolonkarzinomen und deren Metastasen ergaben die Korrelationsberechnungen jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Expression von Integrin β -1 und CD15s. So lässt sich vermuten, dass auch die Expression von Integrin β -1 und CD15s, sowohl auf Primärtumorzellen, als auch auf Metastasezellen von Kolonkarzinomen, unabhängig voneinander ist und die Integrin-vermittelte und CD15s-vermittelte Extravasation unabhängig voneinander ablaufen. Auch bei diesen beiden Adhäsionsmolekülen konnten wir lediglich feststellen, dass ihre durchschnittliche Expression bei den Peritonealkarzinosezellen geringer war als bei den Primärtumorzellen.

Wie oben bereits kurz erwähnt, ist es schwierig ein bestimmtes Adhäsionsmolekül als metastasenausbildend zu bestimmen.

Dies liegt zum einen daran, dass sich in Tumorproben Millionen Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen befinden. Die vereinzelt Tumorzellen im Primärtumor, welche die EMT erfolgreich durchlaufen haben und damit zur Metastasierung befähigt sind, oder die Tumorzellen in Metastasen, welche die MET noch nicht abgeschlossen haben, verschwinden im Hintergrund von epithelial differenzierten Tumorzellen (Lambert et al., 2017, Samatov et al., 2017). Damit wird die Suche nach Tumorzellen, welche einen mesenchymalen Phänotyp haben und damit metastasenausbildend sind verschleiert. Würde man es schaffen, nur jene Tumorzellen immunhistochemisch zu färben, welche die EMT erfolgreich durchlaufen

haben und mesenchymal verändert sind, dann würde man jene Moleküle, welche im Prozess der Metastasierung wichtig sind, leichter identifizieren können.

Zum anderen benutzen Tumorzellen für die Extravasation Kaskaden von Adhäsionsmolekülen, welche redundant angelegt sind, d. h. dass mehrere Moleküle die gleiche Funktion besitzen (Lange et al., 2014, Samatov et al., 2017). Außerdem gibt es bei Tumorzellen keine klaren Unterschiede, welche Rezeptoren für das Rolling, die Adhäsion oder Diapedese benutzt werden, wie es bei Leukozyten der Fall ist (Samatov et al., 2017, Strell und Entschladen, 2008). Auch gibt es auf dem Weg vom Primärtumor zur Metastase zahlreiche Veränderungen und Anpassungsvorgänge in den Tumorzellen (Lambert et al., 2017). So zeigten Köhler et al. (2010) und Lange et al. (2014), dass die Expression von Adhäsionsmolekülen und deren Glykokonjugaten, wie CD15s, im Rahmen der EMT und MET ständigen Veränderungen unterworfen sind, sie einem dynamischen Prozess unterliegen und so zur enormen zellulären Plastizität metastasierender Tumorzellen beitragen (Samatov et al., 2017).

Bereits 1996 zeigten Ikeda et al. am Beispiel vom Magenkarzinom, dass es in den primären und metastatischen Läsionen eine sehr heterogene Expression von Sialylverwandten Antigenen gibt.

Auch zeigten bereits verschiedene Autoren, dass, wenn man ein Adhäsionsmolekül ausschaltet, von dem man glaubte, dass es entscheidend für die Metastasierung ist, zwar die Anzahl der transmigrierenden Zellen und die Anzahl der Metastasen zurückgeht, die Metastasierung aber nicht vollständig gestoppt wird, so z. B. Qi et al. (2005) am Beispiel von N-Cadherin auf Melanomzellen oder Gebauer et al. (2013) am Beispiel der Selektine für die intraperitoneale Metastasenbildung. Diese Befunde verdeutlichen, dass nicht ein Adhäsionsmolekül alleine für den Prozess der Transmigration/Diapedese verantwortlich sein kann, was eine Grundhypothese unserer Arbeit darstellte.

