

Expression von Zelladhäsionsmolekülen der initialen peritonealen Metastasierung des Pankreaskarzinoms

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dilara Kisir

aus

Hamburg

2026

Betreuer / Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Daniel Wicklein

Gutachterin der Dissertation: Prof. Dr. Linda Diehl

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Linda Diehl

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Aymelt Itzen

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher

Datum der mündlichen Prüfung: 08.07.2026

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung.....	6
2	Einleitung.....	7
2.1	Pankreaskarzinom	7
2.1.1	Anatomie des Pankreas	7
2.1.2	Epidemiologie	7
2.1.3	Symptome und Risikofaktoren	8
2.1.4	Therapie und Prognose.....	9
2.1.5	Histologie.....	10
2.1.6	Entstehung des Pankreaskarzinoms.....	10
2.1.7	Metastasierungsverhalten	12
2.2	Das Peritoneum und die Peritonealkarzinose.....	13
2.3	Metastasierungskaskade	14
2.3.1	Invasion und Intravasation	16
2.3.2	Hämatogene Metastasierung	17
2.3.3	Extravasation.....	19
2.3.4	Ausbildung von Metastasen am Zielorgan	21
2.4	Zelladhäsionsmoleküle	22
2.4.1	Integrine	22
2.4.2	Immunglobulin-Superfamilie (IgSF).....	27
2.4.3	CD44	30
2.4.4	Cadherine	30
3	Material und Methoden	33
3.1	Verwendete Zelllinie und Eigenschaften	33
3.2	Geräte	33
3.3	Verbrauchsmaterialien	34
3.4	Antikörper.....	35
3.4.1	Primärantikörper.....	35
3.4.2	Primärantikörper Isotypkontrolle.....	36
3.4.3	Sekundärantikörper	36
3.5	Lösungen, Enzyme, Färbemittel, Chemikalien	37
3.6	ALU-PCR Chemikalien	39
3.7	Software	39
3.8	Tierversuch	39
3.9	Peritonealkarzinoseindex (PCI)	40
3.10	Einbettung der Gewebe in Paraffin	41
3.11	Anfertigung von Paraffinschnitten	41
3.12	Entparaffinierung und Dehydrierung	42
3.13	Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	43
3.14	Immunhistochemie	43

3.15	Immunhistochemische Färbungen der humanen Tumorzellen	45
3.15.1	CD44.....	45
3.15.2	E-Cadherin.....	45
3.15.3	N-Cadherin	45
3.15.4	Integrin α V	46
3.15.5	Integrin β 6.....	46
3.15.6	Integrin β 1.....	47
3.15.7	Integrin β 4.....	47
3.15.8	Integrin β 3.....	48
3.15.9	CEACAM7	48
3.15.10	L1CAM.....	48
3.15.11	EpCAM (CD326).....	49
3.15.12	HSP60	49
3.15.13	Vimentin.....	50
3.15.14	ICAM-1 (CD54).....	50
3.15.15	Mesothelin	50
3.16	Mikroskopische Detektion von Tumorzellen	51
3.17	Messung der TumorgroÙe	51
3.18	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	52
3.19	Statistik	53
3.20	Molekularbiologische Methoden	53
3.20.1	Extraktion genomischer DNA.....	53
3.20.2	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	54
3.20.3	ALU-PCR	54
4	Ergebnisse.....	57
4.1	Peritoneal Carcinomatosis Index für den Tierversuch der Mauslinie Pfp/Rag2.....	57
4.2	Mikroskopische Detektierbarkeit der peritonealen Karzinose	58
4.3	Tumorfläche der peritonealen Tumorzellverbände	59
4.4	Immunhistochemische Färbung der peritonealen Tumorzellen	62
4.4.1	Integrine	62
4.4.2	Immunglobulin Superfamilie (IgSF).....	72
4.4.3	Cadherine und Vimentin.....	80
4.4.4	CD44	85
4.5	Immunhistochemische Färbungen mesothelialer Zellen des Peritoneums 87	
4.5.1	Mesothelin	87
4.6	Immunhistochemische Färbung der Zellen in Agar	89
4.7	Auswertung ALU-PCR	91
4.7.1	ALU-PCR Blut	91
4.7.2	Alu-PCR Leber	92
4.7.3	Alu-PCR Lunge	94
4.7.4	Alu-PCR Knochenmark	95
5	Diskussion	97

5.1	Fortschreiten der Peritonealkarzinose und Ausmaß der Fernmetastasierung in weitere Organe	98
5.2	Expression von Zelladhäsionsmolekülen mit dem zeitlichen Fortschreiten der initialen Peritonealkarzinose des Pankreaskarzinoms	104
5.2.1	Mesothelin	104
5.2.2	Integrine	107
5.2.3	IgSF	112
5.2.4	CD44	116
5.2.5	Cadherine und Vimentin	119
6	Zusammenfassung	121
7	Abstract.....	122
	Literaturverzeichnis	123
	Abkürzungsverzeichnis	137
	Abbildungsverzeichnis	139
	Tabellenverzeichnis	141
	Anhang	144
	Erklärung des Eigenanteils	157
	Eidesstattliche Versicherung	158
	Danksagung	159

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Pankreaskarzinom ist eine Krebserkrankung mit einer besonders schlechten Prognose (Ronckers et al., 2023) - Mortalitäts- und Inzidenzrate sind fast identisch (Ferlay et al., 2015). Allerdings ist in über 90% der Fälle nicht das Karzinom selbst, sondern die Metastasierung die primäre Todesursache (Reymond et al., 2013). Insbesondere für das Pankreaskarzinom wird angenommen, dass der Tumor schon früh in der Krebsentstehung die Fähigkeit zur Ausbildung von Metastasen erlangt. Leider ist wenig über die genauen molekularbiologischen Vorgänge bekannt, die diese initiale Ausbildung von Metastasen fördern. Damit dem therapeutisch entgegengewirkt werden kann, ist ein besseres Verständnis dieser Mechanismen erforderlich. Tumorzellen exprimieren bei der Adhäsion und Extravasation am Zielgewebe ähnliche und/oder die gleichen Adhäsionsmoleküle, welche bereits für die Leukozytenadhäsionskaskade beschrieben sind. In dieser Arbeit sollte daher genauer die Rolle folgender Adhäsionsmoleküle bei der initialen Peritonealkarzinose des Pankreaskarzinoms untersucht werden: CD44, CEACAM7, E-Cadherin, EpCam, ICAM, Integrine (Integrin β 6, Integrin β 1, Integrin β 3, Integrin β 4, Integrin α V), L1-Cam und N-Cadherin Dazu sollte immunhistochemisch deren Expression mit dem zeitlichen Fortschreiten in der Anfangsphase der Metastasierung untersucht werden. Zusätzlich sollte das Ausmaß der weiteren Fernmetastasierung in die Lunge, Leber, Knochenmark und in das Blut detektiert werden und im konkreten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Wie verändert sich die Expression dieser Zelladhäsionsmoleküle mit dem zeitlichen Fortschreiten der initialen Peritonealkarzinose des Pankreaskarzinoms?
- Welcher Zusammenhang besteht zwischen dem Fortschreiten der Peritonealkarzinose und dem Ausmaß der Fernmetastasierung in weitere Organe?

2 Einleitung

2.1 Pankreaskarzinom

2.1.1 Anatomie des Pankreas

Das Pankreas kommt aufgrund der Magendrehung während der Embryonalentwicklung sekundär retroperitoneal hinter der Bursa omentalis zu liegen und ist damit auf der vorderen Oberfläche von Peritoneum bedeckt. Morphologisch kann man das Pankreas in drei Regionen unterteilen. Den Caput, Corpus und Cauda pancreatis. Dorsal steht das Pankreas in enger Lagebeziehung zur Aorta, den Nierengefäßen, den oberen Mesenterialgefäßen, der linken Nebenniere und zur linken Niere. Das Organ selbst liegt zwischen der Milz und dem Duodenum mit enger Lagebeziehung des Pankreaskopfes zum Duodenum (Talathi et al., 2022, Kulenović and Sarac-Hadzihalilović, 2010, Pansky, 1990). Die Blutversorgung des Pankreas erfolgt über Äste der Arteria splenica, der Arteria mesenterica superior und der Arteria hepatica communis. Der Venöse Abfluss erfolgt über die Vena splenica und mesenterica superior, die in die Vena portae münden (Kulenović and Sarac-Hadzihalilović, 2010).

Der lymphatische Abfluss des Pankreas erfolgt in der Regel in die nächst gelegenen Nodi Lymphatici, die meist entlang der arteriellen Gefäße verlaufen (Pansky, 1990). Diese besonderen Lagebeziehungen des Pankreas sind sowohl für die Diagnostik und die Behandlung des Pankreaskarzinoms als auch für seine Ausbreitung von Bedeutung (Talathi et al., 2022, Kulenović and Sarac-Hadzihalilović, 2010, Pansky, 1990).

2.1.2 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom stellt weltweit die 12. häufigste Tumorerkrankung und die 7. häufigste Ursache für krebsbedingte Tode dar.

Der weltweit altersstandardisierte Wert für die Inzidenz des Pankreaskarzinoms liegt bei 5,5 Fällen pro 100.000 Einwohner bei Männern und für Frauen bei 4,0 pro 100.000 Einwohnern (Bray et al., 2024). Insbesondere ab dem 75. Lebensjahr scheint dieser Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern weiter zuzunehmen (Luo et al., 2023). Das mediane Alter bei der Diagnosestellung liegt bei Männern bei 72 und bei Frauen bei 69 Jahren (National-Cancer-Institute, 2023). Im weltweiten Vergleich weisen die Industrienationen höhere Inzidenzen für das Pankreaskarzinom auf (Ferlay

et al., 2015, WorldHealthOrganization., 2020). Im Vergleich des globalen Durchschnitts zeigen die westeuropäischen und nordamerikanischen Regionen die höchste Inzidenz und südliche Regionen Zentralasiens die niedrigste Inzidenz (Luo et al., 2023).

2.1.3 Symptome und Risikofaktoren

Das Pankreaskarzinom wird häufig erst dann diagnostiziert, wenn sich der Tumor bereits in einem lokal fortgeschrittenen Stadium befindet und nicht mehr kurativ behandelbar ist. Einer der Gründe hierfür ist das Fehlen von Symptomen im Initialstadium des Pankreaskarzinoms (Pekarek et al., 2021).

Patienten stellen sich in der Klinik häufig mit unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust oder abdominellen Schmerzen vor (Porta et al., 2005). Schmerzen sind dabei mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Insbesondere Rückenschmerzen sprechen für einen lokal fortgeschrittenen Befund mit schlechter Prognose (Kelsen et al., 1997).

Cholestatische Symptome sind vergleichsweise häufig und kommen vor allem dann vor, wenn der Tumor im Bereich des Caput Pancreaticus lokalisiert ist. Zu den Symptomen einer Cholestase zählen beispielsweise der Ikterus, die Hypocholie sowie der Juckreiz. Insbesondere beim Vorliegen eines schmerzlosen Ikterus in Kombination mit einer prall-elastisch tastbaren Gallenblase, dem so genannten Courvoisier-Zeichens, sollte immer an ein Pankreaskarzinom gedacht werden. Weitere, allerdings seltener vorkommende Symptome des Pankreaskarzinoms sind beispielsweise die Diarrhoe, Übelkeit und/oder Erbrechen (Porta et al., 2005). Auch die neue Manifestation eines Diabetes Mellitus (Pannala et al., 2008, Pelaez-Luna et al., 2007), Thrombophlebitis migrans (Trousseau-Syndrom), Zeichen und Symptome einer chronischen Pankreatitis (Wolfgang et al., 2013), Hepatomegalie, Splenomegalie und Aszites können symptomatische Manifestationsformen des Pankreaskarzinoms sein (Porta et al., 2005).

Klinische Screeningmethoden, die auf das Vorliegen eines Pankreaskarzinoms hinweisen könnten, sind nicht ausreichend sensitiv und effektiv. (Rossi et al., 2014, Pekarek et al., 2021).

Bestimmte Faktoren erhöhen das Risiko in der Allgemeinbevölkerung an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. Zu den modifizierbaren Risikofaktoren gehören dabei das Rauchen, Übergewicht, übermäßiger Alkoholkonsum, Insulinresistenz (Diabetes Mellitus Typ I und II), der Lebensstil und Ernährungsfaktoren. Zu den nicht

modifizierbaren Risikofaktoren zählen ein zunehmendes Alter mit dem höchsten Risiko ab einem Alter über 65 Jahren, das Geschlecht (männliche Geschlecht insbesondere ab einem Alter über 75), Zustände einer chronischen Pankreatitis oder inflammatorische Zustände des Pankreas und bestimmte Veränderung des Mikrobioms im gastrointestinalen Trakt sind ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms assoziiert. Zuletzt beeinflusst auch die Genetik das Risiko. Personen mit einer familiären Vorgeschichte des Pankreaskarzinoms insbesondere bei Verwandten ersten Grades, haben ein bis zu 7-fach erhöhtes Risiko, selbst am Pankreaskarzinom zu erkranken (Luo et al., 2023).

2.1.4 Therapie und Prognose

Die Prognose des Pankreaskarzinoms hat eine der geringsten Überlebensraten unter allen Krebsarten. Die 5-Jahres-Überlebensrate lag für die zwischen den Jahren 2012 bis 2018 diagnostizierten Pankreaskarzinome in den USA bei 12%. (Siegel et al., 2023). Es zeigt sich ein Trend mit einer leichten Zunahme der Überlebensrate im Vergleich zu den Vorjahren. So stieg die 5-Jahres-Überlebensrate von 6% für das Jahr 2014 auf 9% für das Jahr 2018 (Rawla et al., 2019). 2020 lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei 10% im Vergleich zu 5,26% im Jahre 2000 (Park et al., 2021).

Der wichtigste Prognoseparameter und entscheidende Faktor, der das weitere Vorgehen bestimmt, ist das UICC Stadium (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2023). Die einzige potenziell kurative Therapieoption ist die komplette chirurgische Resektion (Geer and Brennan, 1993).

Liegt ein resektabler Befund vor (UICC Stadium I und II und teilweise auch im UICC Stadium III), ist die Kombination mit einer adjuvanten Chemotherapie Standard. In den Leitlinien wird hier die adjuvante Chemotherapie mit mFOLFIRINOX bei gutem Allgemeinzustand der Patienten empfohlen (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2023).

Allerdings kommen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nur weniger als 20% der Patienten für eine kurative Resektion in Frage (Smeenk et al., 2005) und auch Patienten, die eine kurative Resektion durchlaufen, sterben im Verlauf fast immer aufgrund der Ausbildung von Metastasen (Hishinuma et al., 2006).

Dies liegt daran, dass zum Zeitpunkt der OP oft bereits Mikrometastasen und ein lokal invasiver Befund vorliegen. Das mediane Überleben nach kurativer Resektion liegt zwischen 17 und 27 Monaten und die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 20% (Wolfgang et al., 2013). Im Falle einer Metastasierung liegt ein UICC-Stadium IV vor und es wird

in der Regel eine palliative Therapie durchgeführt. Das Mediane Überleben bei einem lokal fortgeschrittenen Befund variiert je nach Studie zwischen 8 und 12 Monaten. (Wolfgang et al., 2013).

2.1.5 Histologie

Das Pankreasorgan setzt sich aus einem exokrinen und einem endokrinen Anteil zusammen. Der exokrine Anteil macht 80% der Organmasse aus und besteht aus azinären, zentroazinäre und duktalem Zellen. Die von den Azini produzierten inaktiven Zymogene werden entlang des duktalem Lumens zum Duodenum transportiert, wo sie eine wichtige Rolle für bei der Verdauung spielen. Die endokrinen Zellen sind in Clustern angeordnet und bilden die Langerhans-Inseln. Ihre produzierten Hormone sind beteiligt an der Regulation des Blut Glukosespiegels und werden direkt in das Blut abgegeben (Hezel et al., 2006).

Histologisch werden Pankreastumore in epitheliale und nicht epitheliale Tumore eingeteilt (Schawkat et al., 2020). Die epithelialen Neoplasien des Pankreas machen insgesamt über 98% der Pankreasneoplasien aus und das duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) stellt wiederum den größten Anteil dieser exokrinen, epithelialen Tumore. Der Pankreaskopf ist der häufigste Ort der Tumorlokalisation (Sahora et al., 2009, Gallmeier and Gress, 2018).

Die genauen Ursprungszellen des duktalem Adenokarzinoms des Pankreas sind unbekannt. Die momentane Studienlage weist darauf hin, dass sowohl die zentroazinären als auch die duktalem Epithelzellen den Ursprung des Karzinoms ausmachen können (Storz and Crawford, 2020, Esposito et al., 2014). Makroskopisch erscheint das duktalem Adenokarzinom des Pankreas im Resektat als derbe, unscharf begrenzte Tumormasse mit einer grauen bis weißliche Farbe. Kleinere Zysten können manchmal vorgefunden werden, größere Zysten und Nekrosen sind nicht vorhanden (Chen and Baithun, 1985, Schlitter et al., 2021).

2.1.6 Entstehung des Pankreaskarzinoms

Damit aus einer Zelle eine neoplastische Zelle wird und sich damit ein Pankreaskarzinom entwickelt, müssen verschiedene Mutationen in den Zellen akkumulieren. Die Zellen, die diese schädlichen Mutationen ansammeln, aber selbst noch keine neoplastischen Zellen mit invasivem Potential sind, werden als Vorläuferläsionen bezeichnet (Yachida et al., 2010)

Zu den drei häufigsten Vorläuferläsionen, aus denen sich das duktale Adenokarzinom des Pankreas entwickeln kann, gehört die pankreatisch intraepitheliale Neoplasie (PanIN), muzinöse Zyst Neoplasie (MCN) und die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) (Esposito et al. 2014).

Bei einer PanIN sind Zellen des Ductus pancreaticus dysplastisch verändert. Die Einteilung des PanIN erfolgt in 3 Grade. Je höher der Grad, desto schlechter ist die Differenzierung (Distler et al., 2014)

Die Telomerlänge ist bei fast allen pankreatisch intraepithelialen Neoplasien (PanIN) im Vergleich zu den physiologischen Epithelzellen des Ductus pancreaticus verkürzt. Telomere sind wichtig für die Stabilität der Chromosomen. Deren Verkürzung erleichtert wahrscheinlich den Erwerb von weiteren chromosomalen Anomalien (van Heek et al., 2002). Weitere darauf folgende Veränderungen sind zum Beispiel aktivierende Mutationen im Onkogen KRAS2, die in der Regel schon bei gut differenzierten (Grad 1) Läsionen vorkommen (Maitra et al., 2005). In 90-95% der Fälle ist diese Mutation beim Pankreaskarzinom vorhanden (Maitra and Hruban, 2008). Mit zunehmendem Differenzierungsgrad (PanIN-2) kommen inaktivierende Mutationen von p16 (CDKN2A) hinzu und bei Zellen mit einer hochgradigen Dysplasie (PanIN-3) findet man für gewöhnlich zusätzlich inaktivierende Mutationen in den SMAD4 (DPC4), TP53 und BRCA 2 Genen vor (Maitra et al., 2005).

Durch Akkumulation dieser als „Gründer Mutation“ bezeichneten Veränderung entwickelt sich aus den Vorläuferläsionen eine maligne Zelle, die den parentalen Klon darstellt. Diese präsentiert die initiale Population an Zellen, welche das infiltrierende Pankreaskarzinom ausbilden. Die Klone, aus denen sich dann die Metastasen entwickeln, unterscheiden sich vom parentalen Klon dadurch, dass diese weitere, so genannte Progressormutationen akkumulieren. Welche genauen Mutationen dies sind, ist jedoch nicht bekannt. Diese Zellen werden als Subklone bezeichnet und entstehen aus dem parentalen Klon. Progressormutationen sind im Gegensatz zu den Gründermutationen nur in einem bestimmten Anteil der Krebszellen präsent. Subklone expandieren und proliferieren unabhängig voneinander. Sie erlangen schließlich das Potential zu metastasieren und können dann Metastasen in entfernten Organen ausbilden. Das Potential zur Metastasierung unterscheidet sich zwischen den Subklonen (Yachida and Iacobuzio-Donahue, 2013).

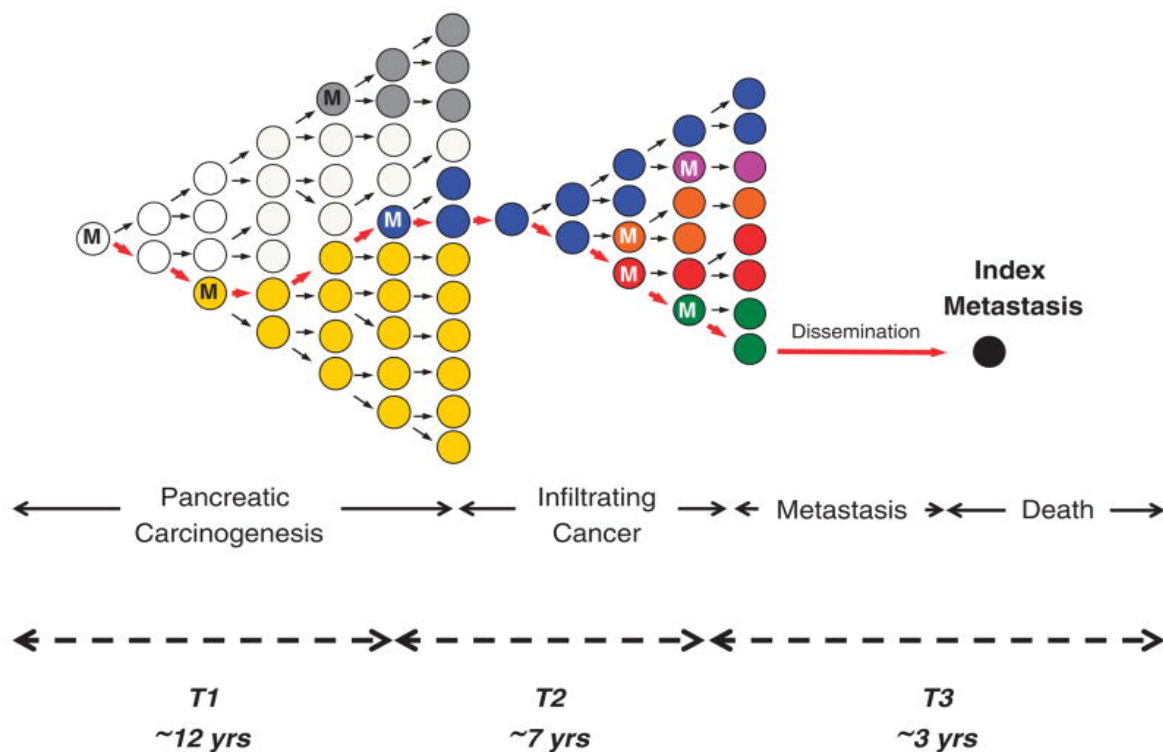


Abbildung 1: Exemplarisches Modell zu den Etappen bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms nach (Yachida and Iacobuzio-Donahue, 2013). Durch die Akkumulation verschiedener Mutationen (M) entstehen genetisch heterogene Subklone, die im Verlauf die Fähigkeit zur Metastasierung erlangen und eine Indexmetastase ausbilden.

2.1.7 Metastasierungsverhalten

Zum Zeitpunkt der Diagnose liegen beim Pankreaskarzinom bei der Mehrheit der Patienten bereits Metastasen vor (Park et al., 2021).

Bei Patienten, die zum Zeitpunkt der operativen Resektion noch keine Metastasen hatten, trat ein Jahr nach der Resektion in ungefähr 50% der Fälle und nach 2 Jahren in fast 80% der Fälle ein Tumorrezidiv auf. Der Ort, an dem der Tumor am häufigsten zuerst rezidierte, war die Leber. In 76% der Fälle ereigneten sich Rezidive in Form von Fernmetastasen (Groot et al., 2018). Lebermetastasen manifestieren sich am häufigsten nach 5-11 Monaten. Dies deutet darauf hin, dass zum Zeitpunkt der Operation bereits Mikrometastasen in der Leber vorliegen müssen. Ein lokales Rezidiv tritt ungefähr 13 Monate nach einer Resektion auf. Dies ist auch dem aggressiven Phänotyp des Pankreaskarzinoms geschuldet. So kommen häufig perineurale, lymphatische und vaskuläre Invasionen vor. Auch retroperitoneale Residuen sind keine Seltenheit (Alexakis et al., 2004).

Eine Metaanalyse von Tanaka et al. ergab, dass ein initiales Rezidiv nach primärer Resektion bei 20,8% lokoregional, bei 11,4% in der Lunge, bei 13,5% peritoneal und bei 26,5% in der Leber auftraten (Tanaka et al., 2019).

2.2 Das Peritoneum und die Peritonealkarzinose

Das Peritoneum ist die größte seröse Membran im Körper. Die Oberfläche des Peritoneums wird von einer Schicht abgeflachter mesothelialer Zellen ausgekleidet (Healy and Reznik, 1998). Unter dem Mesothel befindet sich eine Schicht submesothelialen Bindegewebes, welches die Extrazelluläre Matrix (ECM) enthält, gefolgt von einer Fettgewebsschicht (Ceelen and Levine, 2015). Das Mesothel bedeckt die Peritoneal-, Pleura- und Perikardhöhlen. Es ist wichtig für die Aufrechterhaltung der normalen serösen Integrität und Funktion. Das Mesothel befindet sich auf einer dünnen Basalmembran und besteht aus einer einzelnen Zellschicht. Die subseröse Schicht besteht aus Bindegewebe und enthält Blutgefäße, Lymphgefäße, Fibroblasten-ähnliche Zellen und ortsständige entzündliche Zellen (Herrick and Mutsaers, 2004).

Mesotheliale Zellen entstehen während der Embryogenese aus dem Mesoderm und besitzen Merkmale sowohl epithelialer als auch mesenchymaler Zellen. Klassischerweise haben mesotheliale Zellen eine epitheloide Morphologie. Durch die Einwirkung bestimmter Wachstumsfaktoren sind sie jedoch dazu in der Lage, in ein fibroblastischen Phänotyp überzugehen. Hierbei wird die Expression von Cytokeratin reduziert und die von Vimentin erhöht wird (Herrick and Mutsaers, 2004).

In der Bauchhöhle werden die Bauchorgane vom so genannten viszerale Peritoneum umhüllt und das parietale Peritoneum kleidet die Bauchwand aus. An den Umschlagstellen des Peritoneums in der Bauchhöhle bilden sich Peritonealreflexionen beziehungsweise Peritonealduplikaturen aus, die die Mesenterien und Omenta bilden. Metastatische Erkrankungen sind der häufigste bösartige Prozess, der das Peritoneum betrifft. Neben dem Pankreaskarzinom sind Tumore, die häufige peritoneale Metastasen ausbilden das Magen-, Kolon- und Ovarialkarzinom (Healy and Reznik, 1998). Patienten mit peritonealen Metastasen zeigen eine deutlich reduzierte Gesamtüberlebensrate auf (Coccolini et al., 2013).

Damit sich der Primärtumor im Peritoneum ausbreiten kann, müssen sich zunächst Tumorzellen oder Zellcluster aus der primären Tumormasse lösen und zur Bauchhöhle gelangen. Danach müssen sie an das Bauchfell adhären (Kusamura et al., 2010). Das Anheften von Tumorzellen an das Mesothel erfolgt durch Adhäsionsmoleküle, die sich auf der Oberfläche der Mesothelzellen befinden und durch auf der submesothelialen Schicht befindliche Integrine. Es konnte auch gezeigt werden, dass der Hyaluronrezeptor CD44 wichtig für die Adhäsion von Tumorzellen an die

hyalurongebundene perizelluläre Hülle von Mesothelzellen ist (Mutsaers, 2002).

Tumorzellen können auch durch ihre Adhäsionsmoleküle an Komponenten der ECM binden (Ceelen and Levine, 2015)

Auf der Oberfläche von Mesothelzellen befindet sich auch das Differenzierungsantigen Mesothelin. Mesothelin wird ebenfalls von mehreren verschiedenen Krebsarten, einschließlich des Pankreaskarzinoms, exprimiert. Es ist jedoch nicht bekannt, welche biologische Funktion Mesothelin erfüllt (Hassan and Ho, 2008).

2.3 Metastasierungskaskade

Die Metastasierung ist ein bis heute nicht vollständig verstandener Aspekt der Krebsbiologie (Samatov et al., 2017). Der Prozess der Metastasierung setzt sich aus einer mehrstufigen Kaskade zusammen, die notwendig ist, damit Tumorzellen Metastasen in entfernten Organen ausbilden können (Chambers et al., 2001, Fidler, 2003, Valastyan and Weinberg, 2011).

Die Metastasierungskaskade kann dabei in folgende Schritte unterteilt werden: die Invasion und Intravasation, die am Ort des Primärtumors stattfinden. Danach erfolgt die systemische Translokation, bei der ein initiales Überleben der Tumorzellen in der Zirkulation erforderlich ist, ein Arrest und die Extravasation der Zellen. Anschließend können die Zellen in der neuen Umgebung Metastasen ausbilden (Valastyan and Weinberg, 2011). Diese Schritte sind in der folgenden Abbildung 2 schematisch dargestellt.

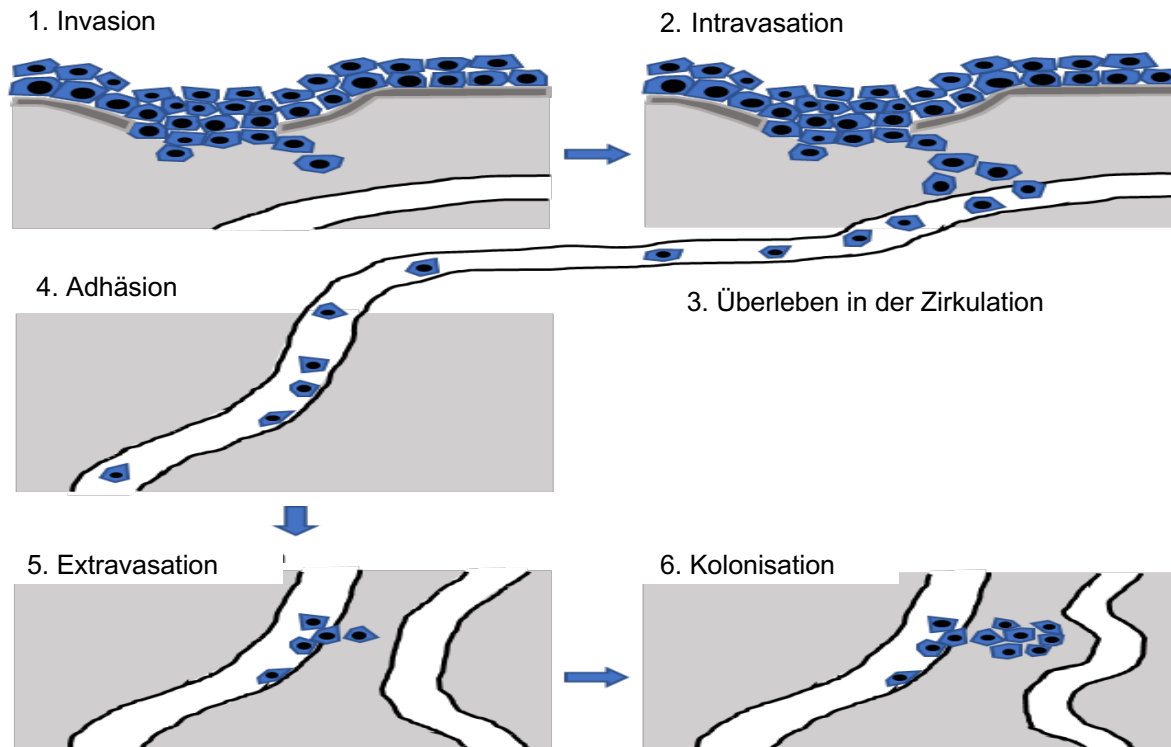


Abbildung 2: Abfolge der Schritte der Metastasierungskaskade nach Faryammanesh et al., 2014. Tumorzellen sind in Blau dargestellt. 1. Lokale Invasion, 2. Intravasation, 3. Überleben in der Zirkulation, 4. Arrest an entfernten Organstellen (Adhäsion) 5. Extravasation, 6. Initiales Überleben in einer fremden Mikroumgebung und Metastasenkolonisation(Faryammanesh et al., 2014)

Das Versagen bei einem dieser Schritte der Metastasierungskaskade bewirkt, dass die Metastasierung scheitert (Fidler, 2003). Die primäre Tumorformation ist noch nicht in der Lage, eine Invasion auszubilden und gilt daher noch als gutartig. Nur wenn die Tumorzellen durch verschiedene Mutationen invasive Eigenschaften erlangen, werden sie als bösartig eingestuft (Vogelstein and Kinzler, 2015). Dieser Prozess der primären Tumorformation für das Pankreaskarzinom wurde in Abschnitt 2.1.6 genauer beschrieben.

Die Zellpopulationen der Subklone innerhalb des Primärtumors sind genotypisch und phänotypisch divers mit verschiedenen biologischen Charakteristiken und unterschiedlichem Potential, Metastasen auszubilden. Man spricht von einer biologischen Heterogenität der Tumorzellen. Metastasen können ausgehend von einem Subklon einen klonalen Ursprung annehmen, aber auch von verschiedenen Subklon-Populationen ausgehen. Die biologische Heterogenität findet man nicht nur bei Tumorzellen des Primärkarzinoms, sondern auch bei den Metastasen wieder.

Eine genetische Heterogenität der Metastasen kommt sowohl intraläsional (in einer Metastase selbst) als auch interläsional (zwischen Metastasen an unterschiedlichen Stellen) vor (Fidler, 2003). Die genauen genetischen Veränderungen, die eine Zelle

durchlaufen muss, um Metastasen zu ausbilden können, sind nicht bekannt (Vogelstein and Kinzler, 2015). Ab welchem Zeitpunkt die Tumorzellen die Fähigkeit haben, Metastasen auszubilden und in das Blut zu migrieren, ist nicht eindeutig geklärt. Es gibt eine Reihe von Modellen, die hierzu unterschiedliche Sichtweisen verfolgen (Valastyan and Weinberg, 2011). Das linearen und parallelen Progressionsmodells sind hier zwei der gängigsten Modelle. Bei dem Modell der linearen Progression akkumulieren Subklone im Krankheitsverlauf schrittweise genetische und epigenetische Veränderungen bis sie zu einer Zelle mutieren, die die Fähigkeit besitzt, Metastasen auszubilden. Erst danach erfolgt die Migration der Zellen in den Blutkreislauf. Die Ausbildung weiterer Metastasen erfolgt dann durch die Ausbreitung weiterer Tumorzellen vom Ort der initialen Metastase aus. Nach dem parallelen Progressionsmodell dagegen haben Tumorzellen bereits im frühesten Stadium der Krebsentstehung, noch vor Ausbildung eines vollständig malignen Phänotyps, die Fähigkeit den Primärtumor zu verlassen. Erst am Ort des metastatischen Organs durchlaufen die Tumorzellen dann weitere somatische Mutationen, die es ihnen ermöglichen, Metastasen auszubilden. Daher werden nach diesem Modell genetische und epigenetische Veränderungen stärker von standortspezifischen Eigenschaften am Ort der Metastasierung beeinflusst.

Zudem korreliert hiernach im Gegensatz zum Modell der linearen Tumorprogression die Ausbildung von disseminierten Tumorzellen nicht mit dem Fortschritt und damit mit der Größe des Primärtumors, da bereits am Anfang der Krebsentstehung die Disseminierung von Tumorzellen erfolgt. Ein weiterer Unterschied zum linearen Progressionsmodell ist, dass sich mehrere Metastasen parallel zum Primärtumor entwickeln können, da mehrere Tumorzellen gleichzeitig in verschiedene Organe disseminieren und hier Metastasen ausbilden können (Klein, 2009).

2.3.1 Invasion und Intravasation

Epithelzellen sind dadurch charakterisiert, dass sie eine Zellschicht ausbilden, die durch Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Matrix- Adhäsionsmolekülen fest mit der Umgebung verbunden sind. Für die Invasion müssen sich Tumorzellen von diesem Zellverband zu lösen. Dies geschieht im Rahmen der so genannten Epithelial - Mesenchymalen Transition (EMT) (Thiery and Sleeman, 2006, Valastyan and Weinberg, 2011).

Die EMT beschreibt eine Reihe von Ereignissen, die dazu führen, dass die Expression von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen herunterreguliert wird und die

Zellen so ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und die Expression von Molekülen hoch reguliert wird, die mit einem mesenchymalen Phänotyp assoziiert sind (Valastyan and Weinberg, 2011). Zum Beispiel wird die Expression vom epithelialen Protein E-Cadherin herunterreguliert. Gleichzeitig wird die Expression von mesenchymalen Proteinen wie N-Cadherin oder Vimentin gesteigert (Thiery and Sleeman, 2006, Christofori, 2006). Die Expression dieser drei aufgezählten Moleküle wird auch in der vorliegenden Arbeit untersucht. Es kommt durch die EMT zur Veränderung der adhäsiven Eigenschaften und gesteigerten Beweglichkeit der Zellen sowie zur Freisetzung von Proteasen, was die Invasion der Tumorzellen fördert (Thiery and Sleeman, 2006, Valastyan and Weinberg, 2011).

Die Invasion ist gekennzeichnet durch eine Umgestaltung und Abbau der Basalmembran. Die Basalmembran ist eine spezialisierte extrazelluläre Matrix, die die epithelialen Zellverbände vom Gewebestroma trennt. Solange sie intakt ist, ist das Tumorwachstum lokal begrenzt. Eine Unterbrechung der Basalmembran kennzeichnet die Invasion von Tumorzellen in das Stroma.

In einem durch Integrine und Zelladhäsionsmolekülen vermittelten Prozess binden Tumorzellen an die Basalmembran und destruieren diese durch Freisetzung von Proteasen (Valastyan and Weinberg, 2011). Integrine arbeiten mit verschiedenen onkogenen Signalen zusammen, um diesen Prozess zu fördern. Tumorzellen sind in der Lage, die Expression ihrer Integrinen zu ändern. Integrine, die die Zellen in einem an die Basalmembran gebundenen und ruhenden Zustand halten, werden herunterreguliert. Die Expression der Integrine, die das Überleben, ihre Migration und Proliferation während der Tumorinvasion und Metastasierung fördern, wird hoch reguliert. Eine strikte Kategorisierung einzelner Integrine, die eher das Tumorwachstum fördern oder inhibieren, ist nicht möglich (Guo and Giancotti, 2004). Aufgrund dieser wichtigen Rolle der Integrine bei der Metastasierung soll im Rahmen dieser Arbeit die Expression von Integrinen untersucht werden. Die detaillierte Rolle von Integrinen bei der Metastasierung mit Fokus auf die in dieser Arbeit untersuchten Integrine wird daher nochmal in Abschnitt 2.4.1 erläutert.

Um im Prozess der Intravasation schließlich in die Zirkulation zu gelangen, müssen die Tumorzellen in einem als transendotheliale Migration (TEM) bezeichneten Prozess die Endothelzellbarriere der Blutgefäße passieren (Reymond et al., 2013).

2.3.2 Hämatogene Metastasierung

Im Gefäßsystem zirkulierende Tumorzellen repräsentieren eine Art metastatischer Zwischenstufe auf dem Weg zwischen Primärtumor und den Orten der sekundären Manifestation (Metastasen). In der Zirkulation müssen die Tumorzellen einer Reihe von Hindernissen überleben, um Metastasen ausbilden zu können (Valastyan and Weinberg, 2011). Normale Zellen würden in der freien Zirkulation durch den Verlust der (auch über Integrine vermittelten) Verankerung an eine Extrazelluläre Matrix eine Anoikis, das ist eine Art der Apoptose, durchlaufen. Eine wichtige Eigenschaft disseminationsfähiger Tumorzellen ist es daher, dass sie eine relative Resistenz gegenüber der Anoikis besitzen. Verschiedene Signalwege, die in den Tumorzellen aktiviert werden, ermöglichen dies. Integrine aktivieren ebenfalls Signalwege, die verantwortlich für die Resistenz von Tumorzellen gegenüber der Anoikis sind (Guo and Giancotti, 2004). Nach der Zirkulation im Blutkreislauf kommt es zu einem Arrest der Tumorzellen im Gefäßsystem verschiedener Organe (Chambers et al., 2001). In welchen Organen sich klassischerweise Metastasen ausbilden, wird vom primären Tumortyp beeinflusst (Fidler, 2003). Primär werden Tumorzellen passiv aufgrund der Größenrestriktion an den initialen Kapillaren festgehalten, denen sie begegnen (Chambers et al., 2002).

Auch wenn die Anordnung der Blutgefäße prinzipiell verhindert, dass Karzinomzellen Kapillaren erreichen, die stromabwärts der Kapillaren liegen, in denen Tumorzellen vorher bereits „stecken bleiben“, können Tumorzellen durch bestimmte Mechanismen diesem Einfangen entkommen und in weiter entfernte Organe metastasieren (Valastyan and Weinberg, 2011). Es ist damit wahrscheinlich, dass die initiale Lokalisation zwar von der Größenrestriktion beeinflusst wird, dass aber das Wachstum und damit letztendlich die Ausbildung von Metastasen von den Merkmalen der neoplastischen Zellen, den Eigenschaften der Mikroumgebung und der Interaktion zwischen diesen Faktoren die Organpräferenz bestimmt. Zytokine können ebenfalls dafür sorgen, dass Tumorzellen aktiv in bestimmte Organe navigieren (Chambers et al., 2001). Chemokine und ihre Rezeptoren beeinflussen zum Beispiel das Homing von Lymphozyten in bestimmte Organe. Es konnte gezeigt werden, dass auch Tumorzellen spezifische Chemokinrezeptoren exprimieren, die die Tumorzellen in Richtung der Organe navigieren, die entsprechende Chemokine ausschütten (Chambers et al., 2002). Spezifische Interaktionen zwischen vorgegebenen und induzierbaren Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen sorgen somit für eine spezifische, adhäsive Wechselwirkung in bestimmten Geweben und könnten

so den unterschiedlichen Tropismus von Krebszellsubtypen erklären. Diese Interaktionen finden im Rahmen der Extravasation statt (Strell and Entschladen, 2008).

2.3.3 Extravasation

Nachdem die zirkulierenden Tumorzellen diesen initialen Schritt in der hämatogenen Metastasierung überstanden haben, müssen sie in einem als Extravasation bezeichneten Prozess zum Zielgewebe gelangen (Gupta and Massagué, 2006). Der Prozess der Extravasation ist für Leukozyten am besten untersucht, es wird aber angenommen, dass die Extravasation von Tumorzellen ähnlich erfolgt. Daher wird das Modell der Extravasation bei Leukozyten häufig als Vorlage für den Extravasationsprozess von Tumorzellen herangezogen. Die Extravasation wird durch das Rolling initiiert, bei dem es zu einer lockeren Adhäsion der Zellen am Endothel kommt. Es folgt dann der Arrest durch eine feste Adhäsion und anschließend die Diapedese der Zellen (Strell and Entschladen, 2008, Hill, 2011, Miles et al., 2008).

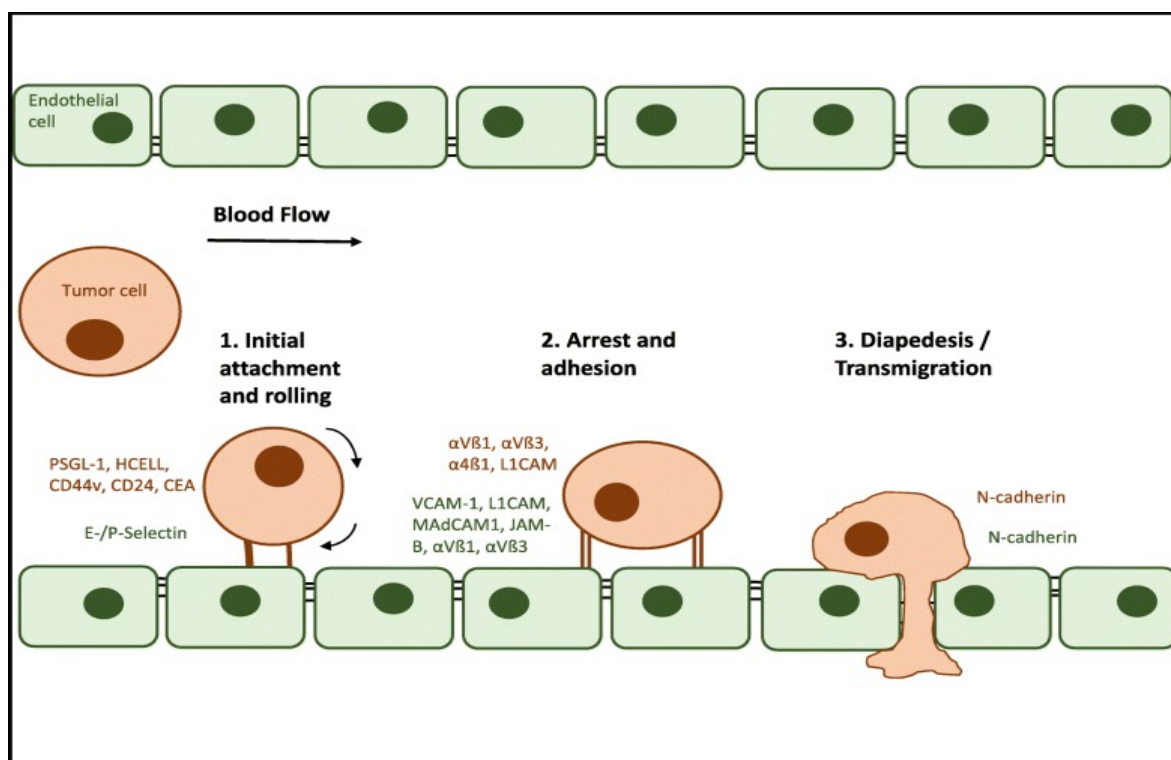


Abbildung 3: Darstellung der Schritte bei der Extravasation von Tumorzellen. Zuerst kommt es zu einer: 1. Initialen Anheftung und Rolling, dann: 2. Arrest und Adhäsion und der letzte Schritt der Extravasation wird durch die: 3. Diapedese/Transmigration eingeleitet. In grüner und roter Schrift sind einige der in den jeweiligen Schritten beteiligten Zelladhäsionsmoleküle dargestellt. In grün jeweils sich auf dem Endothel befindenden Adhäsionsmoleküle und in Rot auf den Tumorzellen exprimierte Adhäsionsmoleküle (Sökeland and Schumacher, 2019)

Im ersten Schritt werden die Zellen aufgrund einer lockeren Interaktion immer noch entlang des Blutstroms mitgezogen, was zu einer rollenden Bewegung der Zellen auf

der vaskulären Oberfläche führt. Auf dem Endothel werden E- und P-Selektine exprimiert, die eine lockere Adhäsion auf der Endothelzelloberfläche vermitteln (Strell and Entschladen, 2008, Hill, 2011).

E-Selektin und P-Selektin werden nicht von ruhenden endothelialen Zellen exprimiert (Hill, 2011). Erst durch entzündliche Zytokine, die von Krebszellen selbst oder von krebszellenassoziierten Leukozyten ausgeschüttet werden, werden die endothelialen Zellen aktiviert. (Reymond et al., 2013). Im Unterschied zu den Leukozyten exprimieren Tumorzellen auf ihrer Oberfläche keine Selektine. Dadurch erfolgt die Interaktion durch Liganden wie CD (Cluster of Differentiation) 44, die auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert werden (Strell and Entschladen, 2008, Hill, 2011).

Neben Selektinen wurden ebenfalls N-Cadherin und das vaskuläre endotheliale (VE)-Cadherin identifiziert, welche für eine lockere Adhäsion von Leukozyten sorgen. Es gibt verschiedene Hinweise dafür, dass das auf Tumorzellen exprimierte N-Cadherin ebenfalls durch die Interaktion mit N-Cadherin auf den Endothelzellen am Rolling beteiligt ist. (Strell and Entschladen, 2008).