Das Expressionsverhalten von Adhäsionsmolekülen auf Tumorzellen ist also insgesamt sehr heterogen. Dies lässt sich auch deutlich an den immunhistochemischen Bildern erkennen. So sind z. B. in einem einzelnen Lebermetastaseschnitt einige Tumorzellen stark positiv hinsichtlich ihrer Integrin β -1-Expression, während andere Tumorzellen keine Integrin β -1-Expression aufweisen (siehe Abb. 8, Bild c und d). Gleiches gilt für CD15s (siehe Abb. 2, Bild c und d),

CD44 (siehe Abb. 4, Bild c und d) und N-Cadherin (siehe Abb. 6, Bild d). Zudem kann man in den Abbildungen 1, 3, 5 und 7 erkennen, dass sich unsere Gewebeproben teils stark in der prozentualen Expression der Adhäsionsmoleküle unterscheiden. Man konnte bei allen vier Adhäsionsmolekülen beobachten, dass es sowohl Primärtumoren, als auch Metastasen gab, auf deren Tumorzellen die Adhäsionsmoleküle in hohem Maße exprimiert waren, und solche, auf denen sie in geringem Maße exprimiert waren. Das spiegelte sich ebenso in den hohen Standardabweichungen der Mittelwerte wider (Tabelle 1). Auch dies zeigt die Heterogenität in der Expression von Adhäsionsmolekülen und deren Liganden auf.

Für die erfolgreiche Metastasierung in ein entferntes Organ müssen letztlich auch nicht alle Zellen in einem Tumor oder einer Metastase zur Metastasierung befähigt sein. Die Metastase entsteht aus einer Zelle oder einem Zellhaufen und vermehrt sich dann im Organ (Lambert et al., 2017). Für die erfolgreiche Extravasation muss also nur die eine Ursprungszelle die dafür benötigten Adhäsionsmoleküle besitzen.

Bei den Primärtumorzellen konnten wir keine Korrelationen hinsichtlich der Adhäsionsmolekülexpression feststellen. Dass wir nur signifikante Korrelationen der Adhäsionsmolekülexpression untereinander innerhalb der Metastasen fanden scheint vor dem Hintergrund, dass unzählige Tumorzellen in die Gefäße gelangen, aber nur wenige den Prozess der Extravasation und die erfolgreiche Ausbildung einer Fernmetastase schaffen, durchaus erklärlich (Samatov et al., 2017). So findet im Prozess der Metastasierung eine Selektion von Tumorzellen und deren Adhäsionsmolekülen statt bezüglich der Moleküle, die für die Extravasation erforderlich sind, bzw. die Metastasen von den Zellen abstammen, welche diese Adhäsionsmoleküle besaßen.

Insgesamt konnten wir in unserer Untersuchung die Adhäsionsmoleküle CD15s, CD44, N-Cadherin und Integrin β -1 auf Kolonkarzinomzellen und deren Metastasen nachweisen, sowie Gemeinsamkeiten, Unterschiede und Korrelationen in ihrer Expression auf Tumor- und Metastasezellen nachweisen.

Dabei betrachteten wir jedoch nur zwei Zustände im umfassenden Prozess der Metastasierung, den Zustand des Primärtumors und den Zustand der Metastase.

So verlangten Samatov et al. (2017) folglich richtig, dass man diesen komplexen Prozess nicht in einer Analyse, die zu einem bestimmten Zeitpunkt gemacht wird oder nur einen Ort oder ein Gewebe betrifft, entschlüsseln kann. Man braucht physiologische Modelle um den Gesamtprozess zu entwirren. Man muss das große Ganze sehen, wie es bereits Aristoteles postulierte: „The whole is greater than the sum of it's parts“.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von Adhäsionsmolekülen der Leukozytenadhäsionskaskade, genauer von CD15s, CD44, N-Cadherin und Integrin β -1, auf Kolonkarzinomzellen und deren Metastasen in klinischem Material nachzuweisen und eventuell vorhandene Zusammenhänge in der Adhäsionsmolekülexpression zu identifizieren. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen von 18 Primärtumoren, 15 Peritonealkarzinosen, 22 Lebermetastasen und einer Lungenmetastase angefertigt und die Expression der Adhäsionsmoleküle auf deren Tumorzellen analysiert und korreliert.