Im zweiten Schritt wird die feste Adhäsion insbesondere durch Integrine und die Immunglobulin-Superfamilie (IgCAMs) vermittelt (Strell and Entschladen, 2008, Hill, 2011, Reymond et al., 2013). Integrine können an eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen und extrazelluläre Matrixproteine binden und haben keine eindeutig spezifischen Bindungspartner (Plow et al., 2000). Sie sind einzelne Transmembran-Zelladhäsionsmoleküle, die aus zwei nicht kovalent verbundenen α - und β -Ketten bestehen (Strell and Entschladen, 2008). Integrinrezeptoren nehmen im inaktiven Zustand eine bestimmte Konformation ein, die eine feste Interaktion mit ihren Liganden nicht ermöglicht. Durch Zytokine, die an ihre Rezeptoren auf den Leukozyten binden, wird ein Signalweg induziert, der die Konformation der Integrine ändert und dadurch ihre Affinität zu ihren Liganden erhöht. Zytokine induzieren ebenfalls die Expression von endothelialen Immunglobulin-CAMs, interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM) und vaskulären Zell-Adhäsionsmolekülen (VCAM). Integrine und Immunglobuline können miteinander eine feste Adhäsione ausbilden und so zu einem Arrest der Leukozyten führen. Sowohl Integrine als auch Immunglobuline können sowohl auf der Oberfläche der adhärierenden Zellen als auch auf Endothelzellen vorkommen (Miles et al., 2008).

Bei der festen Adhäsion unterscheiden sich Tumorzellen von den Leukozyten vor allem durch die konkreten Adhäsionsmoleküle, die sie auf der Oberfläche exprimieren. Tumorzellen exprimieren im Gegensatz zu Leukozyten zum Beispiel kein Integrin $\beta 2$ und $\beta 7$, da die Expression dieser Integrine auf Leukozyten beschränkt ist. Mit Integrin $\beta 1$ zusammen stellt Integrin $\beta 2$ die wichtigste Subfamilie der Integrine im Adhäsionsprozess von Leukozyten dar (Strell and Entschladen, 2008). Die feste Adhäsion erleichtert die transendotheliale Migration (TEM) und stellt den letzten Schritt der Extravasation dar (Miles et al., 2008). Das Ziel ist der Eintritt durch das Endothel in das Stroma des Zielgewebes (Hill, 2011).

Nach Passieren des Endothels trennt die Basalmembran die Zellen vom zu infiltrierenden Stroma. Um diese Barriere zu überqueren, heften sich die Zellen an die Matrixkomponente an und exprimieren Matrix-Metallproteinasen, die die Matrix auflösen (Strell and Entschladen, 2008).

Die Adhäsion der Tumorzellen an die Matrixkomponenten der Basalmembran wird - ähnlich wie bei der Intravasation -hauptsächlich durch Integrine vermittelt. Einige Integrine können dabei ihre Bindungsspezifität ändern und ihre Zell-Zell-Verbindungen in Zell-Matrix-Verbindungen umwandeln. Die subendotheliale Matrix besteht, um hier nur einige Beispiele aufzuzählen, aus: Kollagen, insbesondere Kollagen Typ IV und VIII, Fibronectin und Laminin. Die Expression einiger dieser Komponenten ist gewebsspezifisch (Miles et al., 2008)

2.3.4 Ausbildung von Metastasen am Zielorgan

Nach der Extravasation invadieren die Tumorzellen in das darunterliegende Gewebe. Um das neue Gewebe kolonisieren zu können, müssen die Tumorzellen zunächst in der neuen Mikroumgebung überleben und setzen dabei komplexe Mechanismen ein, um die fremde Mikroumgebungen zu modifizieren (Valastyan and Weinberg, 2011). Aufgrund der Unterschiede in der Mikroumgebung zwischen den einzelnen Organen ist es je nach Eigenschaften der Tumorzelle, die vom Ursprungsort geprägt werden, einfacher, sich in bestimmten Organen zu adaptieren und Metastasen auszubilden. Es wird angenommen, dass dies einen allgemein wichtigen Faktor für den Gewebetropismus darstellt (Valastyan and Weinberg, 2011). Nach der initial von Stephan Paget im Jahre 1889 aufgestellten „Seed (Samen) und Soil (Boden)“ Hypothese können Tumorzellen (Samen) zwar alle Orte erreichen, aber

bilden nur in den Organen (Boden) Metastasen aus, mit denen der Samen kompatibel ist (Fidler and Poste, 2008).

Tumorzellen in der neuen Mikroumgebung werden als Mikrometastasen bezeichnet. Nachdem sie im neuen Gewebe überleben, proliferieren und über eine ausreichende Blutversorgung verfügen (Vaskularisation), bilden sie klinisch nachweisbare Makrometastasen aus. Schaffen es die Zellen nicht, sich der neuen Mikroumgebung anzupassen oder werden beispielsweise vom Immunsystem erkannt, gehen sie in die Apoptose. Die meisten Krebszellen schaffen es nicht, das neue Gewebe zu kolonisieren und unterliegen diesem Zelltod. Die dritte Möglichkeit ist, dass die Zellen in einen Wachstumsstillstand (Dormanz) eintreten. In diesem Zustand ist die Rate an Tumorzellen, die proliferieren und sterben gleich. Das Ergebnis ist, dass es zu keinem Nettowachstum kommt. Es ist jedoch möglich, dass die Tumorzellen, wieder aus diesem Zustand austreten und zu einem späteren Zeitpunkt Makrometastasen ausbilden (Reymond et al., 2013, Chambers et al., 2001). Viele Tumoren zeigen klinisch diesen Zustand der Dormanz. Dies erklärt auch, warum Metastasen sogar Jahre nach erfolgreicher Behandlung des Primärtumors entstehen können (Chambers et al., 2001). Was in der Zeit bis zur Reaktivierung mit den Tumorzellen passiert und was zu einer Reaktivierung führt, ist schlecht verstanden (Chambers et al., 2001).

2.4 Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) nehmen eine wichtige Rolle bei allen beschriebenen Schritten der Metastasierung ein. Sie bilden Zell-zu-Zell und Zell-zu-Matrix-Interaktionen aus und ermöglichen so erst die Metastasierung (Skubitz, 2002). Zelladhäsionsmoleküle lassen sich in die 4 Hauptgruppen der Cadherine, Integrine, Selektine und Immunglobulin-Superfamilie (Elangbam et al., 1997)

In Folgendem werden kurz einige der in dieser Arbeit untersuchten Zelladhäsionsmoleküle vorgestellt.

2.4.1 Integrine

Die Integrinrezeptorfamilie wurde im Jahre 1987 entdeckt (Hynes, 1987) und stellt heute die am besten verstandene Gruppe der Zelladhäsionsrezeptoren dar. Integrine sind heterodimere transmembranöse Adhäsionsrezeptoren, die aus einer nicht-kovalent verbundenen α und β Untereinheit mit einer extrazellulären, transmembranösen und einer kurzen intrazellulären Domäne aufgebaut sind.

Insgesamt kommen 8 verschiedene β - und 18 verschiedene α -Untereinheiten vor, die sich zu mindestens 24 verschiedenen $\alpha\beta$ -Rezeptoren zusammensetzen können (Hynes, 2002, Springer and Wang, 2004, van der Flier and Sonnenberg, 2001). Die α -Untereinheit bestimmt die Integrin-Ligandenspezifität, während die β -Untereinheit, die mit dem Zytoskelett verbunden ist, verschiedene Signalwege beeinflusst (Hynes, 2002). Integrine können an verschiedene, oft überlappende Kombinationen von Liganden binden und so Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen eingehen (Springer and Wang, 2004).

Zu den Liganden, mit denen Integrine Zell-Zell-Kontakte ausbilden, gehören Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und Cadherine. Komponente der extrazellulären Matrix, an die Integrine binden können sind zum Beispiel Laminin, Kollagen oder Fibronectin (Springer and Wang, 2004, Hynes, 1999).

Durch die Bindung extrazellulärer Liganden vermitteln Integrine eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Deshalb wird dies auch „outside-in“ Signalweg genannt (Hynes, 2002). Der Name ist auch von dieser Eigenschaft der Integrine abgeleitet, extrazelluläre Signale ins Innere der Zelle zu integrieren (van der Flier and Sonnenberg, 2001). Gleichzeitig können sie durch intrazelluläre Signale Eigenschaften wie die Affinität ihrer extrazellulären Komponente modulieren, weshalb dies als „inside-out“ Signalweg bezeichnet wird. Insgesamt können die Integrine so viele Aspekte des Zellverhaltens modulieren, einschließlich Proliferation, Apoptose, Form, Polarität, Beweglichkeit, Genexpression und Differenzierung. Je nach Integrinuntereinheit liegt jedoch eine andere spezifische Funktion vor. Das konnte in Experimenten mit Knockout-Mäusen nachgewiesen werden, bei denen der Knockout unterschiedlicher Integrine in einem unterschiedlichen Phänotyp und der Einschränkung verschiedener Funktionen resultierte (Hynes, 2002). In Abbildung 4 erfolgt die Einteilung der Integrine nach ihrer Ligandenbindungsspezifität und anhand der Beschaffenheit der α Untereinheit (Hynes, 2002).

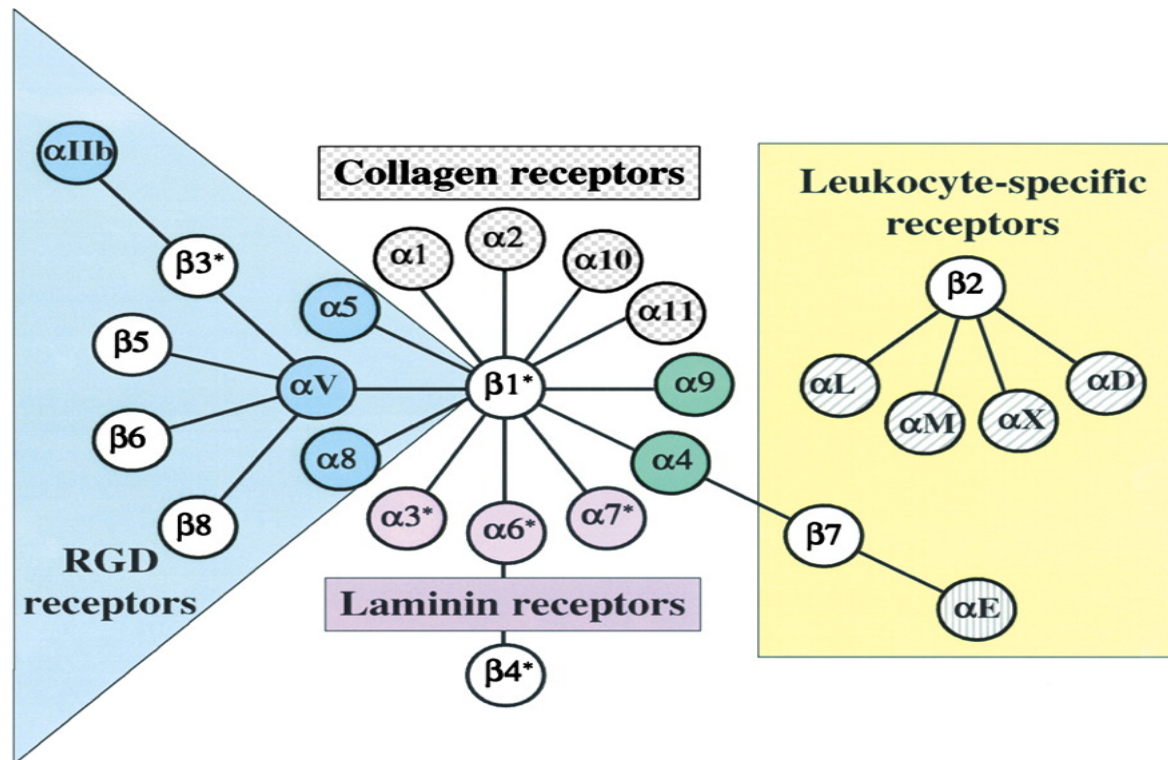


Abbildung 4: Einteilung der 24 Integrin-Heterodimere in Rezeptorklassen. Laminin-Rezeptoren (lila), RGD-Rezeptoren (blau), Leukozyten-spezifische-Rezeptoren (gelb), Kollagen-Rezeptoren (grau) und Zelladhäsions-bindende Integrine (grün). Bei α -Untereinheiten mit grauen Schraffierungen oder Punktmustern liegt eine α -I-Domäne vor (Hynes, 2002).

Die RGD-Rezeptoren erkennen die Tripeptidsequenz RGD (Arginin, Glycin und Asparaginsäure) in Molekülen wie Fibronektin. Die Integrine α 4 β 1 und α 9 β 1 erkennen sowohl Extrazelluläre Matrix Proteine als auch Adhäsionsmoleküle aus der Ig-Superfamilie. Integrin β 2 und β 7 kommen nur auf Leukozyten vor (Hynes, 2002).

2.4.1.1 Integrin β 4

Das Integrin β 4 kommt nur in Kombination mit der α 6-Untereinheit vor. Integrin α 6 β 4- ist ein Rezeptor für die Basalmembrankomponenten Laminin. Die α 6-Untereinheit ist zusätzlich auch mit der β 1-Untereinheit assoziiert und ist ebenfalls ein Rezeptor für Laminin (Lee et al., 1992). Die Besonderheit der β 4-Untereinheit ist, dass sie als einziges Integrin mit 1.000 Aminosäure Einheiten über eine lange zytoplasmatische Domäne verfügt (van der Flier and Sonnenberg, 2001).

Verschiedene Studien zeigen, das Integrin α 6 β 4 bei vielen invasiven Karzinomen exprimiert wird oder die Expression sogar gesteigert wird. Integrin α 6 β 4 ist in der Lage, Signalkaskaden zu aktivieren, die für die Invasion wichtig sind (Mercurio and Rabinovitz, 2001). Eine gesteigerte Expression von Integrin β 4 ist zudem bei

verschiedenen Krebsarten mit einer schlechteren Prognose verbunden (Tagliabue et al., 1998).

2.4.1.2 Integrin $\beta 1$ (CD29)

Integrin $\beta 1$ wird auch Very Late Activation Antigen (VLA)-Integrin genannt und vermittelt hauptsächlich Zell-Matrix-Interaktionen (Strell and Entschladen, 2008).

Insgesamt enthalten 12 Integrine eine $\beta 1$ -Untereinheit. Damit ist $\beta 1$ die am häufigsten vorkommende Integrin-Untereinheit. Integrin $\beta 1$ formt mit den Integrinen $\alpha 5$, $\alpha 8$ und αV Einheiten, die in der Lage sind, RGD-Sequenzen zu erkennen und zu binden. Zwei weitere mit $\beta 1$ vergesellschaftete α -Untereinheiten ($\alpha 4$, $\alpha 9$) erkennen und binden LDV-Sequenzen (Leucin-Asparaginsäure-Valin), welche funktionell der RGD-Sequenz ähneln. 4 weitere mit $\beta 1$ vergesellschaftete α -Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$ und $\alpha 11$) enthalten eine α -I-Domäne und können an Laminin und Kollagen binden. Die Integrine $\beta 1\alpha 3$, $\beta 1\alpha 6$ und $\beta 1\alpha 7$ sind hochspezifische Lamininrezeptoren (Humphries et al., 2006). Diese genannten Liganden sind entscheidend für die Unterteilung der Integrine in Rezeptorklassen (Abbildung 4) (Hynes, 2002). Es gibt aber noch zahlreiche andere Liganden, die von diesen Integrinen erkannt und gebunden werden können. $\alpha 2\beta 1$ kann zum Beispiel auch an E-Cadherin binden, $\alpha 5\beta 1$ an Fibrillin und $\alpha 4\beta 1$ z.B. an ICAM-4 (Humphries et al., 2006).

Integrin $\beta 1$ ist neben Integrin $\beta 2$ das wichtigste Integrin für den Leukozytenarrest. Im Gegensatz zu $\beta 2$ ist die Expression des $\beta 1$ Integrin aber nicht auf Leukozyten beschränkt sondern kann auch auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert werden (Strell and Entschladen, 2008). Alle untersuchten Zelllinien verschiedener Krebsarten (Lungenkarzinom, Plattenepithelkarzinom, Magenkarzinom, Kolonkarzinom, Hepatozelluläres Karzinom, Pankreaskarzinom, Cholangiozelluläres Karzinom, Brustkrebs, Blasenkrebs und Epidermoidkarzinom) zeigten eine $\beta 1$ -Expression. Die Zelllinien des Pankreaskarzinoms gehört dabei zu den Zellen, die eine besonders starke Expression für $\beta 1$ aufwiesen. Anhand der Ergebnisse der Studie folgern die Autoren, dass das $\beta 1$ -Integrin eine wichtige Rolle bei der Metastasierung einnehmen muss und die Adhäsion, Migration und Invasion der Krebszellen beeinflusst (Fujita et al., 1992).

Auch die Wichtigkeit von $\beta 1$ für die Ausbildung peritonealer Metastasen konnte nachgewiesen werden, indem gezeigt wurde, dass sie die Adhäsion von Tumorzellen eines Ovarialkarzinoms an das peritoneale Mesothel vermitteln (Lessan et al., 1999).

Für das Pankreaskarzinom konnte weiterhin festgestellt werden, dass die Expression des Integrins $\alpha 6 \beta 1$ auf Tumorzellen erhöht ist, die Metastasen ausbilden können. Man folgert, dass dieses Integrin wahrscheinlich an der Ausbildung von Metastasen durch ihre Fähigkeit, an die Basalmembrankomponente Laminin zu binden, beteiligt ist (Vogelmann et al., 1999).

2.4.1.3 Integrin αv , $\beta 6$ und $\beta 3$

Insgesamt enthalten 5 Integrine die αv -Untereinheit ($\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ und $\beta 8$). Integrine mit der αv -Untereinheit sind in der Lage, Liganden zu erkennen, die eine RGD-Tripeptid-Sequenz enthalten, welche bei zahlreichen Liganden der Extrazellulärmatrix vorkommt. Dennoch zeigen die Integrine in Abhängigkeit von ihrer Beta-Untereinheit unterschiedliche Bindungseigenschaften auf (Humphries et al., 2006). Das $\beta 6$ und $\beta 3$ -Integrin kommen nur in Verbindung mit dem αv -Integrin vor und weisen damit Bindungseigenschaften für Moleküle mit RGD-Sequenzen auf (Hynes, 2002). Integrine mit der αv -Untereinheit spielen eine wesentliche Rolle bei Zelladhäsion und zellulärer Signalübertragung. Es wurde festgestellt, dass bestimmte αv -Integrine mit der Progression und Verbreitung von Tumoren assoziiert sind. Bei Brustkrebszellen beeinflusste das Muster der αv -Integrin Expression die Adhäsion und Migration der Zellen. Charakteristisch für Zellen mit hohem metastatischen Potential war insbesondere eine starke Expression des Integrins $\alpha v \beta 3$ (Wong et al., 1998). Beim Pankreaskarzinom konnte durch die Suppression von Integrin αv in Pankreaskarzinomzellen im Tiermodell mit Selektin defizienten Mäusen die Ausbildung einer peritonealen Karzinose gehemmt werden (Kemper et al., 2021). Integrin $\beta 3$ scheint unter den Integrinen am wichtigsten für die Vermittlung der Tumorangiogenese zu sein (Liu et al., 2008).

Beim Pankreaskarzinom konnte ungefähr bei der Hälfte der Patienten eine hohe Expression des Integrins $\alpha v \beta 3$ nachgewiesen werden (Hosotani et al., 2002)

Durch immunhistochemische Untersuchung konnte auch für das Integrin $\alpha v \beta 6$ in verschiedenem malignem Gewebe eine gesteigerte Expression nachgewiesen werden. Man vermutet, dass $\alpha v \beta 6$ den Tumorfortschritt, die Invasion und Metastasierung fördert und in bestimmten Tumorarten einen prognostischen Marker darstellen könnte (Van Aarsen et al., 2008). In einer Studie von Sipos et al. zeigte das PDAC eine starke $\alpha v \beta 6$ Expression (Sipos et al., 2004). Zudem wurde in multiplen soliden Tumoren eine positive Expression von $\alpha v \beta 6$ nachgewiesen und darunter zeigten insbesondere Tumorzellen des PDAC eine hohe Expression des Integrins $\beta 6$

(Whilding et al., 2017). Studienergebnisse deuten darauf hin, dass Integrin $\alpha V\beta 6$ in der Zukunft als Marker für die Diagnose des Pankreaskarzinoms genutzt werden könnte (Steiger et al., 2017).

Vor diesem Hintergrund ist ein Ziel dieser Arbeit, die Expression dieser Integrine bei der initialen peritonealen Metastasierung des PDAC zu untersuchen.

2.4.2 Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)

Die IgSF hat über 765 Mitglieder und gehört damit zur größten Proteinfamilie. Meistens handelt es sich bei Molekülen der IgSF um Typ-I Transmembranproteine, die eine extrazelluläre Domäne, transmembrane Domäne(n) und zytoplasmatischen Schwanz besitzen. Die Gemeinsamkeit ihrer Mitglieder ist das Vorkommen einer oder mehrerer Immunglobulin-Homologie Einheiten in der extrazellulären Domäne. Diese bestehen aus zwei gegenüberliegenden antiparallelen β -Faltblättern, die durch dazwischen liegende Disulfidbrücken stabilisiert werden (Wai Wong et al., 2012). Moleküle der IgSF dienen vor allem als Zellmembranrezeptoren und können diverse Liganden binden. Sie tragen zu verschiedenen zellulären Aktivitäten bei, einschließlich Adhäsion und Immunantworten (Dermoddy et al., 2009). Viele Mitglieder haben mehrere Funktionen und sind an verschiedenen Signalkaskaden durch die Interaktion mit anderen Rezeptorfamilien, einschließlich der Integrine und Selektine, beteiligt. Andere adhäsive Funktionen umfassen Zellerkennungsereignisse, die für die embryonale Entwicklung erforderlich sind. Eine Überexpression in Tumorzellen konnte schon für verschiedene Krebsarten beobachtet werden und wird mit einem metastatischen Fortschreiten in Verbindung gebracht (Buck, 1992). Im Folgenden erfolgt ein kurzer Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Mitglieder der IgSF.

2.4.2.1 ICAM-1 (CD54)

ICAM-1 ist ein Typ-I-Transmembranprotein der IgSF und wird auf vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert. Dazu gehören Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten, Leukozyten und auch Tumorzellen. Es kann bei vielen Krebsarten eine Dysregulation der ICAM-1 Expression nachgewiesen werden (Haydinger et al., 2023). ICAM-1 ist ein induzierbares Glykoprotein und fördert die Adhäsion bei immunologischen und entzündlichen Reaktionen (Staunton et al., 1988).

Entzündliche Reize bewirken die Hochregulation der ICAM-1 Expression. Zudem ist ICAM-1 wichtig für die Adhäsion von Leukozytenadhäsion an das Endothel und für die transendotheliale Migration.

Die Funktion von ICAM-1 wird vermittelt durch die Interaktion mit seinen Liganden. Dazu zählen das $\beta 2$ Integrin, Makrophagen-1-Antigen (MAC-1), Lymphozyten-Funktions-assoziiertes Antigen 1 (LFA-1), Hyaluron und Fibrinogen (Haydinger et al., 2023). Durch ICAM-1 können Tumorzellen an Leukozyten binden, die wiederum an das Endothel binden und dadurch als Bindeglied zwischen Endothel und Tumorzelle fungieren können (Strell and Entschladen, 2008).

Dass ICAM-1 bei Tumorzellen exprimiert wird, konnte für verschiedene Krebsarten gezeigt werden. Zum Beispiel konnte für verschiedene Brustkrebszelllinien aufgezeigt werden, dass eine verminderte ICAM-1 Expression mit einer geringen Invasion der Krebszellen verbunden ist (Rosette et al., 2005).

ICAM-1 nimmt wahrscheinlich auch eine wichtige Rolle bei der Metastasierung des Pankreaskarzinoms ein: Auf Krebszellen des Pankreaskarzinoms konnte eine deutliche Hochregulation der ICAM-1 Expression im Vergleich zu Zellen physiologischen Pankreasgewebes nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die Expression dieses Zelladhäsionsmoleküls vermutlich die Loslösung von Krebszellen vom primären Tumor fördert und zur Migration der Krebszellen und Metastasierung in entfernte Organe beiträgt (Tempia-Caliera et al., 2002).