Trotz der vorhandenen Heterogenität hinsichtlich der Expression von Adhäsionsmolekülen und deren Liganden auf Tumorzellen, konnten wir in unseren untersuchten Patientenfällen Gemeinsamkeiten in der Expression von CD44, N-Cadherin und Integrin β -1 feststellen. Wir identifizierten für CD44 und N-Cadherin auf den Tumorzellen der Lebermetastasen eine signifikante positive Korrelation von $r = 0,473$ ($p = 0,026$) und auf den Tumorzellen der Gesamtheit der untersuchten Metastasen eine signifikante positive Korrelation von $r = 0,417$ ($p = 0,009$). Außerdem zeigte sich eine tendenziell positive Korrelation von $r = 0,460$ ($p = 0,085$) für CD44 und Integrin β -1 in den Tumorzellen der Peritonealkarzinosen. Zudem waren ihre Expressionen in den Tumorzellen der Lebermetastasen höher als in denen der Peritonealkarzinosen und Primärtumoren. CD15s verhielt sich dahingehend anders, dass es vor allem auf den Primärtumorzellen exprimiert wurde. Vermutete Zusammenhänge in der Expression von CD15s und CD44 oder von CD15s und Integrin β -1 konnten wir nicht bestätigen. In unseren Untersuchungen war ihre Expression unabhängig voneinander. In den Tumorzellen der Primärtumoren ließ sich keine Korrelation der Adhäsionsmoleküle feststellen.

Alles in allem konnten wir Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Expression von CD15s, CD44, N-Cadherin und Integrin β -1 auf Kolonkarzinomzellen und deren Metastasen in klinischem Material aufzeigen und vorhandene Korrelationen in der Expression identifizieren.

Abstract

The aim of this work was to detect the expression of adhesion molecules of the leukocyte adhesion cascade, more specifically CD15s, CD44, N-cadherin and integrin β -1 in colon carcinoma cells and their metastases in clinical material and to identify any correlation regarding adhesion molecule expression. For this purpose, immunohistochemical staining of 18 primary tumors, 15 peritoneal carcinomas, 22 liver metastases and one lung metastasis were prepared and the expression of the adhesion molecules of the tumor cells was analyzed and correlated.

Despite the heterogeneity with regard to the expression of adhesion molecules and their ligands on tumor cells, we were able to identify similarities in the expression of CD44, N-cadherin and integrin β -1 in our investigated cases. We identified a significant positive correlation of $r = 0.473$ ($p = 0.026$) for CD44 and N-cadherin on the tumor cells of the liver metastases and a significant positive correlation of $r = 0.417$ ($p = 0.009$) on the tumor cells of all examined metastases. In addition, there was a tendency for a positive correlation of $r = 0.460$ ($p = 0.085$) for CD44 and integrin β -1 expression in the cancer cells of peritoneal carcinomas. Furthermore the expression of CD44, N-cadherin and integrin β -1 in the tumor cells of the liver metastases were higher than those of the peritoneal carcinomas and primary tumors. CD15s behaved differently as it was mainly expressed on primary tumor cells. We could not confirm hypothesized correlations in the expression of CD15s and CD44 or of CD15s and integrin β -1. In our studies, their expression was independent of each other. In the tumor cells of the primary tumors, no correlation of the adhesion molecules could be detected.

Hence, we were able to demonstrate similarities and differences in the expression of CD15s, CD44, N-cadherin, and integrin β -1 on colon carcinoma cells and their metastases in clinical material, and to identify existing correlations in their expression.

7. Literaturverzeichnis

AIGNER, S., RAMOS, C. L., HAFEZI-MOGHADAM, A., LAWRENCE, M. B., FRIEDERICHS, J., ALTEVOGT, P. & LEY, K. 1998. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *Faseb j*, 12, 1241-51.

AIRD, W. C. 2007a. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*, 100, 158-73.

AIRD, W. C. 2007b. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*, 100, 174-90.

AL-MEHDI, A. B., TOZAWA, K., FISHER, A. B., SHIENTAG, L., LEE, A. & MUSCHEL, R. J. 2000. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med*, 6, 100-2.

ALVES, C. S., BURDICK, M. M., THOMAS, S. N., PAWAR, P. & KONSTANTOPOULOS, K. 2008. The dual role of CD44 as a functional P-selectin ligand and fibrin receptor in colon carcinoma cell adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294, C907-16.

ARNAOUT, M. A., MAHALINGAM, B. & XIONG, J. P. 2005. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 381-410.

ASSIMAKOPOULOS, D., KOLETTAS, E., PATRIKAKOS, G. & EVANGELOU, A. 2002. The role of CD44 in the development and prognosis of head and neck squamous cell carcinomas. *Histol Histopathol*, 17, 1269-81.

BAGGIO, C., BARILE, E., DI SORBO, G., KIPPS, T. J. & PELLECCIA, M. 2016. The cell surface receptor CD44: NMR based characterization of putative ligands. *ChemMedChem*, 11, 1097-106.

- BARTHEL, S. R., GAVINO, J. D., DESCHENY, L. & DIMITROFF, C. J. 2007. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 11, 1473-91.
- BELLIS, S. L. 2011. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*, 32, 4205-10.
- BEZDENEZHNYKH, N., KOVALOVA, O., LYKHOVA, O., KOCHERGA, R., VORONTSOVA, A., ZHYLCHUK, V., MAKSIMYAK, G. I. & KUDRYAVETS, Y. 2017. Effect of antitumor drugs in low concentrations on the biological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics of human colon cancer cells in vitro. *Exp Oncol*, 39, 17-24.
- BORSIG, L., WONG, R., FERAMISCO, J., NADEAU, D. R., VARKI, N. M. & VARKI, A. 2001. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3352-7.
- BOYLE, P. & FERLAY, J. 2005. Mortality and survival in breast and colorectal cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2, 424-5.
- BOYLE, P. & LANGMAN, J. S. 2000. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *Bmj*, 321, 805-8.
- BRANDT, B., HEYDER, C., GLORIA-MAERCKER, E., HATZMANN, W., ROTGER, A., KEMMING, D., ZANKER, K. S., ENTSCHLADEN, F. & DITTMAR, T. 2005. 3D-extravasation model -- selection of highly motile and metastatic cancer cells. *Semin Cancer Biol*, 15, 387-95.
- BURDICK, M. M., CHU, J. T., GODAR, S. & SACKSTEIN, R. 2006. HCELL is the major E- and L-selectin ligand expressed on LS174T colon carcinoma cells. *J Biol Chem*, 281, 13899-905.

BURDICK, M. M., MCCAFFERY, J. M., KIM, Y. S., BOCHNER, B. S. & KONSTANTOPOULOS, K. 2003. Colon carcinoma cell glycolipids, integrins, and other glycoproteins mediate adhesion to HUVECs under flow. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, C977-87.

CAMPOS, F. G., LOGULLO WAITZBERG, A. G., KISS, D. R., WAITZBERG, D. L., HABR-GAMA, A. & GAMA-RODRIGUES, J. 2005. Diet and colorectal cancer: current evidence for etiology and prevention. *Nutr Hosp*, 20, 18-25.

CHAN, A. T., ARBER, N., BURN, J., CHIA, W. K., ELWOOD, P., HULL, M. A., LOGAN, R. F., ROTHWELL, P. M., SCHROR, K. & BARON, J. A. 2012. Aspirin in the chemoprevention of colorectal neoplasia: an overview. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5, 164-78.

CHRISTOFORI, G. 2003. Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *Embo j*, 22, 2318-23.

COMPTON, C. C. 1999. Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? *Dig Dis*, 17, 67-79.

CUNNINGHAM, D., ATKIN, W., LENZ, H. J., LYNCH, H. T., MINSKY, B., NORDLINGER, B. & STARLING, N. 2010. Colorectal cancer. *Lancet*, 375, 1030-47.

DERYCKE, L. D. & BRACKE, M. E. 2004. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol*, 48, 463-76.

DIMITROFF, C. J., DESCHENY, L., TRUJILLO, N., KIM, R., NGUYEN, V., HUANG, W., PIANTA, K. J., KUTOK, J. L. & RUBIN, M. A. 2005. Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells. *Cancer Res*, 65, 5750-60.

EADEN, J. A., ABRAMS, K. R. & MAYBERRY, J. F. 2001. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, 48, 526-35.

EIBL, R. H., PIETSCH, T., MOLL, J., SKROCH-ANGEL, P., HEIDER, K. H., VON AMMON, K., WIESTLER, O. D., PONTA, H., KLEIHUES, P. & HERRLICH, P. 1995. Expression of variant CD44 epitopes in human astrocytic brain tumors. *J Neurooncol*, 26, 165-70.