2.4.2.2 L1CAM

L1CAM ist ein Transmembranglykoprotein und nimmt als neuronales Adhäsionsmolekül eine wichtige Funktion bei der Entwicklung des Nervensystems ein. L1CAM ist in der Lage, an sich selbst zu binden (homophil), als auch heterophile Bindungen, zum Beispiel mit Integrinen oder CD24 einzugehen (Altevogt et al., 2016). Zu den Integrinen, mit denen L1CAM eine Bindung eingehen kann, gehören RGD bindende Integrine und das $\alpha 1 \beta 3$ Integrin. Zum einen erfüllt L1CAM die Funktion eines Zelladhäsionsmoleküls, zum anderen ist L1CAM in der Lage, die Motilität von Zellen zu fördern. Für verschiedene Karzinome konnte festgestellt werden, dass die L1CAM Expression eine Metastasierung fördert (Kiefel et al., 2012). Bei verschiedenen Karzinomen ist eine gesteigerte L1CAM Expression mit einer schlechteren Prognose und gesteigerter Motilität, Fähigkeit zur Invasion, Metastasierung, Wachstum und Chemoresistenz verbunden. Auch in Vorläuferläsionen von Karzinomen konnte eine gesteigerte L1CAM Expression vorgefunden werden (Altevogt et al., 2016). Auch bei der Vorläuferläsion (PanIN) des PDAC konnte nachgewiesen werden, dass mit steigendem PanIN-Grad die L1CAM Expression signifikant zunimmt. (Bergmann et al., 2010). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die L1CAM Expression in

einem frühen Stadium der PDAC- Tumorgenese mit einer malignen Transformation pankreatischer Gangzellen verbunden war (Geismann et al., 2009).

2.4.2.3 CEACAM7

CEACAM7 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 7) gehört zur Familie der insgesamt zwölf CEA ähnlichen (carcioembryonic Antigenrelated) Zelladhäsionsmoleküle. CEACAMs sind wichtig für Prozesse wie die Zelladhäsion und sind über für verschiedene Signalwege auch an der Metastasierung von Krebszellen beteiligt und fördern die Tumorprogression, Inflammation und Angiogenese. CEACAM1, 5 und 6 können klinisch als Biomarker für verschiedene Karzinome (Beauchemin and Arabzadeh, 2013), einschließlich des Pankreaskarzinoms, herangezogen werden (Gebauer et al., 2014). Eine weitere Studie bestätigte ebenfalls, dass CEACAM6 als Biomarker für das PDAC herangezogen werden kann und zeigte zusätzlich auf, dass CEACAM 6 auch bei den Vorläuferläsionen (PanIN) als Biomarker dienen kann (Duxbury et al., 2005). Das CEA-Zelladhäsionsmolekül 7 scheint spezifisch nur auf bestimmten Zellen exprimiert zu werden. So konnte in einer IHC Expressionsstudie verschiedener Gewebe nur eine positive Expression von CEACAM auf bestimmten Zellen des Dickdarms und auf isolierten duktalem epithelialen Zellen innerhalb der Bauchspeicheldrüse vorgefunden werden (Schölzel et al., 2000).

2.4.2.4 EpCAM (CD 326)

EpCAM (epitheliales Zelladhäsionsmolekül) gehört zu den Typ-I-Transmembranproteinen der IgSF. Es wird auf vielen epithelialen Zellen, auch Stamm- und Vorläuferzellen, exprimiert. Auf epithelialen Zellen wird es vorwiegend auf der dem interzellulären zugewandten Seite der Zelloberfläche exprimiert. Auf Krebszellen dagegen ist das Adhäsionsmolekül homogen auf der Zelloberfläche verteilt und wird bei vielen verschiedenen Krebsarten exprimiert. Insbesondere Adenokarzinome weisen praktisch immer eine positive EpCAM Expression auf (Munz et al., 2009). Eine Untersuchung verschiedener Karzinome konnte eine EpCAM Expression bei 98 von 131 Tumorkategorien nachweisen. Als Karzinome mit einem hohen Anteil stark EpCAM-positiver Tumore wurden vor allem Adenokarzinome des Kolons, der Prostata und des Pankreas identifiziert. Es wird angenommen, dass EpCAM daher

insbesondere bei diesen Tumoren ein vielversprechendes Therapieziel sein kann (Went et al., 2004).

2.4.3 CD44

CD44-Moleküle sind eine strukturell heterogene Gruppe von Transmembran-Glykoproteinen der Klasse I (Ponta et al., 2003). Die Heterogenität beruht vor allem auf der Vielzahl der unterschiedlich möglichen Ansätze beim Splicing und der variablen post-translationalen Modifikationen. Diese Heterogenität resultiert in einer funktionellen Diversität der CD44 Moleküle (Screaton et al., 1992). Je nach Zelltyp und Wachstumsbedingung können diese Vorgänge angepasst werden (Ponta et al., 2003). CD44 kommt auf der Oberfläche unterschiedlichster Zelltypen vor, unter anderem auf Epithelzellen (Skubitz, 2002), auf hämatopoetischen (Dimitroff et al., 2001) und embryonalen Stammzellen (Domev et al., 2012). CD44 ist auch auf der Oberfläche von Tumorzellen verschiedener Krebsarten vorzufinden. Je nach durchgeführter Studie und je nach Tumortyp scheint sich der Einfluss, den CD44 auf die Tumorprogression haben kann, zu unterscheiden. So wirkt sich die Hochregulation der CD44 Expression bei einigen Karzinomen fördernd auf die Tumorprogression aus, während es in anderen Krebsarten eine supprimierende Wirkung zeigt. Sowohl negative als auch positive Einflüsse der CD44 Expression auf die Krebsprognose sind bekannt (Naor et al., 2002).

2.4.4 Cadherine

Die Cadherin-Familie umfasst fünf Hauptunterfamilien (van Roy and Berx, 2008) und hat insgesamt mindestens 80 Mitglieder. Alle Mitglieder der Cadherin-Superfamilie sind Transmembranproteine (Yagi and Takeichi, 2000).

Cadherine bilden adhäsive Kontakte zwischen Zellen aus. Sie vermitteln stabile Zellinteraktionen beispielsweise durch die Ausbildung von Zonulae adhaerentes und Desmosomen auf epithelialen Zellen. Cadherine haben eine dynamische Rolle. Gleichzeitig könne sie die Zellumbildung und Migration vermitteln. Sie sind zudem wichtig für die Zellsortierung und für die Bildung von Synapsen zwischen Neuronen und kontrollieren Wachstum und Erneuerung von Geweben. Sie fungieren auch als Schlüsselmoleküle in der Morphogenese verschiedener Organe. Durch die Interaktion mit Liganden kann ein „Inside Out“-Signal die Expression der Cadherine auf der Zelloberfläche beeinflussen (Gumbiner, 2005). Eine der Cadherin Hauptunterfamilien

sind die klassischen Cadherine vom Typ I. Sowohl E-Cadherin (van Roy and Berx, 2008) als auch N-Cadherin zählen zu dieser klassischen Form der Cadherine. Klassische Cadherine bilden Ca^{2+} -abhängige homophile Bindungen aus und werden in fast allen festen Geweben exprimiert. Sie stehen in enger Verbindung mit dem Aktinzytoskelett, wodurch sie die Zellstruktur verändern können. Die Benennung der klassischen Cadherine erfolgt nach dem Gewebe, auf dem sie am stärksten exprimiert werden. Im Falle von E-Cadherine auf epithelialen Zellen und bei N-Cadherin auf neuronalen Zellen. Allerdings werden diese Cadherine nicht ausschließlich auf diesen Geweben exprimiert, sondern können in vielen verschiedenen Geweben exprimiert werden (Gumbiner, 2005)

2.4.4.1 E-Cadherin

E-Cadherin ist ein Adhäsionsmolekül, welches supprimierend auf Prozesse der Tumorprogression wirkt (van Roy and Berx, 2008). Der Verlust von E-Cadherin führt zu einer Lockerung der Zell-Zell-Adhäsion. Maligne Zellen können sich folglich besser aus epithelialen Verbänden lösen. Dies geschieht im Rahmen der EMT, die essenziell für die Metastasierung von Tumorzellen ist. Der Verlust von E-Cadherin während der Karzinogenese wird mit einem gesteigerten invasiven Verhalten, Migration und Metastasierung der Tumorzellen in Verbindung gebracht (Christofori, 2006). Die kohäsiven Eigenschaften der Tumorzellen des Pankreaskarzinoms werden von der E-Cadherin Expression beeinflusst. Tumorzellen mit einem Verlust der E-Cadherin Expression zeigen geringere adhäsive Fähigkeiten auf (Winter et al., 2008).

2.4.4.2 N-Cadherin

Das Adhäsionsmolekül N-Cadherin ist an einer Reihe von verschiedenen Prozessen wie an der Zell-Zell Adhäsion, an der Differenzierung, Embryogenese, Migration, Invasion und Transduktion von Signalen beteiligt. Eine Zunahme der N-Cadherin Expression während der Tumorprogression konnte schon bei einer Reihe von verschiedenen Karzinomen beobachtet werden. (Derycke and Bracke, 2004). Der Verlust der E-Cadherin Expression während der EMT ist begleitet von einer gesteigerten N-Cadherin Expression, welche die Motilität und Migration der Tumorzellen fördert (Christofori, 2006). N-Cadherin wird von Krebszellen wie auch von Endothelzellen exprimiert und ist wichtig für die initial lockere Adhäsion von

Tumorzellen an das Endothel. Dies wird auch als „Rolling“ bezeichnet (siehe Abschnitt 2.2.2). (Reymond et al., 2013)

Die Überexpression von N-Cadherin ist auch an der EMT des Pankreaskarzinoms beteiligt und wird durch Wachstumsfaktoren beeinflusst. Eine gesteigerte N-Cadherin Expression beim Pankreaskarzinom korrelierte mit der neuralen Invasion und ging mit einem schlechteren Grad der Differenzierung und mit einer gesteigerten Vimentin Expression (Nakajima et al., 2004) einher. In einem Experiment konnte für das PDAC gezeigt werden, dass Mäuse mit einer reduzierten N-Cadherin Expression länger überlebten. Dies lässt annehmen, dass auch N-Cadherin einen prognostischen Wert für das PDAC hat und ein vielversprechendes therapeutisches Ziel für die Behandlung darstellen kann (Su et al., 2012). Die therapeutische Anwendung eines N-Cadherin Antagonisten in einem Mausmodell für Bauchspeicheldrüsenkrebs zeigte, dass der Antagonist eine signifikante Reduktion der Tumor Aktivität erbrachte. Diese Ergebnisse bestätigen, dass N-Cadherin als Angriffspunkt therapeutischer Interventionen Potenzial für die Behandlung von Bauchspeicheldrüsenkrebs beim Menschen hat (Shintani et al., 2008).

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Zelllinie und Eigenschaften

Die verwendete Pankreaskarzinom-Zelllinie PaCa 5061 ist gekennzeichnet durch ein hohes pulmonales Metastasierungspotential (Kalinina et al., 2010). Sie stammt von einem fortgeschrittenem Adenokarzinom des Pankreas nach einer totalen Pankreatikoduodenektomie bei einem 63 Jahre alten männlichem Patienten. Als Eigenschaften dieser Pankreaskarzinomzelllinie wird eine Verdopplungszeit der Tumorzellen von 30 bis 48 h in einer konventionellen Zellkultur beschrieben. Zudem zeigt die Zelllinie einen epithelialen Phänotyp mit einer hohen Expression für EpCAM und CEACAM1. Zudem zeigte die Zelllinie ein homogenes Expressionslevel für CD44 bei allen Zellen (Kalinina et al., 2010).

3.2 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerätebezeichnung	Gerätetyp	Hersteller
Dampfkochtopf	Pascal Steamer, Dako GmbH	Dako, Agilent Technologies; Kalifornien, USA
H.E. Färbeautomat	Shandon Varistain 24-4	Thermo Electron Cooperation; Waltham, USA
Kugelmühel	TissueLyser II	Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland
Mikroskop	Mikroskop AxioPlan 2	Carl ZEISS GmbH; Jena, Deutschland
Mikroskop	Zeiss Axio Scan Z.1	Carl ZEISS GmbH; Jena, Deutschland
Mikrowelle	Mikrowelle	Sharp; Osaka, Japan
Nanodrop	NanoDrop Spektralphotometer ND-100	PEQLAB Biotechnologie GMBH; Erlangen, Germany
Paraffinausguss Automat	Leica EG 1160	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH; Wetzlar, Deutschland
PCR-Analysesystem	LightCycler 480 Instrument II	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Deutschland
Schlittenmikrotom	MICROM Type HM 400 R, Ser. Nr. 10951	MICROM International GmbH; Walldorf, Deutschland

Vortex	MS1 Minishaker	IKA®-Werke GmbH & Co. KG; Staufen, Deutschland
Vortex	Vortex REAX	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach, Deutschland
Wärmeplatte	Wärmeplatte	MEDAX GmbH & Co. KG; Neumünster, Deutschland
Wärmeschrank (histologische Schnitte)	Wärmeschrank Melag	Wilke und Witzel Forschungs- und Laborbedarf Medizintechnik; Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo, Fisher Scientific GmbH; Schwerte, Deutschland
Zentrifuge 96 Wellplatte	Perfect Spin P 91-PSPIN-P	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

3.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Gerätebezeichnung	Gerätetyp	Hersteller
96 Wells Platte	Light Cyclor 480 Multiwell Plate 96 white	Roche Deutschland Holding GmbH; Mannheim, Deutschland
Abdichtfolie 96 Well Platte	Roche	Roche Deutschland Holding GmbH; Mannheim, Germany
Abdichtfolie 96 Well Platte	Light Cyclor 480 Sealing Foil	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Deutschland
Deckgläser	Menzel- Gläser, diverse Größen	Gerhard Menzel GmbH; Braunschweig, Deutschland
Kühlblock 96 Well Platte	Eppendorf AG	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Objektträger beschichtet	Histo Bond	Paul Marienfeld GmbH & Co KG; Lauda-Königshofen, Deutschland
Pipettenspitzen, Kunststoff, diverse Größen zwischen 1-10 µl und bis 1000 µl	Tip One	STARLAB GmbH; Ahrensburg, Deutschland

Silanbeschichtete Objektträger	HistoBond®	Paul Marienfeld GmbH & Co KG; Lauda-Königshofen, Deutschland
--------------------------------	------------	--

3.4 Antikörper

3.4.1 Primärantikörper

Tabelle 3: Primärantikörper

Zielstruktur	Antikörper	Katalognummer und Hersteller
CD44	Purified Mouse Anti Human CD44, monoklonal IgG2b (250 µg/ml)	Kat. 550392 , BD Pharmingen Inc; San Diego, USA
CEACAM7	Anti CEACAM 7 antibody, Rabbit anti-Human Polyclonal	Kat. LS-B13068 LSBio; Seattle, USA
E-Cadherin	Mouse anti-Human, Monoclonal mouse antibody	Kat. M3612 , Dako Agilent Technologies; Kalifornien, USA
EpCam	Mouse anti Human, monoklonal IgG1	Kat. 14-9326-82 , Thermo Fisher Inc; Waltham, USA
HSP 60	Anti HSP-60 Antibody produced in Rabbit, IgG polyklonal	Kat. NBP1-77397 , Novus Biologicals; Denver, USA
ICAM-1	Anti ICAM-1 antibody, Maus monoklonales IgG _{2a} κ	Kat. Sc-8439 , Santa Cruz; Texas, USA
Integrin β6	Polyclonal Antibody against Human ITGB6, produced in Rabbit	Kat. HPA023626 , Atlas Antibodies AB; Lund, Schweden
Integrin β1	Anti-Integrin beta 1 antibody, monoclonal mouse antibody	Kat. Ab3167 , Abcam, Cambridge, England
Integrin β3	Anti-Integrin β3 Monoclonal mouse antibody,	Kat. M0753 , Dako Agilent Technologies; Kalifornien, USA
Integrin β4	Rat monoclonal to Integrin beta 4, anti-Human	Kat. Ab110167 , Abcam; Cambridge, England
Integrin αV	Anti- Integrin αV antibody produced in rabbit, polyklonal	Kat. HPA004856 ,

		Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Buchs, Schweiz
L1CAM	Maus monoklonal, anti-Human, Klon L1-11A	Kat. S3022 , Dako Agilent Technologies; Kalifornien, USA
Mesothelin	Polyclonal Rabbit anti-Mouse MSLN/ Mesothelin Antibody	Kat. LS-C407883 , LSBio; Seattle, USA
N-Cadherin	Rabbit polyclonal to N Cadherin, IgG	Kat. Ab18203 , Abcam; Cambridge, England
Vimentin	Anti- Vimentin, Mouse monoklonal	Kat. M7020 , Dako Agilent Technologies; Kalifornien, USA

3.4.2 Primärantikörper Isotypkontrolle

Tabelle 4: Primärantikörper Isotypkontrolle

Antikörper	Katalognummer und Hersteller
Mouse IgG (Immunglobin G) 2b, monoklonal	Kat. X0944 Agilent Dako, Kalifornien, USA
Mouse IgG1	Kat.02-6100 Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Mouse IgG1, monoklonal	Kat. X0931 Dako Agilent Technologies; Kalifornien, USA
Mouse IgG2a, monoklonal	Kat. X0943 Dako Agilent Technologies; Kalifornien, USA
Rabbit IgG1, polyklonal	Kat. Ab37415 Abcam; Cambridge, England
Rabbit Immuglobin Fraktion	Kat. X0903 Dako Agilent Technologies; Kalifornien, USA

3.4.3 Sekundärantikörper

Tabelle 5: Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
Goat anti mouse	Kat. E0433 Dako Agilent Technologies; Kalifornien, USA
Rabbit anti Rat, polyklonal	Kat. 312-065-048 Jackson ImmunoResearch; Cambridge, England
Swine anti rabbit Immunglobins-Biotin F(ab)'2	Kat. E0353 Dako Agilent Technologies; Kalifornien, USA

3.5 Lösungen, Enzyme, Färbemittel, Chemikalien

Tabelle 6: Lösungen, Enzyme, Färbemittel, Chemikalien

Substanz	Firma
ABC- AP Kit- Alkaline Phosphatase Standart AK- 5000	Vector Laboratories Inc.; Burlingame, USA
Antikörper Diluent	Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland
Hämalaun (Mayers Hämalaunlösung)	Merck; Darmstadt, Deutschland
Liquid Permanant Red Chromogen	Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland
Salzsäure, HCl 2	Merck; Darmstadt, Deutschland
Target Retrieval Solution 10 x Concentrate	Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland
Tween®20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland
Xylolersatz Medium	DiaTec GmbH; Hallstadt, Deutschland
Eindeckmittel, Eukitt	O. Kindler GmbH; Freiburg, Deutschland
Permanent Red	Dako, Kalifornien, USA
Ethanol 96 %	Chemsolute; Renningen, Deutschland
Ethanol 99 %	Chemsolute; Renningen, Deutschland
Salzsäure, HCl 2	Merck; Darmstadt, Deutschland
Eosin (Erythrosin B)	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland

Primer (Alu-PCR)	Eurofins Genomics; Ebersberg, Deutschland
Protease (Proteinase, bakteriell, Type XXIV)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland
NaCl	J. T Baker; Deventer, Niederlande
HCL 2N	Chemsolute; Renningen, Deutschland
Xylol	DiaTec, Bamberg, Deutschland
Ethanol 70%	selbst angesetzt
Ethanol 50%	Selbst angesetzt
Ethanol absolut	Chemsolute; Renningen, Deutschland
Target Retrieval Solution (10x) pH 6,0 (S1699)	Dako, Kalifornien, USA
Permanent AP Red Kit	Zytomed Systems; Berlin, Deutschland
Fast Enzyme	Kat. ZUC059-015, Zytomed; Berlin, Deutschland
EDTA Puffer (pH 8,0)	Kat. ED2SS Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg, Deutschland
Target Retrieval Solution 10x pH 9 (S2367)	Dako, Kalifornien, USA

Tris Buffer Saline (TBS) pH 7,6 Zusammensetzung:

- 60,57 g Trizma Base
- 87,09 g NaCl
- 200 ml HCL 2N
- 9,8l Aqua Dest

Tris Buffered Saline + Tween 20 (TBS-T) Zusammensetzung:

- 2000 ml TBS Ansatz
- 2 ml Tween®20

Citratpuffer (pH 6) Zusammensetzung:

Ansatz 2000 ml, 2000 ml aqua dest. + 4,2028 g Citronensäure Monohydrat + 10 ml 10 N NaOH (bis der pH- Wert erreicht ist)

Dako Real Immunhistochemie Detektionssystem K 5005:

Flasche A: Link, biotynilierte Sekundärantikörper

Flasche B: Streptavidin alkalische Phosphaatase (ABC-AP)

Flasche C: Chromogen Red 1

Flasche D: Chromogen Red 2

Flasche E: Chromogen Red 3

Flasche F: AP Substrat Buffer

Flasche G: Levamisole

Für die Mischung von 10 ml Chromogen Red:

1 Tropfen Levamisol (Flasche G) + 750 µl von Flasche F, jeweils 30 µl aus Flasche C, D und E.

3.6 ALU-PCR Chemikalien

Tabelle 7: ALU-PCR Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
PeqGOLD Blood&Tissue DNA Mini Kit	Kat. 13-3396-02 VWR International GmbH; Erlangen, Deutschland
Forward Alu Primer: Sequenz 5' → 3' TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA	BIOTECH AG, Ebersberg, Deutschland
Reverse Alu Primer: Sequenz 5' → 3' GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT	BIOTECH AG, Ebersberg, Deutschland
PCR Kit - LightCycler FastStart SYBR Green I Master Mix	Kat. 04707516001 Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany

3.7 Software

AxioVision Rel. 4.7.2: Carl Zeiss
LightCycler® 480 Software Version 1.5.0 SP3
ZEN 3.5 (blue Edition)
Microsoft Excel® für Mac Version 16.54

3.8 Tierversuch

In dieser Arbeit wurden insgesamt 30 Mäuse mit einem pfp und rag2 Knockout untersucht. Die vollständige Bezeichnung dieser Mauslinie lautet: B6.129S6-Pfptm1Clrk - Rag2tm1FwaN12. Pfp steht für „pore forming perforin“ und aufgrund einer

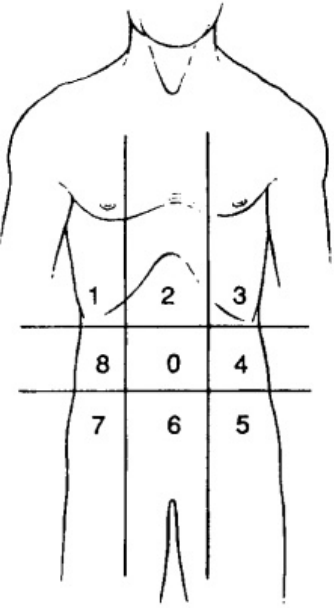
Keimbahnmutation im Perforin-Gen haben die NK-Zellen dieser Mäuse eine eingeschränkte Funktionalität (Walsh et al., 1994). Rag 2 steht für „Recombination Activation Gene 2“. Rag 2 ist erforderlich für die V(D)J (variable-,Diversitäts- und Verbindungsgene(Joining)) Rekombination, die für die Entwicklung reifer T- und B-Zellen notwendig ist (Shinkai et al., 1992). Die Mäuse weisen dadurch einen kombinierten Immundefekt auf. Das Tierexperiment wurde überwacht und genehmigt durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz (Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz; Billstraße 80, D-20539 Hamburg, Deutschland; Projektnummer G15/69).

Durch Punktion des linken Unterbauches wurde die Pankreaskarzinomzelllinie PaCa5061 (1×10^6 Zellen) in die Peritonealhöhle injiziert. Als Endpunkte wurde ein Überleben von 4, 7, 11, 14 und 41 Tagen nach der Injektion der Pankreaskarzinom-Zelllinie PaCa5061 festgelegt. Nach Erreichen des Endpunktes wurden nach Zufallsprinzip 6 Mäuse pro Endpunkt ausgewählt und mittels Ketamin und Sedaxylan anästhesiert. Nachdem der Zwischenzehenreflex erloschen war, erfolgte die perkutane kardiale Punktion zur Blutentnahme. Das Blut wurde in mit EDTA versetzten Röhrchen bei 4°C gelagert und später für die Bestimmung des humanen Anteils der DNA mittels ALU-PCR verwendet. Die Tiere wurden dann durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden für die peritoneale Lavage 5 ml 1xDPDS intraperitoneal injiziert. Die hieraus gewonnene Zellsuspension wurden dann in Formalin und Agar fixiert. Nun erfolgte die Entnahme des Knochenmarkes an der proximalen und distalen Femur- und Tibiakondyle durch Spülung der Röhrenknochen mit einer 1 mL NaCl-Lösung. Anschließend wurde der Situs eröffnet und die Lunge und die Leber entnommen. Zum Schluss wurde das Peritoneum für die Histologie entnommen. Die Entnahme des Peritoneums erfolgte zum Schluss, um eine Streuung von Tumorzellen in andere Gewebe zu vermeiden. Das Peritoneum wurde nach der Entnahme nach dem Peritonealkarzinoseindex (peritoneal carcinomatosis index, PCI) (s. Abschnitt 3.9) untersucht und dann in Formalin fixiert. Die Gewebsentnahme wurde vollständig protokolliert und archiviert.

3.9 Peritonealkarzinoseindex (PCI)

Mittels des PCI wurden makroskopisch sichtbare Läsionen an der Oberfläche des Peritoneums anhand eines Scoringsystems unterteilt. Dafür wurde der nach Sugarbaker (1999) modifizierte PCI verwendet. Der intraperitoneale Raum wird dabei

in 9 Abschnitte unterteilt und pro Abschnitt werden 0 bis 3 Punkte vergeben. Null Punkte werden vergeben, wenn makroskopisch kein Tumor sichtbar ist (s. Abbildung 5). Bei einer Läsionsgröße von $\leq 0,5$ cm wird ein Punkt vergeben. Bei einer Läsionsgröße ≤ 5 cm, 2 Punkte und bei einer Läsionsgröße ab 5 cm werden 3 Punkte vergeben. Damit liegt die maximal erreichbare Punktzahl bei 27 (Sugarbaker, 1999). Für eine visuell akkuratere Einteilung wurde das Scoringssystem angepasst und ein Punkt vergeben, wenn die Tumorgröße bei unter 1 cm lag. 2 Punkte bei einer Tumorgröße zwischen 1 und 3 cm. 3 Punkte bei einer Tumorgröße über 3 cm.



<u>Punkte/Score</u>	<u>Tumorgröße</u>
0	Makroskopisch kein Tumor sichtbar
1	< 1cm
2	1 – 3 cm
3	> 3cm

Abbildung 5: Darstellung der Aufteilung des intraoperativen Raumes und des Punktesystems anhand der Tumorgröße modifiziert nach (Sugarbaker, 1999)

3.10 Einbettung der Gewebe in Paraffin

Zur Erstellung von Paraffinschnitten ist es notwendig, dass aus den Geweben vorher Paraffinblöcke erstellt werden. Dazu erfolgte zunächst durch einen automatisierten Prozess am Gewebeautomaten Leica TP 1020 eine Entwässerung durch eine aufsteigende Isopropanol Reihe. Die Gewebe wurden danach mit Paraffin durchtränkt, so dass schnittfertige Paraffin Gewebelöcke hergestellt wurden.

3.11 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke wurden durch das Schlittenmikrotom zu 4 μ m dicken Scheiben geschnitten. Diese wurden dann durch einen Pinsel aufgefangen und in ein mit kaltem

und destilliertem Wasser gefülltem Becken überführt. Anschließend erfolgte die Überführung in ein auf 40° erhitztes, mit destilliertem Wasser gefülltes Wasserbad. Die Schnitte wurden dann nach dortiger Faltenentfernung auf einen mit silanbeschichteten Objektträger gezogen und auf eine beheizte Wärmeplatte für 30 Minuten bis 1 h zum Trocknen hingelegt. In einem Wärmeschrank erfolgte dann die Lagerung der Objektträger bei 37° zur besseren Haftung und Trocknung der angefertigten Schnitte. Nach Trocknung über Nacht wurden die Gewebeschnitte bis zur weiteren Verwendung auf Raumtemperatur gelagert. Pro Gewebeblock wurden 50 Schnitte erstellt. Konnten keine Tumorzellen durch die in 3.16 beschriebene Methode detektiert werden, wurden 50 Nachschnitte von dem Gewebeblock angefertigt, die anschließend erneut auf das Vorkommen von Tumorzellen hin untersucht wurden. Wenn erneut keine Tumorzellen detektiert werden konnten, wurde der Schritt ein letztes Mal wiederholt. Dadurch wurde die Wahrscheinlichkeit reduziert, nur minimal metastatische Läsionen des Peritoneums zu übersehen.

3.12 Entparaffinierung und Dehydrierung

Vor jeder hier aufgeführten Färbung wurden, sofern nicht anders beschrieben, alle Gewebeschnitte in einer auf - und absteigenden Alkoholreihe automatisiert durch den HE-Färbeautomaten nach den folgenden Schritten entparaffiniert und schließlich dehydriert:

Absteigende Alkoholreihe (entparaffinieren):

Xylol: 5 min

Xylol: 5 min

Ethanol absolut: 3 min

Ethanol absolut: 5 min

Ethanol 96%: 5 min

Ethanol 70%: 5 min

Ethanol 50%: 5 min

Aufsteigende Alkoholreihe (entwässern):

Ethanol 70%: 15 sec

Ethanol 96%: 30 sec

Ethanol 96%: 30 sec

Ethanol absolut: 5 min

Ethanol absolut: 5 min

Xylol: 5 min

Xylol: 5 min

Xylol: 5 min

3.13 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Nach der Entparaffinierung der Gewebeschnitte erfolgte im H.E.- Färbeautomaten für die Hämatoxylin-Eosin Färbung eine Spülung mit Aqua dest. für 2min und anschließend eine erneute Spülung mit Aquadest für 2 min. Danach erfolgt die Färbung mit Hämalaun für 3 min und anschließend eine erneute Spülung mit Aquadest für 2 min. Die Gewebeschnitte wurden dann 5 min in Leitungswasser gespült und mit Eosin für 3 min gefärbt. Es erfolgte danach eine erneute Spülung mit Aquadest für 30 Sekunden. Nach den Angaben in Abschnitt 3.12 erfolgte dann die Entwässerung und schließlich wurden die Gewebeschnitte mit Eukitt und Deckgläsern eingedeckelt. Es erfolgte dann eine Trocknung der Schnitte über Nacht unter der Abzugshaube.

3.14 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine immunbasierte Färbetechnik, bei der mithilfe von Antikörpern die Expression spezifischer Antigene mithilfe einer Farbreaktion sichtbar gemacht wird. Die in dieser Arbeit verwendete IHC-Methode basiert auf der indirekten IHC. Das heißt, dass das Signal durch Kopplung eines an den Primärantikörper bindenden Sekundärantikörpers verstärkt wird. Von den angefertigten Schnitten des peritonealen Gewebes und der Zellen in Agar wurde ein Exemplar pro Versuchstier immunhistochemisch auf das Vorkommen des jeweiligen Antigens hin untersucht. Dadurch ergeben sich bei 30 Versuchstieren insgesamt 30 Exemplare pro immunhistochemischer Färbung des jeweiligen Gewebeblockes. Zusätzlich wurde vom untersuchten Gewebe eine ISO Negativkontrolle angefertigt, um unspezifische Färbungen und Hintergrundsignale zu detektieren. Zur Validierung der ordnungsgemäßen Durchführung der IHC wurde gleichzeitig eine Positiv- und eine Negativkontrolle eines Gewebes, welches nachweislich das erwartete Antigen exprimiert, mitgefärbt. Die Auswahl dieser Gewebeproben erfolgte nach Laborprotokoll.

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten, sofern nicht anders beschrieben, in folgender Reihenfolge ab:

1. Entparaffinierung der Schnitte (nach Abschnitt 3.12)
2. Vorbehandlung
3. Spülen mit TBS(2x 5 min) und TBS-T (5min)
4. (Eventuell Blockieren notwendig, um unspezifische Bindungen zu reduzieren)
5. Zugabe des Primärantikörpers und Antikörper der Isotypkontrolle
6. Spülen mit TBS und TBS-T
7. Zugabe eines markierten Sekundärantikörpers
8. Spülen mit TBS(2x 5 min) und TBS-T (5min)
9. Zugabe von Enzym, der an den Sekundärantikörper bindet
10. Spülen mit TBS(2x 5 min) und TBS-T (5min)
11. Zugabe Chromogen (Permanent Red)
12. Spülen mit Leitungswasser (3min) und Aquadest. (1-2min)
13. Gegenfärben mit Hämalun
14. Spülen mit Leitungswasser (5min) und Aquadest. (1-2min)
15. Entwässern (nach Abschnitt 3.12) und Einbetten mit Eukitt

Für die Schritte 4, 5, 7, 9 und 11 wurden jeweils 150 µl der jeweiligen Lösung auf die Gewebeschnitte pipettiert, die dann für eine bestimmte Zeit in einer Feuchtkammer mit der zugegebenen Lösung bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Spülung der Gewebeschnitte in Schritt 6 erfolgt getrennt für die ISO-Kontrollen und für die Gewebeschnitte. Die Sekundärantikörper binden an das Fc Fragment des Primärantikörpers. Der Sekundärantikörper ist biotinyliert. Dadurch kann der ABC-AP Komplex, welcher in Schritt 9 hinzugegeben wird, an den Sekundärantikörper binden. ABC-AP ist eine Avidin-Biotin-Komplex, welches an eine alkalische Phosphatase (AP) konjugiert ist. Avidin und Biotin gehen eine Bindung ein, so dass der hinzugegebene ABC-AP Komplex über freie Bindungsstellen des Avidins an Biotingruppen des Sekundärantikörper binden kann. Dadurch kommt es zu einer weiteren Signalverstärkung, bei der mehrere Enzymkomplexe angekoppelt werden. Der ABC-AP Komplex wurde 30 min vorher aus einem Tropfen Avidin und einem Tropfen Biotin und 2,5 ml TBS nach Herstellerangaben angesetzt. Als Chromogen für das Enzym AP wurde Permanent Red verwendet. Durch den Umsatz von Permanent Red entwickelt sich ein roter Niederschlag. Die Reaktion wird durch Spülung mit Leitungswasser (Schritt 12) gestoppt. Die Intensität der Farbreaktion ist dabei in grob zu der Menge des Antigens proportional. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgt durch Inkubation mit Hämalun.

3.15 Immunhistochemische Färbungen der humanen Tumorzellen

3.15.1 CD44

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für CD44 wurde mit Citratpuffer durchgeführt. Dafür wurde Citratpuffer im Wasserbad auf 87° vorgewärmt. Nach dem Erreichen der Temperatur wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten im Wasserbad mit Citratpuffer bei 85° Grad vorbehandelt. Nach der Spülung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper CD44 (1:100 in AK (Antikörper) Diluent). Der verwendete CD44 Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der humanes CD44 als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit dem Mouse IgG2b Antikörper (1:40 in AK Diluent) für eine Stunde. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper Goat anti Mouse (in TBS 1:200) zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach erneuter Spülung mit ABC-AP wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit permanent Red erfolgte für 18 Minuten. Als Kontrolle wurden Gewebeschnitte eines HT-29 (humane Kolonadenokarzinom-Zelllinie-29) Gewebepellets verwendet.

3.15.2 E-Cadherin

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für E-Cadherin erfolgte durch Inkubation der Schnitte in einer Target Retrieval Solution (S1699) im Dampfkochtopf bei 121°C für 10 Minuten. Nach der Spülung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper E-Cadherin (1:400 in AK Diluent) für 30 Minuten. Der verwendete E-Cadherin Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der humanes E-Cadherin als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit dem Mouse IgG1-Kat.02-6100 (1:20.000) für 30 Minuten. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper (Flasche A) zugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Nach erneuter Spülung wurden die Gewebeschnitte mit ABC-AP (Flasche B) für 15 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit Chromogen Red erfolgte für 20 Minuten. Als Kontrolle wurden Gewebeschnitte eines Duodenums verwendet.

3.15.3 N-Cadherin

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für erfolgte durch Inkubation der Schnitte in mit einem Fast Enzyme für 5 Minuten. Die Gewebeschnitte wurden dafür vorher 2 mal für 5 Minuten mit TBS-T gespült und anschließend einmal mit TBS. Nach Inkubation mit dem Fast Enzyme wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten mit Leitungswasser und dann wieder 2 mal für 5 Minuten mit TBS-T gespült und anschließend einmal mit TBS. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper N-Cadherin (1:50 in AK Diluent) für 30 Minuten. Der verwendete Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper, der humanes N-Cadherin als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit einem Rabbit poly. IgG AK (1:625 in AK Diluent) für 30 Minuten. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper (Flasche A) zugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Nach erneuter Spülung wurden die Gewebeschnitte mit ABC-AP (Flasche B) für 15 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit Chromogen Red erfolgte für 20 Minuten. Als Kontrolle wurden Gewebeschnitte eines Herzens verwendet.

3.15.4 Integrin α V

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für Integrin α V erfolgte durch Inkubation der Schnitte in Citratpuffer im Dampfkochtopf bei 125°C für 5 Minuten. Nach der Spülung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper Integrin α V (1:400 in AK Diluent) für 30 Minuten. Der verwendete Integrin α V Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper, der humanes Integrin α V als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit dem Rabbit polyklonal IgG AK (1:20.000 in AK Diluent) für 30 Minuten. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper (Flasche A) zugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Nach erneuter Spülung wurden die Gewebeschnitte mit ABC-AP (Flasche B) für 15 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit Chromogen Red erfolgte für 20 Minuten. Als Kontrolle wurden Gewebeschnitte einer Plazenta verwendet.

3.15.5 Integrin β 6

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für Integrin β 6 erfolgte durch Inkubation der Schnitte in einer Target Retrieval Solution (S1699) im Dampfkochtopf bei 125°C für 4 Minuten. Nach der Spülung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper Integrin β 6(1:100 in AK Diluent) für eine Stunde. Der verwendete

Integrin $\beta 6$ Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper, der humanes Integrin $\beta 6$ als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit dem Rabbit poly. IgG1 Antikörper (1:2500 in AK Diluent) für eine Stunde. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper Swine alpha Rabbit (1:200 in TBS) zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ABC-AP angesetzt und die Gewebeschnitte nach erneuter Spülung mit ABC-AP für 30 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit permanent Red erfolgte für 20 Minuten. Als Kontrolle dienten Gewebeschnitte eines Duodenums.

3.15.6 Integrin $\beta 1$

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für Integrin $\beta 1$ erfolgte durch Inkubation der Schnitte mittels Fast-Enzyme für 5 Minuten. Nach der Spülung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper Integrin $\beta 1$ (1:100 in AK Diluent) für eine Stunde. Der verwendete Integrin $\beta 1$ Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der humanes Integrin $\beta 1$ als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit dem Mouse IgG1Antikörper - Kat. X0931 (1:50 in AK Diluent) für eine Stunde. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper Goat alpha mouse (in TBS 1:200) zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ABC-AP angesetzt und die Gewebeschnitte nach erneuter Spülung mit ABC-AP für 30 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit permanent Red erfolgte für 20 Minuten. Als Kontrolle dienten Gewebeschnitte einer Haut.

3.15.7 Integrin $\beta 4$

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für Integrin $\beta 4$ erfolgte durch Inkubation der Schnitte in einer Target Retrieval Solution (S1699) im Dampfkochtopf bei 121°C für 10 Minuten. Nach der Spülung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper Integrin $\beta 4$ (1:25 in AK Diluent) für eine Stunde. Der verwendete Integrin $\beta 4$ Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der humanes Integrin $\beta 4$ als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit dem Rabbit IgG 2b Antikörper (1:20 in AK Diluent) für eine Stunde. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper Rabbit alpha Rat (1:100 in TBS) zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ABC-AP angesetzt und die Gewebeschnitte nach erneuter Spülung mit ABC-AP für 30 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15

(Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit permanent Red erfolgte für 20 Minuten. Als Kontrolle dienten Gewebeschnitte einer Plazenta.

3.15.8 Integrin $\beta 3$

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für Integrin $\beta 3$ erfolgte durch Inkubation der Schnitte in einer Target Retrieval Solution (S1699) im Wasserbad bei 100°C für 20 Minuten. Nach der Spülung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper Integrin $\beta 3$ (1:50 in AK Diluent) für 30 Minuten. Der verwendete Integrin $\beta 3$ Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der humanes Integrin $\beta 3$ als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit dem Mouse IgG1 Antikörper- Kat. X0931 (1:75 in AK Diluent) für 30 Minuten. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper (Flasche A) zugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Nach erneuter Spülung wurden die Gewebeschnitte mit ABC-AP (Flasche B) für 15 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit Chromogen Red erfolgte für 13,5 Minuten. Als Kontrolle wurden Gewebeschnitte einer Tonsille verwendet.

3.15.9 CEACAM7

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für CEACAM7 erfolgte durch Inkubation der Schnitte in Citratpuffer im Wasserbad bei 99°C für 20 Minuten. Nach der Spülung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper CEACAM7 (1:200 in AK Diluent) für 30 Minuten. Der verwendete CEACAM7 Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper, der humanes CEACAM7 als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit dem Rabbit poly. Antikörper (1:2000 in AK Diluent) für 30 Minuten. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper (Flasche A) zugegeben und für 15 Minuten inkubiert. Nach erneuter Spülung wurden die Gewebeschnitte mit ABC-AP (Flasche B) für 15 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit Chromogen Red erfolgte für 20 Minuten. Als Kontrolle wurden Gewebeschnitte eines Pankreasorgans verwendet.

3.15.10 L1CAM

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für L1CAM erfolgte durch Inkubation der Schnitte in EDTA Puffer in der Mikrowelle bei 800 Watt, bis der Puffer beginnt zu kochen. Danach wurde der EDTA Puffer erneut bei 560 Watt dreimal für 5

Minuten behandelt. Danach erfolgte die Abkühlung, Spülung und Inkubation mit dem Primärantikörper L1CAM (1:1000 in AK Diluent) für eine Stunde. Der verwendete L1-CAM Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der humanes L1- CAM als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit einem Mouse IgG1- Kat. X0931 Antikörper (1:228 in AK Diluent) für eine Stunde. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper Goat alpha mouse (1:200 in TBS) zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ABC-AP angesetzt und die Gewebeschnitte nach erneuter Spülung mit ABC-AP für 30 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit permanent Red erfolgte für 18 Minuten. Als Kontrolle dienten Gewebeschnitte einer Niere.

3.15.11 EpCAM (CD326)

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für EpCAM erfolgte durch Inkubation der Schnitte in einer Target Retrieval Solution (S1699) im Dampfkochtopf bei 121° C für 10 Minuten. Danach erfolgte die Abkühlung, Spülung und Inkubation mit dem Primärantikörper EpCAM (1:600 in AK Diluent) für eine Stunde. Der verwendete EpCAM Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der humanes EpCAM als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit einem Mouse IgG1- Kat. X0931 Antikörper (1:120 in AK Diluent) für eine Stunde. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper Goat alpha mouse (1:200 in TBS) zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ABC-AP angesetzt und die Gewebeschnitte nach erneuter Spülung mit ABC-AP für 30 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit permanent Red erfolgte für 15 Minuten. Als Kontrolle dienten Gewebeschnitte eines Colons.

3.15.12 HSP60

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für HSP 60 erfolgte durch Inkubation der Schnitte in einer Target Retrieval Solution (S1699) im Dampfkochtopf bei 100° C für 20 Minuten. Danach erfolgte die Abkühlung, Spülung und Inkubation mit dem Primärantikörper HSP60 (1:400 in AK Diluent) für eine Stunde. Der verwendete HSP 60 Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper, der humanes HSP60 als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit einem Rabbit poly. IgG1 Antikörper (1:2000 in AK Diluent) für eine Stunde. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper Swine alpha rabbit (1:200 in TBS) zugegeben und für 30 Minuten

inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ABC-AP angesetzt und die Gewebeschnitte nach erneuter Spülung mit ABC-AP für 30 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit permanent Red erfolgte für 10 Minuten. Als Kontrolle dienten Gewebeschnitte einer Niere.

3.15.13 Vimentin

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für Vimentin erfolgte durch Inkubation der Schnitte im Wasserbad bei 85°C für 20 Minuten mit einer Target Retrieval Solution (S2367). Danach erfolgte die Abkühlung, Spülung und Inkubation mit dem Primärantikörper Vimentin (1:232 in AK Diluent) für eine Stunde. Der verwendete Vimentin Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der humanes Vimentin als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit einem mouse IgG2a Antikörper (1:375 in AK Diluent) für eine Stunde. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper Goat alpha mouse (1:200 in TBS) zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ABC-AP angesetzt und die Gewebeschnitte nach erneuter Spülung mit ABC-AP für 30 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit permanent Red erfolgte für 20 Minuten. Als Kontrolle dienten Gewebeschnitte einer Nasenmuschel.

3.15.14 ICAM-1 (CD54)

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für ICAM-1 erfolgte durch Inkubation der Schnitte mit S1699 in der Mikrowelle bei 1000 W für 3 Minuten und anschließend für 2 mal 7 Minuten bei 350 W. Danach erfolgte die Abkühlung, Spülung und Inkubation mit dem Primärantikörper ICAM-1 (1:500 in AK Diluent) für eine Stunde. Der verwendete ICAM-1 Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der humanes und murines ICAM-1 als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit einem mouse IgG2a Antikörper (1:250 in AK Diluent) für eine Stunde. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper goat alpha mouse (1:200 in TBS) zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ABC-AP angesetzt und die Gewebeschnitte nach erneuter Spülung mit ABC-AP für 30 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit permanent Red erfolgte für 20 Minuten. Als Kontrolle dienten Gewebeschnitte einer Tonsille.

3.15.15 Mesothelin

Die Vorbehandlung der immunhistochemischen Färbung für Mesothelin erfolgte durch Inkubation der Schnitte mit Citratpuffer (pH6) im Dampfkochtopf für 20 Minuten bei 100°C. Danach erfolgte die Abkühlung, Spülung und Inkubation mit dem Primärantikörper Mesothelin (1:250 in AK Diluent) für eine Stunde. Der verwendete Mesothelin Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper, der murines Mesothelin als Antigen erkennt. Eine Inkubation der Isokontrollen erfolgte mit einem Rabbit neg. AK (1:9500 in AK Diluent) für eine Stunde. Nach erneuter Spülung wurde der Sekundärantikörper Swine alpha Rabbit (1:200 in TBS) zugegeben und für 30 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ABC-AP angesetzt und die Gewebeschnitte nach erneuter Spülung mit ABC-AP für 30 Minuten inkubiert und die Schritte 10 bis 15 (Abschnittes 3.14) durchgeführt. Die Färbung mit permanent Red erfolgte für 10 Minuten. Als Kontrolle dienten Gewebeschnitte einer Mauslunge.

3.16 Mikroskopische Detektion von Tumorzellen

Pro Präparat wurden jeweils 50 Paraffinschnitte angefertigt. Um mikroskopisch Tumorzellen zu detektieren, wurde der erste und letzte Schnitt einer Schnittserie mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Damit keine Tumorzellen übersehen und um zu bestätigen, dass Läsionen korrekt als Tumorzellen identifiziert wurden, erfolgte zusätzlich eine immunhistochemische Färbung gegen humanes HSP 60. HSP 60 ist ein Heat Shock Protein, welches ubiquitär in Mitochondrien exprimiert wird (Merendino et al., 2010). Folglich müssen Zellen, die HSP 60 exprimieren, humanen Ursprungs sein und können dadurch als Tumorzellen identifiziert werden. Die angefertigten Färbungen wurden unter dem Mikroskop betrachtet. Konnten keine Tumorzellen identifiziert werden, wurden erneut 50 Paraffinschnitte einer anderen Ebene des jeweiligen Gewebes angefertigt. Dieser Schritt wurde noch ein weiteres Mal wiederholt, wenn in den Nachschnitten ebenfalls keine peritonealen Tumorzellen gefunden wurden. Konnten weiterhin keine Tumorzellen detektiert werden, wurde das Vorkommen von Tumorzellen als negativ (=0) ausgewertet.