ELANGBAM, C. S., QUALLS, C. W., JR. & DAHLGREN, R. R. 1997. Cell adhesion molecules--update. *Vet Pathol*, 34, 61-73.

FLEMING, M., RAVULA, S., TATISHCHEV, S. F. & WANG, H. L. 2012. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*, 3, 153-73.

FRIEDL, P. & WEIGELIN, B. 2008. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol*, 9, 960-9.

GAROFALO, A., CHIRIVI, R. G., FOGLIENI, C., PIGOTT, R., MORTARINI, R., MARTIN-PADURA, I., ANICHINI, A., GEARING, A. J., SANCHEZ-MADRID, F., DEJANA, E. & ET AL. 1995. Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases. *Cancer Res*, 55, 414-9.

GARRIDO-URBANI, S., BRADFIELD, P. F., LEE, B. P. & IMHOF, B. A. 2008. Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. *Biochem Soc Trans*, 36, 203-11.

GEBAUER, F., WICKLEIN, D., STUBKE, K., NEHMANN, N., SCHMIDT, A., SALAMON, J., PELDSCHUS, K., NENTWICH, M. F., ADAM, G., TOLSTONOG, G., BOCKHORN, M., IZBICKI, J. R., WAGENER, C. & SCHUMACHER, U. 2013. Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp--/rag2-- mice. *Gut*, 62, 741-50.

- GUMBINER, B. M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 622-34.
- HALF, E., BERCOVICH, D. & ROZEN, P. 2009. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis*, 4, 22.
- HANLEY, W. D., BURDICK, M. M., KONSTANTOPOULOS, K. & SACKSTEIN, R. 2005. CD44 on LS174T colon carcinoma cells possesses E-selectin ligand activity. *Cancer Res*, 65, 5812-7.
- HANLEY, W. D., NAPIER, S. L., BURDICK, M. M., SCHNAAR, R. L., SACKSTEIN, R. & KONSTANTOPOULOS, K. 2006. Variant isoforms of CD44 are P- and L-selectin ligands on colon carcinoma cells. *Faseb j*, 20, 337-9.
- HART, I. R. & SAINI, A. 1992. Biology of tumour metastasis. *Lancet*, 339, 1453-7.
- HATTA, K., TAKAGI, S., FUJISAWA, H. & TAKEICHI, M. 1987. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol*, 120, 215-27.
- HEYDER, C., GLORIA-MAERCKER, E., ENTSCHLADEN, F., HATZMANN, W., NIGGEMANN, B., ZANKER, K. S. & DITTMAR, T. 2002. Realtime visualization of tumor cell/endothelial cell interactions during transmigration across the endothelial barrier. *J Cancer Res Clin Oncol*, 128, 533-8.
- HYNES, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.
- IADOCICCO, K., MONTEIRO, L. H. & CHAUI-BERLINCK, J. G. 2002. A theoretical model for estimating the margination constant of leukocytes. *BMC Physiol*, 2, 3.

IBBOTSON, G. C., DOIG, C., KAUR, J., GILL, V., OSTROVSKY, L., FAIRHEAD, T. & KUBES, P. 2001. Functional alpha4-integrin: a newly identified pathway of neutrophil recruitment in critically ill septic patients. *Nat Med*, 7, 465-70.

IKEDA, Y., MORI, M., KAJIYAMA, K., HARAGUCHI, Y., SASAKI, O. & SUGIMACHI, K. 1996. Immunohistochemical expression of sialyl Tn, sialyl Lewis a, sialyl Lewis a-b-, and sialyl Lewis x in primary tumor and metastatic lymph nodes in human gastric cancer. *J Surg Oncol*, 62, 171-6.

IRVING, A. A., YOSHIMI, K., HART, M. L., PARKER, T., CLIPSON, L., FORD, M. R., KURAMOTO, T., DOVE, W. F. & AMOS-LANDGRAF, J. M. 2014. The utility of Apc-mutant rats in modeling human colon cancer. *Dis Model Mech*, 7, 1215-25.

IVANOV, D. B., PHILIPPOVA, M. P. & TKACHUK, V. A. 2001. Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry (Mosc)*, 66, 1174-86.