3.17 Messung der Tumorgroße

Repräsentativ für die Tumorgroße wird die durchschnittliche Größe der Tumorfläche der Tumorzellverbände bestimmt. Die in Schritt 3.16 in der H.E Färbung verwendeten Gewebeschnitte (2 pro Versuchstier) wurden für die Messung verwendet. Nachdem mithilfe der Kamera des Axio Scan.Z1 Bilder des Präparates aufgenommen wurden,

konnte mithilfe des Kontur (Spline) Tools des Zen 3.5 Programms die Kontur der Tumorzellverbände markiert und die Tumorfläche (in μm^2) ermittelt werden. Dieser Schritt wurde für alle Tumorzellverbände, die in einem Präparat vorzufinden sind, durchgeführt. Die Fläche der Tumorzellverbände eines Präparates wurde miteinander addiert und durch die Anzahl der Tumorzellverbände geteilt. Dadurch wurde die durchschnittliche Größe der Tumorzellfläche eines Gewebeschnittes ermittelt. Dadurch hat man einmal die durchschnittliche Fläche der Tumorzellverbände eines Gewebeschnittes vom Anfang und vom Ende einer Schnittserie erhalten. Diese Werte wurden miteinander addiert und durch zwei geteilt und stellten die durchschnittliche Tumorgröße für das jeweilige Versuchstier dar.

Die Werte wurden für die Ermittlung der Mittel- und Medianwerte der Tumorgröße pro Mauskoorte mit derselben Überlebenszeit verwendet.

3.18 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Am Mikroskop (Axioplan 2) wurden die Schnitte jeweils unter 20-facher Vergrößerung betrachtet. Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der humanen Tumorzellen des Peritoneums wurden alle Tumorzellverbände des gesamten Präparates untersucht und mit der Positivkontrolle verglichen. Die Positivkontrolle diente dabei als Referenz und stimmte die Intensität der Probe mit der Positivkontrolle überein, wurde die Intensität mit einer starken Expression (+++/3) für das jeweilige Antigen gleichgesetzt. Stimmte die Intensität der Färbung mit der Negativkontrolle überein, wurde die Expression des Antigens als negativ (-/0) ausgewertet. Eine sehr schwache Intensität der Färbung (<0,5) wurde ebenfalls als negativ gewertet. Die Bestimmung des Levels der Expression des Antigens erfolgte damit nach der Intensität der immunhistochemischen Färbungen, die von nicht vorhandenen (-/0), schwachen (+/1), mittelgradigen (++/2) bis starken (+++/3) Expression reichte.

Die immunhistochemische Färbung des Mesothels wurde danach ausgewertet, ob an der Anheftungs- beziehungsweise Invasionsstelle der Tumorzellverbände das Mesothel intakt oder unterbrochen ist. Ist das Mesothel an der Anheftungsstelle des Tumorzellverbandes intakt, wurde es als 0=Mesothel intakt gewertet. Ist das Mesothel an der Anheftungsstelle des TZV unterbrochen, wurde es mit 1 gewertet. Konnte kein Mesothel detektiert werden, wurde es mit 2=kein Mesothel an vorhanden, gewertet. Zur Kategorie zwei wurden alle Präparate gezählt, bei denen keine TZV beim Präparat

vorhanden sind (entsprechend lässt sich nicht auswerten, ob Mesothel an Anheftungsstelle der TZV intakt ist oder nicht) oder Präparate, bei denen gar keine Mesothelzellen detektiert werden konnten oder Präparate, wo das Mesothel nur spärlich in einigen wenigen Bereichen erhalten worden ist. Am ehesten ist dies durch die Präparationsmethode zustande gekommen, dass bei einigen Präparaten das Mesothel in einigen Bereichen nicht erhalten werden konnte. Präparate, denen die Zahl 2 zugeordnet worden ist, waren entsprechend nicht auswertbar in Bezug auf die Fragestellung, ob das Mesothel an der Anheftungsstelle der TZV intakt ist.

Die Zellen in Agar wurden danach ausgewertet, ob die sich in Suspension befindenden freien Tumorzellverbände das gesuchte Antigen exprimieren. Es wurde anschließend die Anzahl der Präparate pro Mauskoorte (gleiche Überlebenszeit), die eine positive Expression für das Antigen aufweisen, durch die Anzahl der Präparate der Mauskoorte geteilt, bei denen Tumorzellverbände vorhanden sind.

Die in dieser Arbeit eingefügten Bilder der Präparate wurden mit der Kamera des Axio Scan.Z1 aufgenommen und mit dem Zen 3.5 Programm bearbeitet.

3.19 Statistik

Es wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben angewendet, um zu berechnen, ob sich die Tumorgrößen zwischen den Gruppen mit unterschiedlicher Überlebensdauer signifikant voneinander unterscheiden. Dieser Test überprüft, inwiefern sich die zentralen Tendenzen unterscheiden. Als signifikant wird ein P-Wert $< 0,05$ gewertet. Dieser Test auch verwendet, um zu Überprüfung, ob die Anzahl der Tumorzellverbände signifikant voneinander unterscheidet und ob es signifikante Unterschiede bei der durch die Alu-PCR ermittelten Fernmetastasierung gibt.

3.20 Molekularbiologische Methoden

3.20.1 Extraktion genomischer DNA

Die Quantität der humanen DNA ist eine Richtgröße, mit der eine Aussage zur Fernmetastasierung des Pankreaskarzinoms der humanen Zelllinien PaCa 5061 getroffen werden kann. Dazu wird die Alu-PCR Methode verwendet, die spezifisch für humane DNA-Sequenzen ist. In einem vorherigen Schritt muss hierfür die genomische DNA extrahiert werden. Untersucht wird die Fernmetastasierung in die Lunge, der Leber, in das Knochenmark und die hämatogene Fernmetastasierung.

Die Extraktion der DNA erfolgt nach Herstellerangaben und unter Verwendung des PeqGOLD Blood&Tissue DNA Mini Kit.

Verwendet wurde dabei nach Homogenisierung im Tissue Lyser II mit 400 µl Lysis Buffer TL, einer Stahlkugel und bei einer Frequenz von 300/s für 4 Minuten die zuvor nach Abschnitt 3.8 kryokonservierte linke Lungenhälfte und linker Leberlappen. 200 µl dieser Suspension wurden im nächsten Schritt für die Lysierung verwendet. Für die Lysierung des Blutes wurden 250 µl EDTA-Vollblut verwendet. Das Knochenmark wurde für die Lysierung vorher zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die verbliebenen Zellpellets mit 200 µl Lysis Buffer resuspendiert.

Die Lysierung erfolgte mit jeweils 25 µl Proteinkinase K. Hierdurch sollen Nukleinsäuren freigesetzt und Proteine denaturiert werden. Bei dem Lungen- und Lebergewebe ist vor der Lysierung eine Homogenisation der Gewebe erforderlich.

Im nächsten Schritt kann die freigesetzte DNA durch eine Silikamembran an eine Säulenmatrix binden. Nach mehreren Waschschritten der Säule erfolgt dann die Isolierung und Mobilisation der DNA durch Zugabe von Elutionsbuffer in die Säulenmatrix. Die Säulenmatrix wird mit diesem Elutionsbuffer für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann für eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wird nochmals auf die Säulenmatrix gegeben und der vorherige Schritt wiederholt. Anschließend erhält man Elutionsbuffer mit genomischer DNA, die bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde.

3.20.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Nach dem obigen Schritt erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration der Proben. Dafür wurden jeweils 2 µL der jeweiligen Probe in die Messkammer des NanoDrop-Spektrophotometer pipettiert. Die Analyse der Konzentration der DNA in ng/µl erfolgte dann automatisch durch das Programm. Die Bestimmung wurde zweifach durchgeführt und ein Mittelwert der Konzentration ermittelt. Anhand dieses Wertes wird berechnet, wie viel µl des AE-Buffer (Bestandteil des PeqGOLD Blood&Tissue DNA Mini Kit) hinzugegeben werden müssen, damit die Konzentration der DNA der Proben einheitlich auf 30 ng/ µl gebracht wird.

3.20.3 ALU-PCR

In der ALU-PCR werden durch eine real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) humane Alu-Sequenzen amplifiziert. Diese Technik basiert auf Primern, die im voraus

entwickelt wurden und spezifisch für humane Sequenzen sind und nur an diese binden (Nehmann et al., 2010). Hierdurch kann Rückschluss auf humane und damit die metastatische Zelllast in murinem Gewebe gezogen werden. Die Primer für die Alu-Sequenzen wurden im Vorhinein entwickelt.

Für die Alu-PCR wurden in die Kammern einer 96-Well Palette zuerst jeweils 2 µl der standardisierten DNA-Proben pipettiert und anschließend 8 µl der Mastermix-Komponente hinzupipettiert, die sich wie folgt zusammensetzt:

Tabelle 8: Mastermix Komponenten ALU-PCR

Mastermix-Komponenten	Volumen in µl
ddH ₂ O	2,6 µl
Alu forward Primer (100pmol/ µl)	0,2 µl
Alu reverse Primer (100pmol/ µl)	0,2 µl
SYBR Green Mix	5,0 µl

Der SYBR Green Mix enthält eine Taq-DNA-Polymerase, Taq-PCR-Puffer, Desoxynukleotide (dNTPs) und MgCl₂. Die Taq-DNA-Polymerase wird aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und ist hitzestabil. Der Taq-PCR-Puffer enthält die notwendigen pH- und Ionenbedingungen für die PCR- Reaktion. Das MgCl₂ ist ein Kofaktor, der die Aktivität der DNA-Polymerase erhöht. Die dNTPs sind Bausteine für die Synthese neuer DNA. Zusätzlich wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zugefügt, um die Amplifikation der DNA in Echtzeit zu überwachen. Die Menge der synthetisierten DNA steht dabei in direktem Verhältnis zur Zunahme des Signals nach jedem Zyklus. Gleichzeitig läuft immer die PCR einer Standardreihe und Negativkontrolle mit. Die Standardreihe dient dazu, um anhand des Signals Rückschluss auf die Anzahl an metastatischen Tumorzellen schließen zu können. Dafür wurde die DNA aus der PaCa5061 Zelllinie isoliert und zusammen mit Background Kontroll- DNA des entsprechenden Gewebes von gesunden Mäusen des gleichen Mausstammes, nach einem definierten Pipettierschema in 10er Verdünnungsschritten pipettiert, so dass man eine Standardreihe mit einer definierten und bekannten Anzahl an humanen Zellen (2000 bis 0,002) in murinem Background erhält. Anhand dessen wird eine Standardkurve erstellt, mit der die Anzahl an disseminierten Tumorzellen im jeweiligen Gewebe berechnet werden kann.

Die Analyse aller Proben erfolgte in Dreifachbestimmung. Die 96-well Platte wurde nach dem Pipettieren aller Proben mit einer Folie verschlossen und für 10-15 Sekunden bei 2000g in der Zentrifuge anzentrifugiert.

Im Anschluss erfolgte die Alu-PCR im Gerät Light Cycler 480 nach Protokoll in Tabelle 9 und mithilfe der entsprechenden Software erfolgte die Auswertung mittels des Crossing point (Cp-)Wertes. Der Cp-Wert gibt an, nach wie vielen Zyklen zum ersten Mal eine signifikante Fluoreszenz detektiert werden kann, die über größer als die Hintergrundfluoreszenz ist. Je mehr DNA-Abschnitte vorhanden sind, desto schneller wird der Cp-Wert erreicht.

Tabelle 9: Protokoll des Light Cycler Programms für die Alu-PCR

Programm	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklus (n)
Vorinkubation	95	300	1
<u>Amplifikation</u>			40
- Denaturierung	- 95	- 10	
- Annealing	- 67	- 10	
- Elongation	- 72	- 10	
<u>Schmelzkurve</u>			1
- Denaturierung	- 95	- 5	
- Annealing	- 65	- 60	
- Melting	- 97	- kontinuierlich	
Abkühlung	40	30	1

4 Ergebnisse

4.1 Peritoneal Carcinomatosis Index für den Tierversuch der Mauslinie Pfp/Rag2

Nach der intraperitonealen Injektion von PaCa 5061 Zellen und dem Erreichen der im Vorfeld festgelegten Überlebenszeit wurden makroskopisch suspekte Läsionen des Peritoneums für jedes Tier anhand des Peritoneal Carcinomatosis Index (PCI) ausgewertet (s. Methoden 3.9).

Fasst man diese Ergebnisse des PCI für die einzelnen Mausgruppen nach dem Überleben in Tagen zusammen, (ein Score von > 0 für den PCI bedeutet also einen makroskopisch sichtbaren Tumor) konnte man eine Zunahme makroskopisch sichtbarer Tumore mit der Zunahme der Überlebenszeit beobachten. Bei der Gruppe mit einem Überleben von 4 Tagen konnten bei keiner der 6 Mäuse makroskopische Tumorkläsionen detektiert werden. Es ergab sich für diese Gruppe dementsprechend durchschnittlich ein PCI von 0.

In den Mausgruppen mit einem Überleben von 7 und 11 Tagen wies jeweils eine von 6 Mäusen makroskopisch eine Tumorkläsion mit einem PCI-Score von 1 auf. Der durchschnittliche Wert des PCI für diese beiden Gruppen lag dementsprechend bei 0,2. Nach einer Überlebenszeit von 14 Tagen wiesen 4 von 6 Mäusen sichtbare peritoneale Tumorkläsionen auf. Der PCI reichte hier von 0 bis 2 und für die Mauskohorte ergab sich damit ein durchschnittlicher PCI von 0,8.

Nach der im Vorfeld festgelegten Überlebenszeit von 41 Tagen waren bei allen 6 Mäusen peritoneale Tumorkläsionen sichtbar. Der minimal erreichte Wert für den PCI lag bei dieser Mauskohorte bei 10 und der maximale Wert bei 23. Der Durchschnittswert für diese Gruppe lag damit bei 16,7.

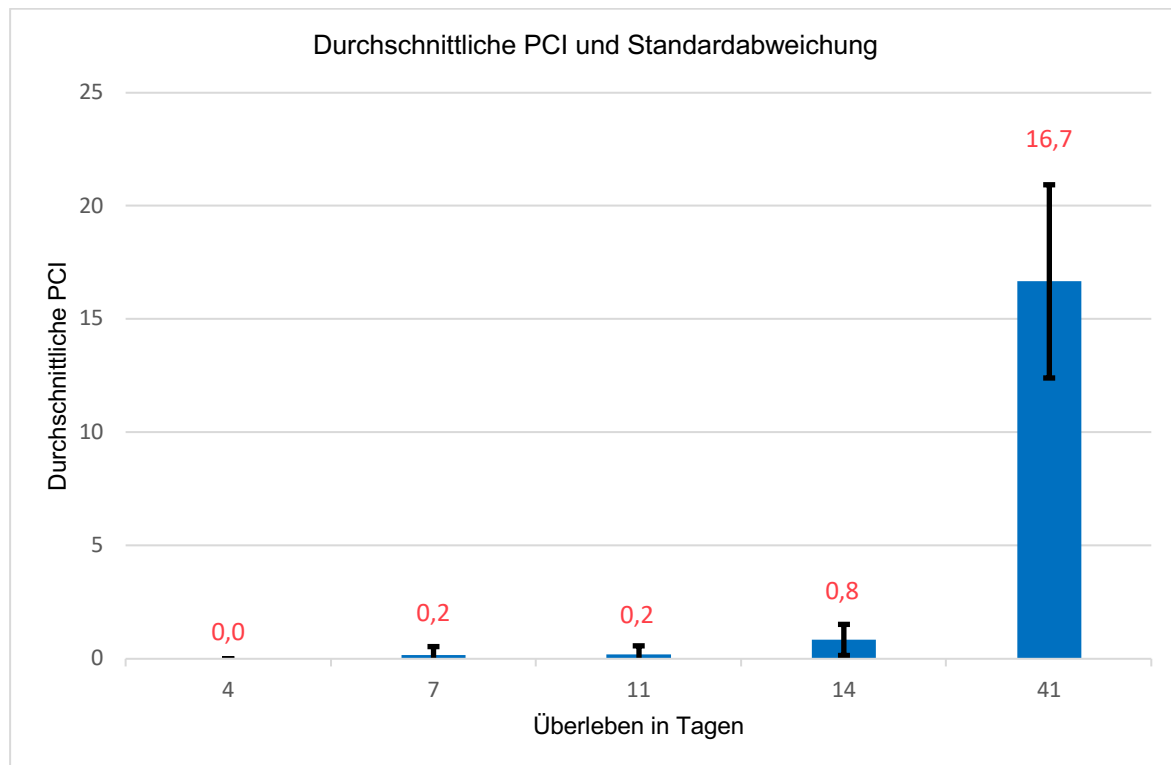


Abbildung 6: Säulendiagramm des durchschnittlichen PCI (y-Achse) mit Standardabweichung nach dem Überleben in Tagen (x-Achse). In Rot ist der Mittelwert des PCI für die jeweilige Überlebenszeit numerisch dargestellt. Der schwarze Balken repräsentiert die Standardabweichung.

Tabelle 10: Anteil an Mäusen mit derselben Überlebenszeit, deren PCI > 0 beträgt und Angabe des Anteils in Prozent

Überleben in Tagen	Makroskopisch Tumor sichtbar (PCI > 0)	Makroskopisch Tumor sichtbar in Prozent
4	0 von 6	0
7	1 von 6	16,6
11	1 von 6	16,6
14	4 von 6	66,6
41	6 von 6	100

4.2 Mikroskopische Detektierbarkeit der peritonealen Karzinose

In jeder Mauskohorte (eingeteilt nach dem Überleben in Tagen) konnten mikroskopisch Tumorzellen nachgewiesen werden. Bei der Mausgruppe mit einem Überleben von 4 Tagen gelang bei 4 von 6 Mäusen der mikroskopische Nachweis von Tumorzellen. Bei der Mausgruppe mit einem Überleben von 7 Tagen bei allen Mäusen und bei der Mausgruppe mit einem Überleben von 11 Tagen gelang der mikroskopische Nachweis von Tumorzellen bei 4 von 6 Mäusen, bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 14 Tagen bei 5 von 6 Mäusen und bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 41 Tagen bei allen Mäusen.

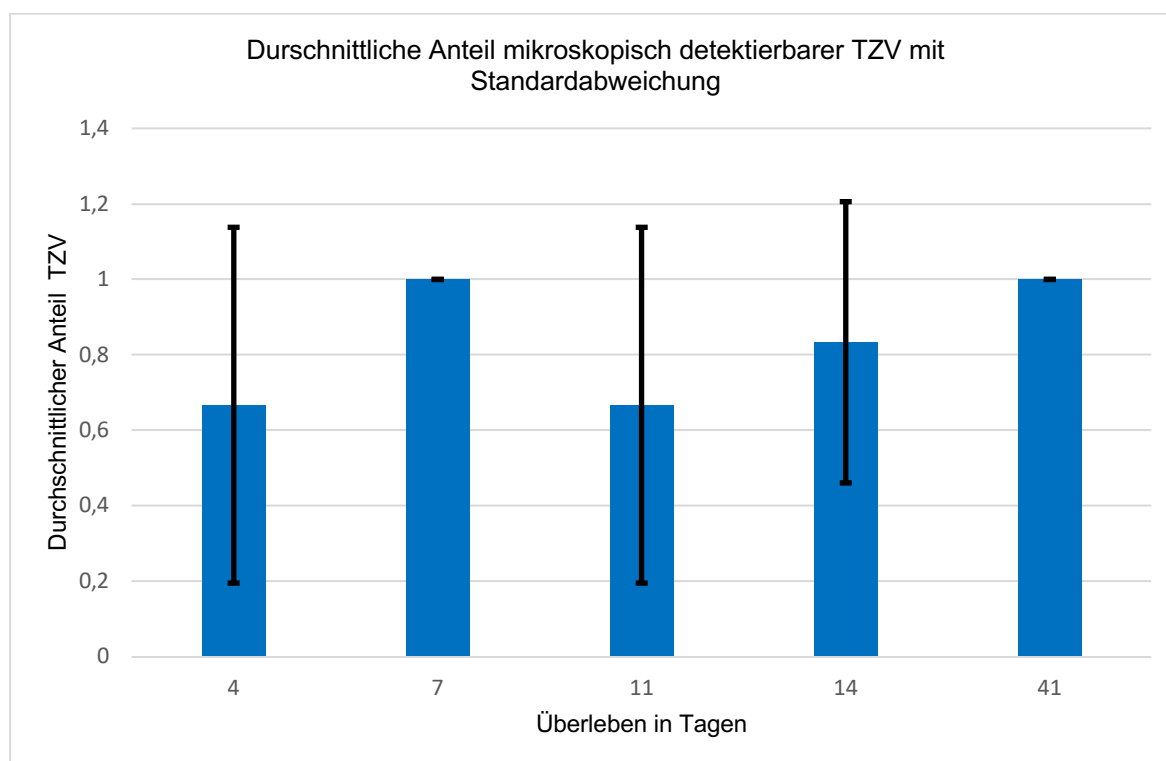


Abbildung 7: Säulendiagramm des durchschnittlichen Anteils mikroskopisch detektierbarer TZV mit Standardabweichung (y-Achse) nach dem Überleben in Tagen (x-Achse).

Tabelle 11: Anteil an Mäuse mit derselben Überlebenszeit mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealen Karzinose und Angabe des Anteils in Prozent.

Überleben in Tagen	mikroskopisch peritoneale Karzinose nachweisbar	mikroskopisch peritoneale Karzinose nachweisbar in Prozent
4	4 von 6	66,6
7	6 von 6	100
11	4 von 6	66,6
14	5 von 6	83,3
41	6 von 6	100

4.3 Tumorfläche der peritonealen Tumorzellverbände

Die Mittelwerte der Tumorfläche, welche nach der in Abschnitt 3.17 beschriebenen Methode bestimmt wurde und die Tumorgöße repräsentiert, unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den Mauskohorten mit einem Überleben von 4, 7, 11 und 14 Tagen (Abbildung 8). Sowohl der Median als auch der Mittelwert für die Tumorfläche verhalten sich ähnlich für diese Mauskohorten.

Der Mittelwert der vermessenen Tumorfläche für die Präparate der Mauskohorte mit einem Überleben von 4 Tagen variierte zwischen 0 und 231,334 μm^2 . Der Mittelwert

der Tumorfläche für alle Präparate dieser Mauskoorte lag bei 45,245 μm^2 und der Median ist mit 10,399 μm^2 der geringste im Vergleich zu den anderen Kohorten.

Für die Mauskoorte mit einem Überleben von 7 Tagen variierte die Tumorfläche der einzelnen Präparate zwischen einer Fläche von 5,031 μm^2 und 208,255 μm^2 . Der Mittelwert und Median lag hier bei 47,907 μm^2 und 18,321 μm^2 .

Bei der Mauskoorte mit einem Überleben von 11 Tagen variierte die Tumorfläche der Präparate zwischen einer Fläche von 0 μm^2 und 111,851 μm^2 . Berechnet man den Mittelwert und den Medianwert für die gesamte Mauskoorte, ergab sich ein Mittelwert von 45,870 μm^2 und ein Median von 32,528 μm^2 . Für die Mauskoorte mit einem Überleben von 14 Tagen variierte die Tumorfläche der einzelnen Präparate zwischen einer Fläche von 0 μm^2 und 113,271 μm^2 . Der ermittelte Mittelwert für die gesamte Mauskoorte mit einem Überleben von 14 Tagen lag bei 38,340 μm^2 und hat damit im Vergleich zu den anderen Mauskohorten den kleinsten Mittelwert. Der Median lag bei 26,237 μm^2 . Für die Mauskoorte mit einem Überleben von 41 Tagen variierte die Tumorfläche der einzelnen Präparate zwischen einer Fläche von 1,028.031 μm^2 und 21,385.117 μm^2 . Berechnet man den Mittelwert und den Median der Tumorgroße, zeichnete sich die Mauskoorte mit der höchsten Überlebenszeit durch den größten Medianwert mit 3.216,198 μm^2 und den größten Mittelwert mit 5.940,964 μm^2 für die Tumorfläche aus. Statistisch ist die Tumorgroße für die Mauskoorte mit einem Überleben von 41 Tagen, verglichen mit den Beobachtungszeitpunkten der Mauskohorten mit einer kürzeren Überlebenszeit, signifikant größer (Abbildung 9).

Im Durchschnitt ist die Anzahl an Tumorzellverbänden, die pro Präparat vorhanden waren, ähnlich und unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (berechnet nach dem Mann-Whitney U Test).

In den nachfolgenden Tabellen sind die Ergebnisse für die Tumorgroße in Form des Mittel- und Medianwertes zusammengefasst.

Tabelle 12: Mittelwert und Median der Tumorfläche berechnet für Mauskohorten mit derselben Überlebenszeit und Mittelwert der Anzahl der Tumorzellverbände.

Überleben in Tagen	Mittelwert Tumorfläche in μm^2	Median Tumorfläche in μm^2	Mittelwert Anzahl an Tumorzellverbänden
4	45,245	10,399	9,3
7	47,907	18,321	4,3
11	45,870	32,528	8,7

14	38,340	26,237	7,2
41	5.940,964	3.216,198	12,6

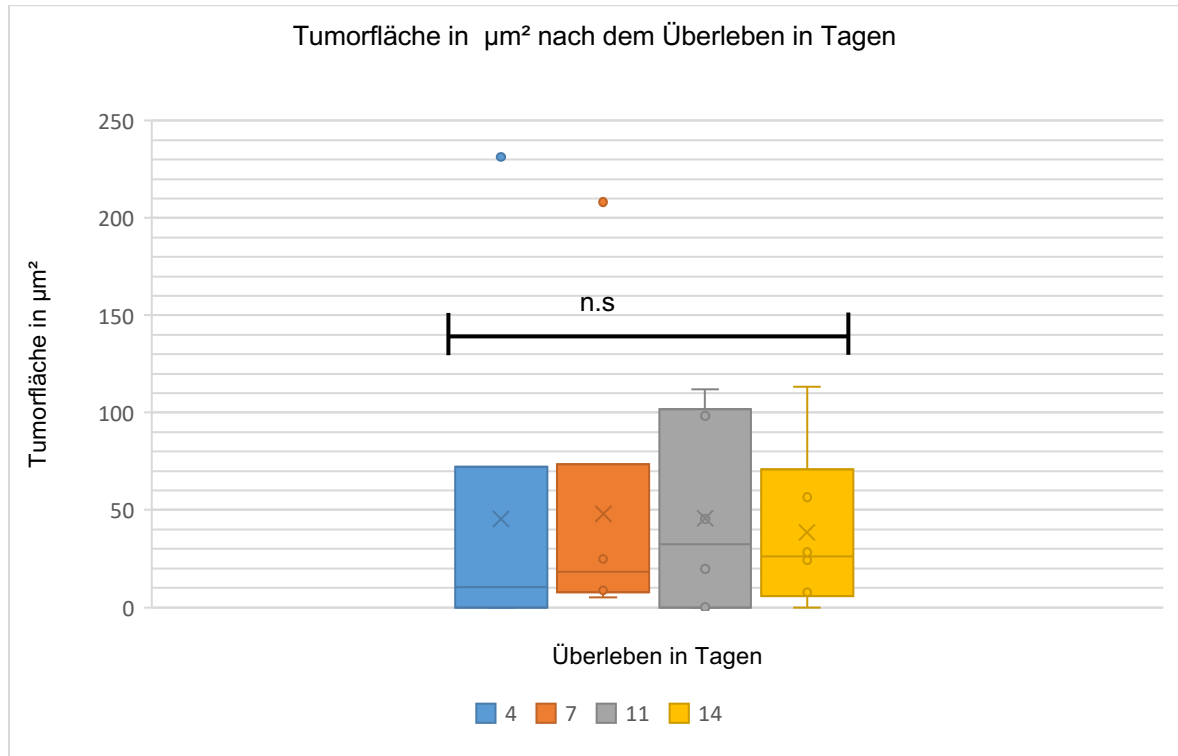


Abbildung 8: Vergleich der Mittelwerte der Tumorfläche für die Mauskohorten mit einem Überleben von 4, 7, 11 und 14 Tagen mittels Boxplot. Die Tumorgößen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

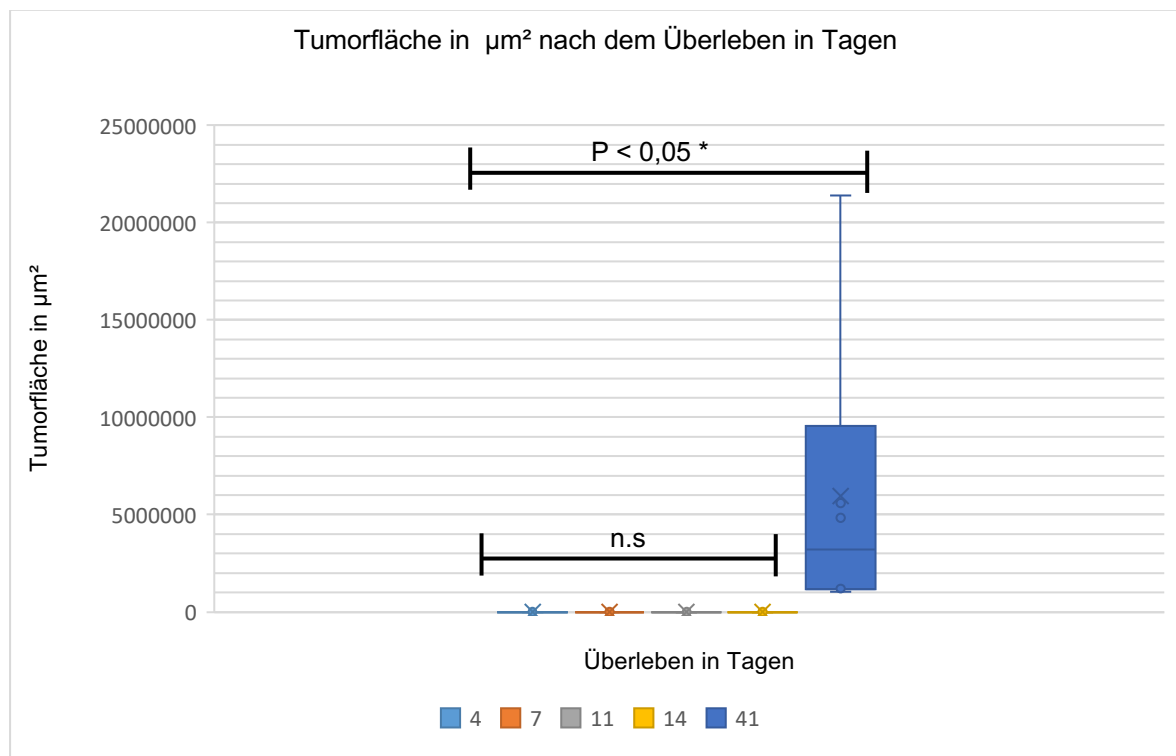


Abbildung 9: Vergleich der Mittelwerte der Tumorfläche für die Mauskohorten mit einem Überleben von 4, 7, 11, 14 und 41 Tagen mittels Boxplot. Die Tumorfläche für die Mauskohorte mit einem Überleben von 41 Tagen ist signifikant größer im Vergleich zu den Mauskohorten mit einer geringeren Überlebenszeit.

4.4 Immunhistochemische Färbung der peritonealen Tumorzellen

4.4.1 Integrine

4.4.1.1 Übersicht über die IHC Färbung der Integrine

Für die Integrine wurde immunhistochemisch die Expression der Integrine $\beta 3$, $\beta 6$, $\beta 4$, $\beta 1$ und αV untersucht. Es konnte für all diese Integrine, mit Ausnahme von Integrin $\beta 3$, eine positive Expression nachgewiesen werden.

Der Anteil an Präparaten pro Mauskohorte mit derselben Überlebenszeit, die eine positive Expression aufwiesen, verhielt sich für die Mauskohorten ab einer Überlebenszeit von 7 Tagen gleich. Alle Präparate mit nachweisbarer peritonealer Karzinose zeigten ab einem Überleben von 7 Tagen eine positive Expression. In der Mauskohorte mit einem Überleben von 4 Tagen unterschied sich dieser Anteil an Präparaten mit einer positiven Expression bei den Integrinen. Im Vergleich zu den anderen Integrinen zeigte Integrin $\beta 6$ hier bereits eine positive Expression bei allen Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose (4 von 4) und war damit das Integrin, welches am frühesten bei allen peritonealen Tumorzellverbänden eine positive Expression aufwies. Der nächstgrößte Anteil konnte für Integrin αV beobachtet werden, mit 3 von 4 Präparaten mit einer positiven Expression. Bei den Integrinen $\beta 4$ und $\beta 1$ zeigte hier nur ein Präparat eine Expression (vergleiche Abbildung 14). Die nachfolgende Abbildung soll eine kurze Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Integrine in Hinblick auf ihr Vorkommen (Anteil) liefern.

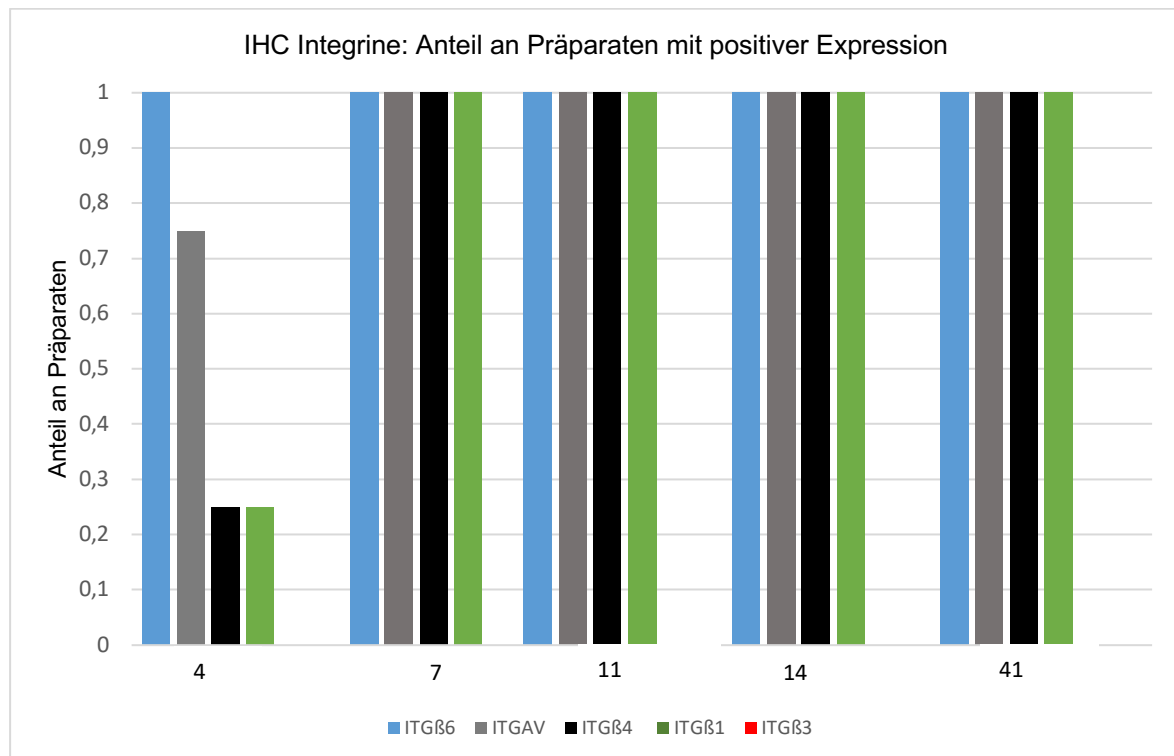


Abbildung 10: Anteil an Präparaten pro Mauskoorte mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose und positiver Expression der jeweiligen Integrine. Die X-Achse gibt das Überleben in Tagen an. Die Legende gibt an, welcher Farbbalken welchem Integrin entspricht.

4.4.1.2 Integrin α V

Alle Gewebeschnitte mit nachweisbarer peritonealer Karzinose exprimierten Integrin α V. Nur bei einem Präparat aus der Mauskoorte mit einem Überleben von 4 Tagen konnte keine positive Expression für Integrin α V nachgewiesen werden.

Tabelle 13: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen Integrin α V Expression.

Integrin α V	Anzahl der Präparate mit einer positiven Expression	Anzahl der Präparate mit negativer Expression	Anteil an Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose und positiver Expression
Überleben in Tagen			
4	3 (50%)	3 (50%)	3 von 4 (75%)
7	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)
11	4 (66,7%)	2 (33,3%)	4 von 4 (100%)
14	5 (83,3%)	1 (16,7%)	5 von 5 (100%)
41	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)

Anhand der Anzahl an Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose und anhand der Anzahl an Präparaten, die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(++/2) oder starke (+++/3) Expression aufwiesen, wurde der Anteil der

Präparate bestimmt, die jeweils eine solche Intensität vorweisen. Dieses Ergebnis ist in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.

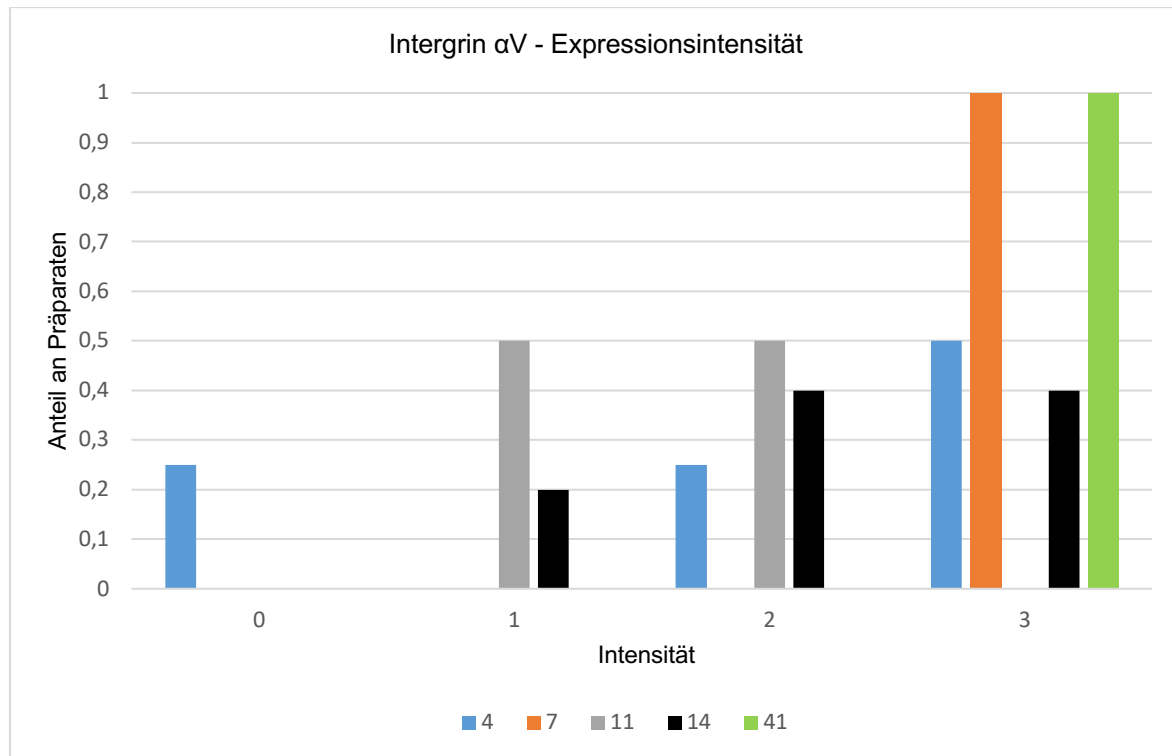
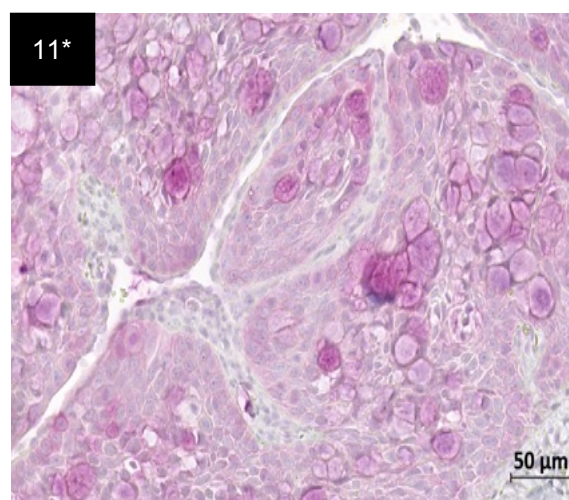
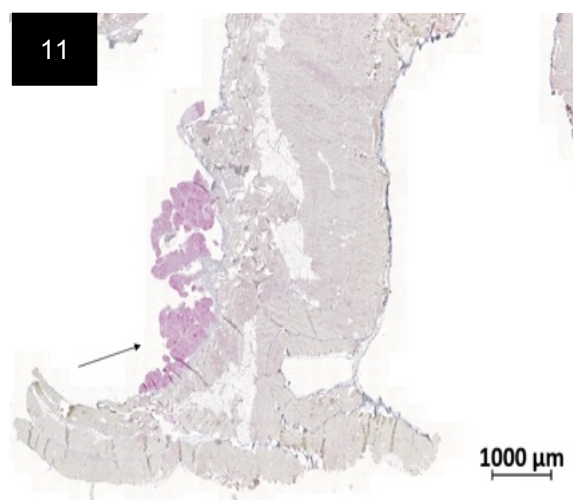
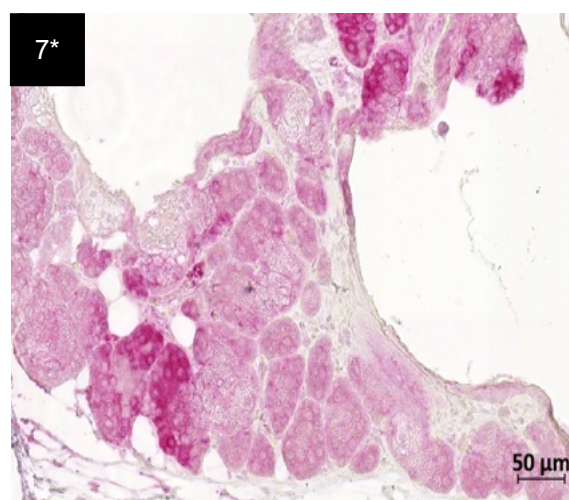
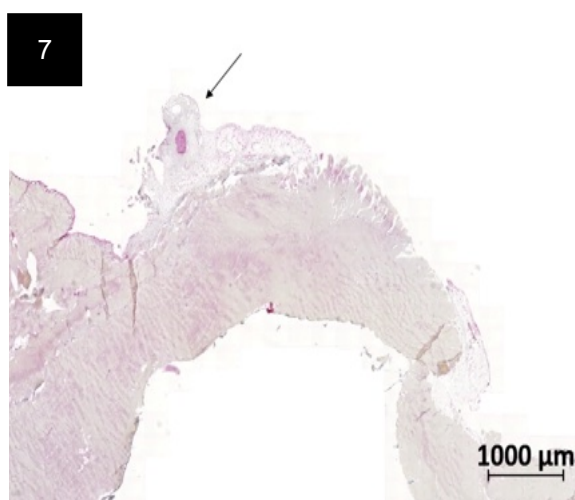
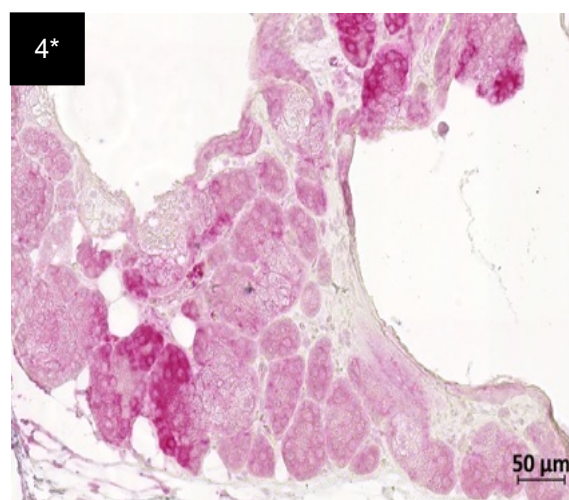
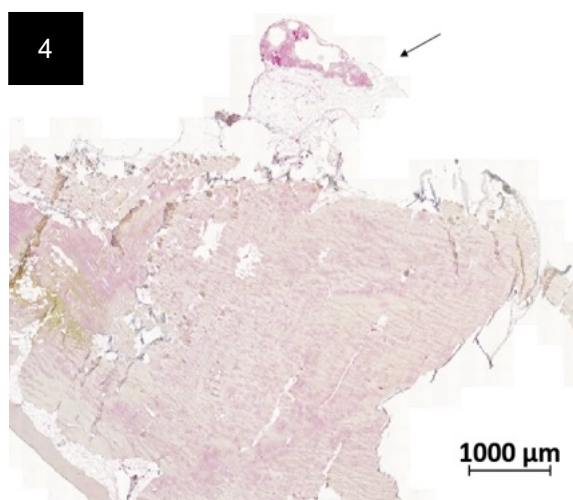


Abbildung 11: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose (y-Achse) pro Mauskoorte, die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(+/+/2) oder starke (+/+/+/3) Expression (x-Achse) für Integrin αV aufweisen. Die Legende gibt an, welcher Farbbalken welcher Überlebenszeit entspricht.

Die Expression für Integrin αV ist bei den Mauskoorten mit einem Überleben von 7 und 41 Tagen am höchsten. Hier konnte bei allen Präparaten eine starke Expression (+/+/+/3) für Integrin αV gefunden werden.

In der Mauskoorte mit einem Überleben von 4 und 14 Tagen zeigten jeweils nur 2 Präparate eine starke Expression (+/+/+/3) für Integrin αV und in der Mauskoorte mit einem Überleben von 11 Tagen konnte bei keinem Präparat eine starke Expression (+/+/+/3) vorgefunden werden. Bei dieser Mauskoorte wiesen 2 Präparate eine mittelgradige (+/+/2) und 2 eine geringe Expression (+/1) auf. Die Werte für die Intensität der Färbung schwankten innerhalb der Mauskoorte mit einem Überleben von 14 Tagen zwischen einer leichten (+/1) und starken Intensität (+/+/+/3) mit insgesamt einem Präparat mit einer leichten (+/1), 2 Präparaten mit einer mittelgradigen (+/+/2) und 2 Präparaten mit einer starken (+/+/+/3) Intensität. Bei der Mauskoorte mit einem Überleben von 4 Tagen verhielt es sich ähnlich nur das anstelle von 2 Präparaten nur ein Präparat eine mittelgradige (+/+/2) und dafür ein Präparat keine (-/0) Expression für Integrin αV aufwies.



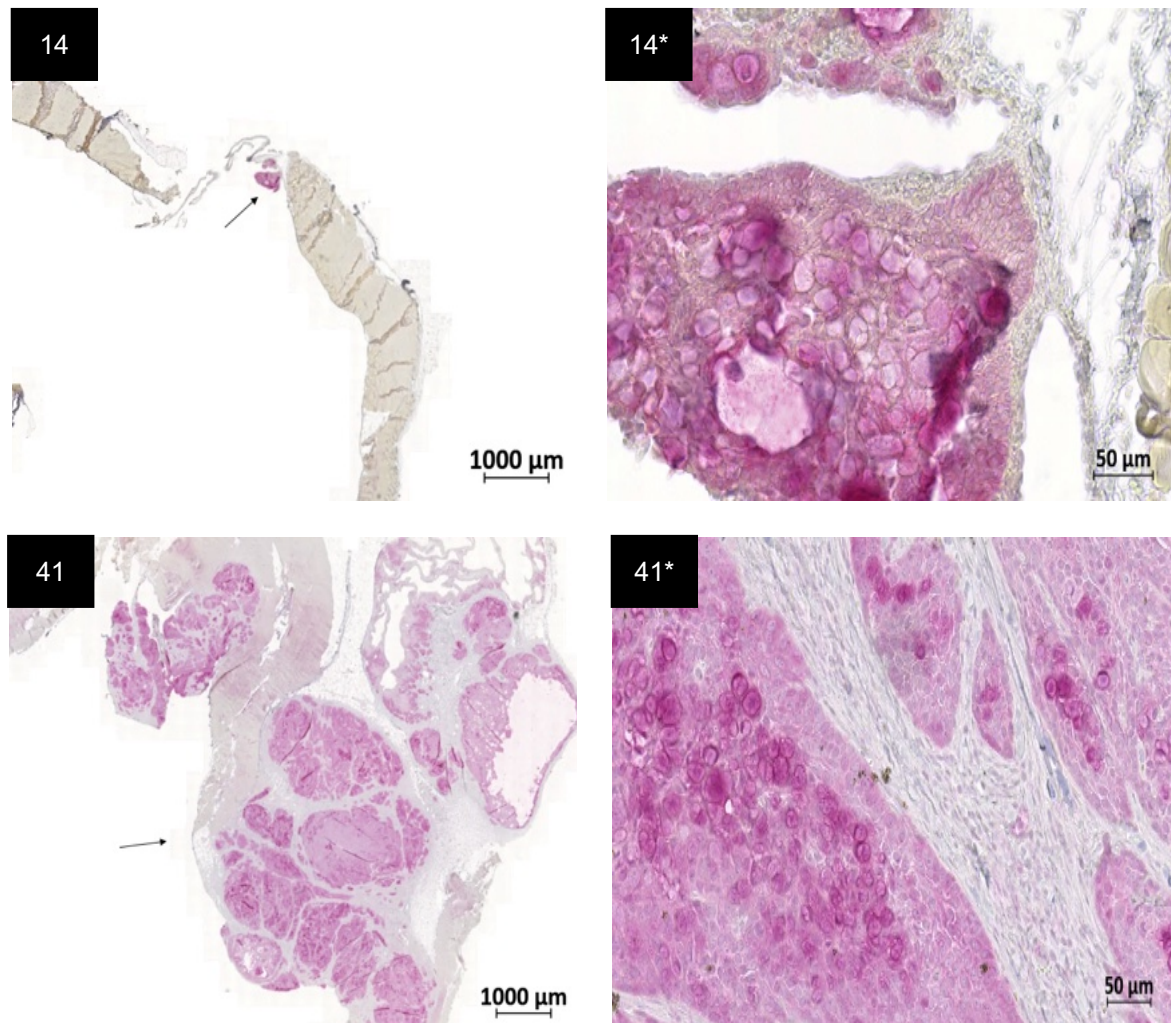


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung mit Integrin αV – mit einem Pfeil sind die Tumorzellverbände markiert. In der Abbildung rechts (Zahl im schwarzen Balken mit einem Stern gekennzeichnet) wurde die entsprechend 20-fache Vergrößerung der mit einem Pfeil markierten TZV dargestellt. Die Zahl im schwarzen Kasten gibt immer das Überleben in Tagen an. TZV für die Mauskohorte mit einem Überleben von 4 Tagen – Präparat 212-1-20 (4 und 4.), 7 Tagen- Präparat 216-1-20 (7 und 7.), 11 Tage- Präparat 224-2-20 (11 und 11.), 14 Tagen- Präparat 233-1-20 (14 und 14.) und 41 Tagen-Präparat 270-1-20 (41 und 41.)

4.4.1.3 Integrin $\beta 4$

Für Integrin $\beta 4$ zeigte sich bei den Mauskohorten ab einer Überlebenszeit von 7 Tagen bei allen Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose durchgehend eine starke Expression (+++/3). Lediglich bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 4 Tagen zeigten 3 von 4 Präparaten, bei denen sich eine peritoneale Karzinose nachweisen ließ, keine Integrin $\beta 4$ Expression (-/0) (s. Abbildung 14 - Tag 4). Lediglich bei einem Präparat aus dieser Gruppe konnte eine positive Expression mit einer Intensität von (+++/3) für Integrin $\beta 4$ nachgewiesen werden.

Tabelle 14: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen Integrin $\beta 4$ Expression.

Integrin $\beta 4$	Anzahl der Präparate mit einer positiven Expression	Anzahl der Präparate mit negativer Expression	Anteil an Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose und positiver Expression
Überleben in Tagen			
4	1 (16,7%)	5 (83,3%)	1 von 4 (25%)
7	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)
11	4 (66,7%)	2 (33,3%)	4 von 4 (100%)
14	5 (83,3%)	1 (16,7%)	5 von 5 (100%)
41	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)

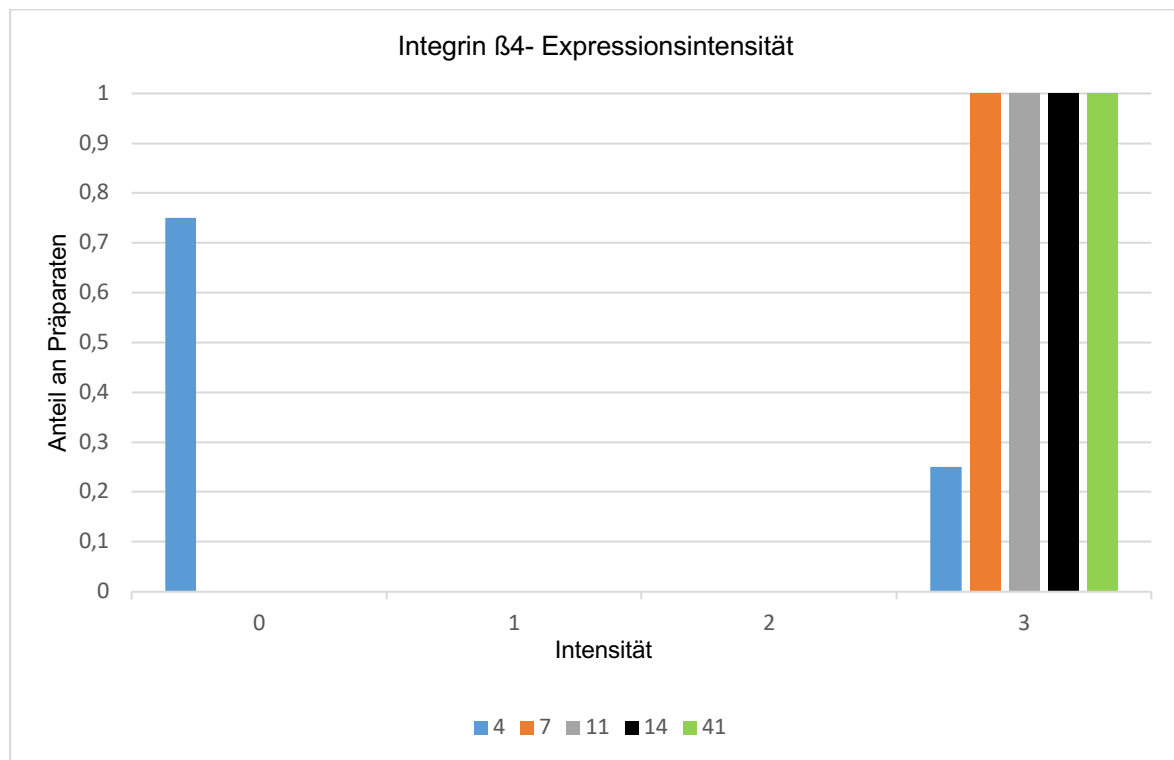


Abbildung 13: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose, (y-Achse) pro Mauskoorte die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(+/+/2) oder starke (+/+/+/3) Expression (x-Achse) für Integrin $\beta 4$ aufweisen.

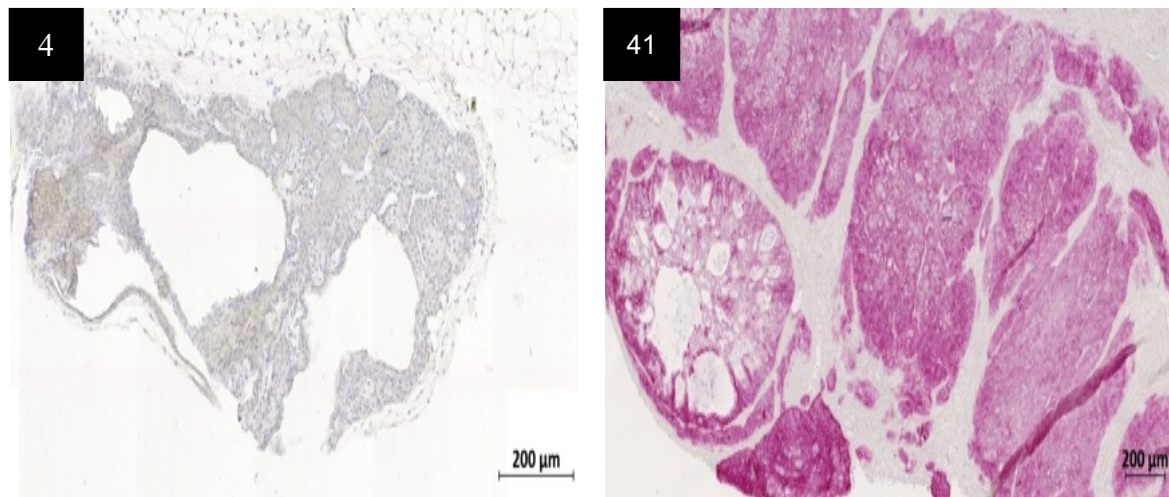


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung mit Integrin $\beta 4$, exemplarisch negative Expression bei Präparat 212-1-20 (4) und Präparat 270-1-20 (41) mit einer starken Expression (+++/3).

4.4.1.4 Integrin $\beta 6$

Alle Präparate mit nachweisbarer peritonealer Karzinose zeigten eine positive Integrin $\beta 6$ Expression. Die Mauskohorte mit einem Überleben von 7 Tagen war die einzige Mauskohorte, bei der auf allen Präparaten eine starke (+++/3) Integrin $\beta 6$ Expression vorzufinden war. Bei den Mauskohorten mit einem Überleben von 4, 11 und 14 Tagen zeigten jeweils nur 2 Präparate eine starke (+++/3) Integrin $\beta 6$ Expression auf und in der Mauskohorte mit einem Überleben von 41 Tagen zeigte keines der Präparate eine starke Expression. Hier wiesen 4 Präparate eine mittelgradige (++/2) und 2 Präparate eine schwache (+/1) Integrin $\beta 6$ Expression auf. Damit ist die Mauskohorte mit der längsten Überlebenszeit die einzige, bei der sich eine leichte Expression von Integrin $\beta 6$ nachweisen ließ. Alle anderen Mauskohorten zeigten mindestens eine mittelgradige (++/2) Integrin $\beta 6$. In der Mauskohorte mit einem Überleben von 4 und 11 Tagen zeigten jeweils 2 Präparate eine solche mittelgradige (++/2) Expression und in der Mauskohorte mit einem Überleben von 14 Tagen insgesamt 3 Präparate (Vergleich Abbildung 16)

Tabelle 15: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen Integrin $\beta 6$ Expression.

Integrin $\beta 6$	Anzahl der Präparate mit einer positiven Expression	Anzahl der Präparate mit negativer Expression	Anteil an Präparaten mit nachweisbarer peritonealen Karzinose und positiver Expression
Überleben in Tagen			
4	4(66,7%)	2 (33,3%)	4 von 4 (100%)
7	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)
11	4 (66,7%)	2 (33,3%)	4 von 4 (100%)

14	5 (83,3%)	1 (16,7%)	5 von 5 (100%)
41	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)

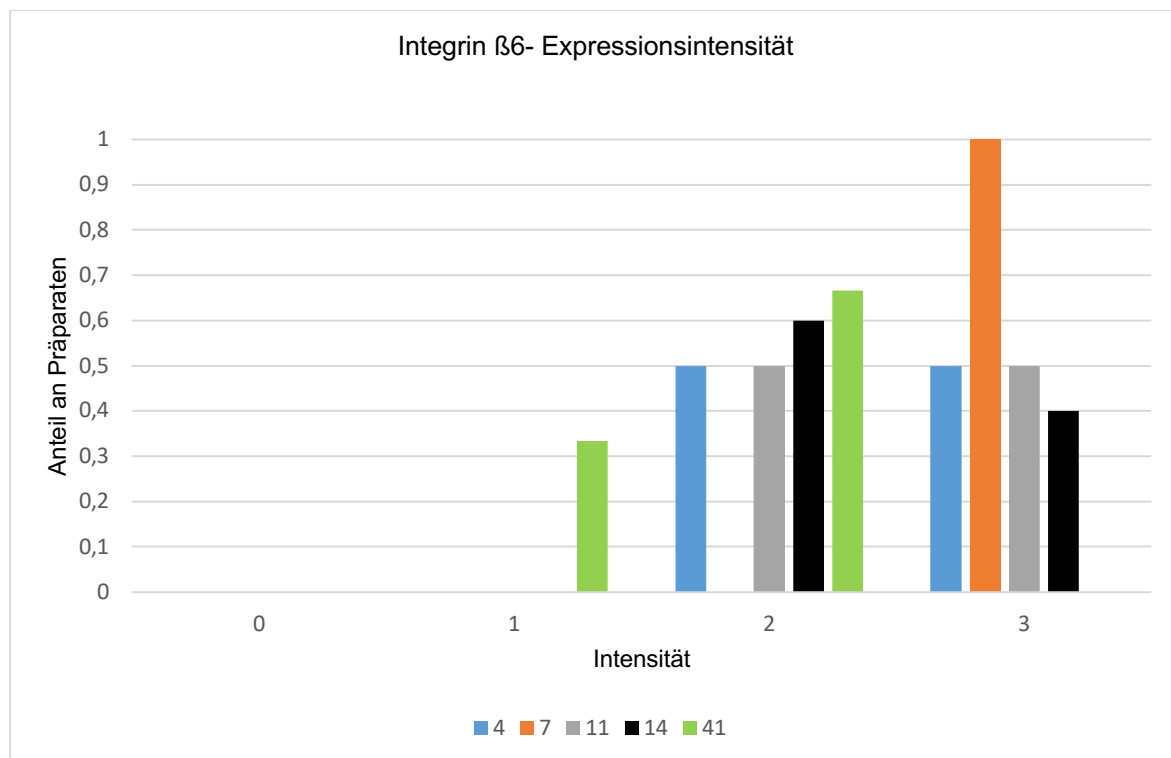


Abbildung 14: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose (y-Achse) pro Mauskoorte, die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(+/+/2) oder starke (+/+/+/3) Expression (x-Achse) für Integrin $\beta 6$ aufweisen.

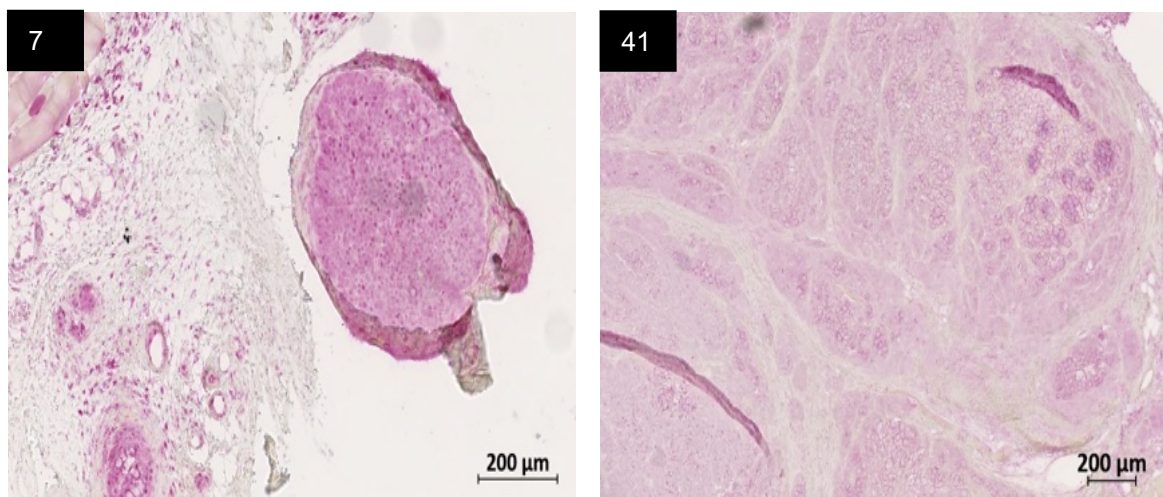


Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung mit Integrin $\beta 6$, exemplarisch starke (+/+/+/3) Expression bei Präparat 216-1-20 (7) im Vergleich zu einer schwachen (+/1) Expression bei Präparat 270-1-20.

4.4.1.5 Integrin $\beta 1$

Bei den Mauskoorten ab einem Überleben von 7 Tagen exprimierten alle Präparate mit nachweisbarer peritonealer Karzinose Integrin $\beta 1$, in der Mauskoorte mit einem

Überleben von 4 Tagen dagegen nur ein Präparat mit einer starken Intensität (+++/3). Die Gruppe mit der kürzesten Überlebenszeit zeigte damit im Vergleich die schwächste Integrin $\beta 1$ Expression. Die Intensität der Integrin $\beta 1$ Expression war bei den anderen Mauskohorten untereinander sehr ähnlich.

Die Werte für die Intensität der Expression schwankten für diese Mauskohorten zwischen einer schwachen Expression (+/1) und einer mittelgradigen Expression (+/2). Nur ein Präparat aus der Mauskohorte mit einem Überleben von 11 Tagen wies ebenfalls eine starke Expression (+++/3) Expression von Integrin $\beta 1$ auf.

Tabelle 16: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen Integrin $\beta 1$ Expression

Integrin $\beta 1$	Anzahl der Präparate mit einer positiven Expression	Anzahl der Präparate mit negativer Expression	Anteil an Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose und positiver Expression
Überleben in Tagen			
4	1 (16,7%)	5 (83,3%)	1 von 4 (25%)
7	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)
11	4 (66,7%)	2 (33,3%)	4 von 4 (100%)
14	5 (83,3%)	1 (16,7%)	5 von 5 (100%)
41	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)

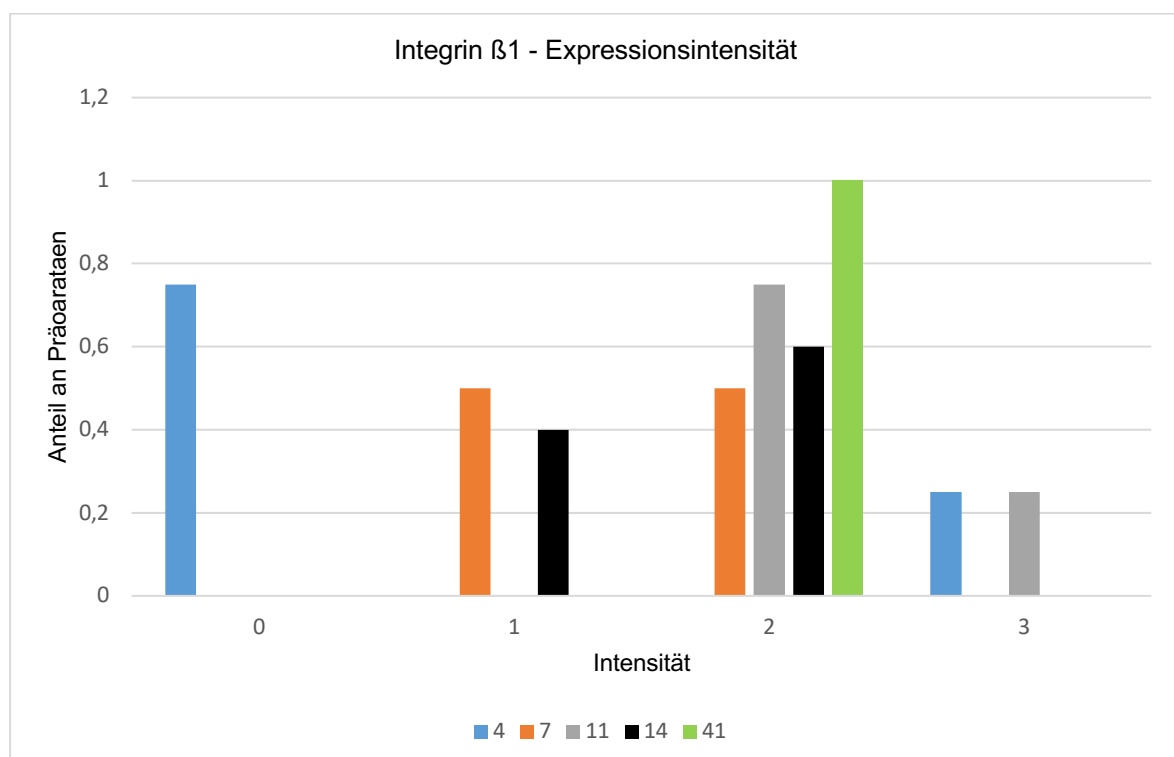


Abbildung 17: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose (y-Achse) pro Mauskoorte, die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(+/2) oder starke (+++/3) Expression (x-Achse) für Integrin $\beta 1$ aufweisen.

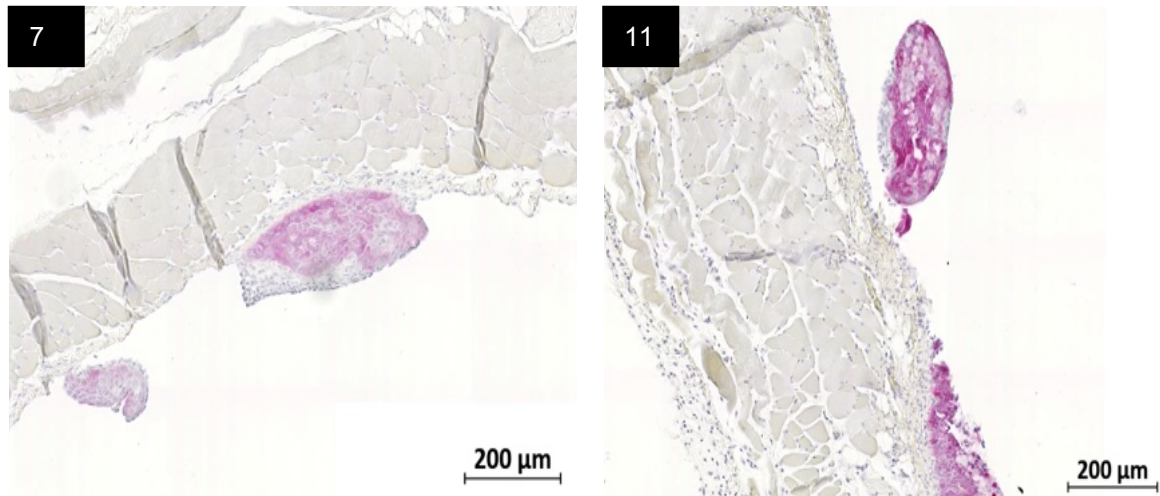


Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung mit Integrin $\beta 1$, exemplarisch schwache (+/1) Expression bei Präparat 216-2-20 (7) und starke Expression (+++/3) bei Präparat 224-3-20 (11).

4.4.1.6 Integrin $\beta 3$

Die IHC für Integrin $\beta 3$ zeigte keine Expression (-/0) für dieses Integrin bei allen Präparaten. Dementsprechend wesen die Tumorzellen der Mäuse im gesamten Beobachtungszeitraum offensichtlich keine Expression von Integrin $\beta 3$ auf (Vergleich Abbildung 18).

Tabelle 17: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen Integrin $\beta 3$ Expression

Integrin $\beta 3$	Anzahl der Präparate mit einer positiven Expression	Anzahl der Präparate mit negativer Expression	Anteil an Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose und positiver Expression
Überleben in Tagen			
4	0(0%)	6 (100%)	0 von 4 (0%)
7	0 (0%)	6 (100%)	0 von 6 (0%)
11	0 (0%)	6 (100%)	0 von 4 (0%)
14	0 (0%)	6 (100%)	0 von 5 (0%)
41	0 (100%)	0 (100%)	0 von 6 (0%)