JASSAM, S. A., MAHERALLY, Z., SMITH, J. R., ASHKAN, K., RONCAROLI, F., FILLMORE, H. L. & PILKINGTON, G. J. 2017. CD15s/CD62E Interaction Mediates the Adhesion of Non-Small Cell Lung Cancer Cells on Brain Endothelial Cells: Implications for Cerebral Metastasis. *Int J Mol Sci*, 18.

JAYNE, D. 2007. Molecular biology of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res*, 134, 21-33.

JAYNE, D. G. 2003. The molecular biology of peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer. *Ann Acad Med Singapore*, 32, 219-25.

JEMAL, A., CLEGG, L. X., WARD, E., RIES, L. A., WU, X., JAMISON, P. M., WINGO, P. A., HOWE, H. L., ANDERSON, R. N. & EDWARDS, B. K. 2004. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer*, 101, 3-27.

KAWASHIMA, H. 2006. Roles of sulfated glycans in lymphocyte homing. *Biol Pharm Bull*, 29, 2343-9.

KIM, E. R. & CHANG, D. K. 2014. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J Gastroenterol*, 20, 9872-81.

KITAYAMA, J., TSUNO, N., SUNAMI, E., OSADA, T., MUTO, T. & NAGAWA, H. 2000. E-selectin can mediate the arrest type of adhesion of colon cancer cells under physiological shear flow. *Eur J Cancer*, 36, 121-7.

KÖHLER, S., ULLRICH, S., RICHTER, U. & SCHUMACHER, U. 2010. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *Br J Cancer*, 102, 602-9.

LAMBERT, A. W., PATTABIRAMAN, D. R. & WEINBERG, R. A. 2017. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168, 670-691.

LANGE, T., SAMATOV, T. R., TONEVITSKY, A. G. & SCHUMACHER, U. 2014. Importance of altered glycoprotein-bound N- and O-glycans for epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of cancer cells. *Carbohydr Res*, 389, 39-45.

LASCOMBE, I., CLAIROTTE, A., FAUCONNET, S., BERNARDINI, S., WALLERAND, H., KANTELIP, B. & BITTARD, H. 2006. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clin Cancer Res*, 12, 2780-7.

LAUDANNA, C., KIM, J. Y., CONSTANTIN, G. & BUTCHER, E. 2002. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev*, 186, 37-46.

- LEPPERT, D., WAUBANT, E., GALARDY, R., BUNNETT, N. W. & HAUSER, S. L. 1995. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol*, 154, 4379-89.
- LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M. I. & NOURSHARGH, S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7, 678-89.
- LIU, J. & JIANG, G. 2006. CD44 and hematologic malignancies. *Cell Mol Immunol*, 3, 359-65.
- LUO, B. H., CARMAN, C. V. & SPRINGER, T. A. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*, 25, 619-47.
- MARIOTTI, A., PEROTTI, A., SESSA, C. & RUEGG, C. 2007. N-cadherin as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 16, 451-65.
- MATSUMOTO, S., IMAEDA, Y., UMEMOTO, S., KOBAYASHI, K., SUZUKI, H. & OKAMOTO, T. 2002. Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumour cells. *Br J Cancer*, 86, 161-7.
- MIKAMI, T., YOSHIDA, T., NUMATA, Y., KIKUCHI, M., ARAKI, K., NAKADA, N. & OKAYASU, I. 2011. Invasive behavior of ulcerative colitis-associated carcinoma is related to reduced expression of CD44 extracellular domain: comparison with sporadic colon carcinoma. *Diagn Pathol*, 6, 30.
- MILES, F. L., PRUITT, F. L., VAN GOLEN, K. L. & COOPER, C. R. 2008. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 25, 305-24.

MIYAKE, H., HARA, I., OKAMOTO, I., GOHJI, K., YAMANAKA, K., ARAKAWA, S., SAYA, H. & KAMIDONO, S. 1998. Interaction between CD44 and hyaluronic acid regulates human prostate cancer development. *J Urol*, 160, 1562-6.

MUNRO, J. M. 1993. Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases. *Eur Heart J*, 14 Suppl K, 72-7.

NAGI, C., GUTTMAN, M., JAFFER, S., QIAO, R., KEREN, R., TRIANA, A., LI, M., GODBOLD, J., BLEIWEISS, I. J. & HAZAN, R. B. 2005. N-cadherin expression in breast cancer: correlation with an aggressive histologic variant--invasive micropapillary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 94, 225-35.

NAKAGOE, T., SAWAI, T., TSUJI, T., JIBIKI, M. A., NANASHIMA, A., YAMAGUCHI, H., YASUTAKE, T., AYABE, H., ARISAWA, K. & ISHIKAWA, H. 2002. Predictive factors for preoperative serum levels of sialyl Lewis(x), sialyl Lewis(a) and sialyl Tn antigens in gastric cancer patients. *Anticancer Res*, 22, 451-8.

NAPIER, S. L., HEALY, Z. R., SCHNAAR, R. L. & KONSTANTOPOULOS, K. 2007. Selectin ligand expression regulates the initial vascular interactions of colon carcinoma cells: the roles of CD44v and alternative sialofucosylated selectin ligands. *J Biol Chem*, 282, 3433-41.

OKAHARA, H., YAGITA, H., MIYAKE, K. & OKUMURA, K. 1994. Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res*, 54, 3233-6.

OLIVEIRA-FERRER, L., RÖSSLE, K., HAUSTEIN, V., SCHRÖDER, C., WICKLEIN, D., MALTSEVA, D., KHAUSTOVA, N., SAMATOV, T., TONEVITSKY, A., MAHNER, S., JÄNICKE, F., SCHUMACHER, U. & MILDE-LANGOSCH, K. 2014. c-FOS suppresses ovarian cancer progression by changing adhesion. *Br J Cancer*, 110, 753-63.

OXLEY, S. M. & SACKSTEIN, R. 2001. Detection of an L-selectin ligand on a hematopoietic progenitor cell line. *Blood*, 84, 3299-306.

PETRI, B. & BIXEL, M. G. 2006. Molecular events during leukocyte diapedesis. *Febs j*, 273, 4399-407.

POLLEY, M. J., PHILLIPS, M. L., WAYNER, E., NUDELMAN, E., SINGHAL, A. K., HAKOMORI, S. & PAULSON, J. C. 1991. CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 6224-8.

QI, J., CHEN, N., WANG, J. & SIU, C. H. 2005. Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. *Mol Biol Cell*, 16, 4386-97.

ROSIVATZ, E., BECKER, I., BAMBA, M., SCHOTT, C., DIEBOLD, J., MAYR, D., HOFER, H. & BECKER, K. F. 2004. Neoexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. *Int J Cancer*, 111, 711-9.

RUPPERT, M., AIGNER, S., HUBBE, M., YAGITA, H. & ALTEVOGT, P. 1995. The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. *J Cell Biol*, 131, 1881-91.

SACKSTEIN, R. 2004. The bone marrow is akin to skin: HCELL and the biology of hematopoietic stem cell homing. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 9, 215-23.

SAMATOV, T. R., GALATENKO, V. V., BLOCK, A., SHKURNIKOV, M. Y., TONEVITSKY, A. G. & SCHUMACHER, U. 2017. Novel biomarkers in cancer: The whole is greater than the sum of its parts. *Semin Cancer Biol*, 45, 50-57.

SASTRY, S. K. & HORWITZ, A. F. 1993. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 5, 819-831.

SCHWEITZER, K. M., DRAGER, A. M., VAN DER VALK, P., THIJSEN, S. F., ZEVENBERGEN, A., THEIJSMEIJER, A. P., VAN DER SCHOOT, C. E. & LANGENHUIJSEN, M. M. 1996. Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am J Pathol*, 148, 165-75.

SILLANPAA, S., ANTTILA, M. A., VOUTILAINEN, K., TAMMI, R. H., TAMMI, M. I., SAARIKOSKI, S. V. & KOSMA, V. M. 2003. CD44 expression indicates favorable prognosis in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 9, 5318-24.

SOEJIMA, M. & KODA, Y. 2005. Molecular mechanisms of Lewis antigen expression. *Leg Med (Tokyo)*, 7, 266-9.

STEIN, A., ATANACKOVIC, D. & BOKEMEYER, C. 2011. Current standards and new trends in the primary treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 47 Suppl 3, S312-4.

STRELL, C. & ENTSCHLADEN, F. 2008. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Commun Signal*, 6, 10.

STRELL, C., LANG, K., NIGGEMANN, B., ZAENKER, K. S. & ENTSCHLADEN, F. 2007. Surface molecules regulating rolling and adhesion to endothelium of neutrophil granulocytes and MDA-MB-468 breast carcinoma cells and their interaction. *Cell Mol Life Sci*, 64, 3306-16.

TAKEICHI, M. 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102, 639-55.

VALASTYAN, S. & WEINBERG, R. A. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147, 275-92.

VARKI, A. 1997. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J Clin Invest*, 99, 158-62.

VESTWEBER, D. 2007. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev*, 218, 178-96.

VESTWEBER, D. & BLANKS, J. E. 1999. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev*, 79, 181-213.

WANG, Q. Y., WU, S. L., CHEN, J. H., LIU, F. & CHEN, H. L. 2003. Expressions of Lewis antigens in human non-small cell pulmonary cancer and primary liver cancer with different pathological conditions. *J Exp Clin Cancer Res*, 22, 431-40.

WATSON, A. J. & COLLINS, P. D. 2011. Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis*, 29, 222-8.

WHO 2014. World Cancer Report 2014. *International Agency for Research on Cancer*, ISBN 978-92-832-0432-9.

WICKLEIN, D., SCHMIDT, A., LABITZKY, V., ULLRICH, S., VALENT, P. & SCHUMACHER, U. 2013. E- and p-selectins are essential for repopulation of chronic myelogenous and chronic eosinophilic leukemias in a scid mouse xenograft model. *PLoS One*, 8, e70139.

YIN, H. L., WU, C. C., LIN, C. H., CHAI, C. Y., HOU, M. F., CHANG, S. J., TSAI, H. P., HUNG, W. C., PAN, M. R. & LUO, C. W. 2016. beta1 Integrin as a Prognostic and Predictive Marker in Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci*, 17.

YU, L. G. 2007. The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression. *Glycoconj J*, 24, 411-20.

8. Danksagung

Hiermit danke ich Herrn Professor Dr. U. Schumacher für die Überlassung des Themas und die Erlaubnis, die Einrichtungen des Institutes zu nutzen, sowie für seine Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit. Vielen Dank für die fachliche Hilfestellung und für die anregenden Gespräche, welche die Zeit im Labor stets erheiterten.

Meinen Eltern Ralf und Margitta Nahrstedt danke ich für die Unterstützung in jeglicher Lebenssituation. Ihr seid die Besten!

Vielen Dank an meine Freundin Larissa Hörmann, die mit ihrer Unterstützung und Geduld es stets vermochte meine Motivation zu steigern.

Herrn Martin Blohm danke ich für die gegenseitige Hilfe und das humorvolle Zusammensein bei der Laborarbeit.

Vielen Dank an Frau Ursula Makowski für ihre freundliche und zuvorkommende Art.

Für die ausgezeichnete technische Unterstützung, die Hilfestellung bei der Durchführung von Laborarbeiten und die Einführung in die immunhistochemischen Techniken danke ich Frau Kristine Knies, Frau Susanne Feldhaus, Frau Renate Gehrcke, Herrn Tobias Gosau und Frau Jennifer Schröder.

Vielen Dank an Herrn PD Dr. Angele für die Bereitstellung der Gewebeproben.

Vielen lieben Dank an das Team der Anatomie II des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Auch bei langwierigen Laborarbeiten herrschte stets gute Laune und ich hatte jederzeit das Gefühl herzlich willkommen zu sein!

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Sven Nahrstedt

Geburtsdatum/-ort: 28.01.1990 in Osterburg (Altmark)

Eltern: Ralf Nahrstedt
Margitta Nahrstedt

Schulbildung

1996 - 2000 Grundschule Spänigen

2000 - 2002 Sekundarschule Bismark

2002 - 2008 Markgraf-Albrecht Gymnasium Osterburg

Berufliche Laufbahn/Studium

ab Juli 2008 Laufbahn zum Offizier des Sanitätsdienstes bei der Bundeswehr

ab Okt. 2008 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

seit WS 2012 Promotion im Institut für Anatomie II des Universitätsklinikums
Hamburg-Eppendorf

Okt. 2014 erfolgreicher Abschluss des Studiums der Humanmedizin

seit Okt. 2014 Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg

Nov. 2018 voraussichtlicher Abschluss des Studiums der Zahnmedizin

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: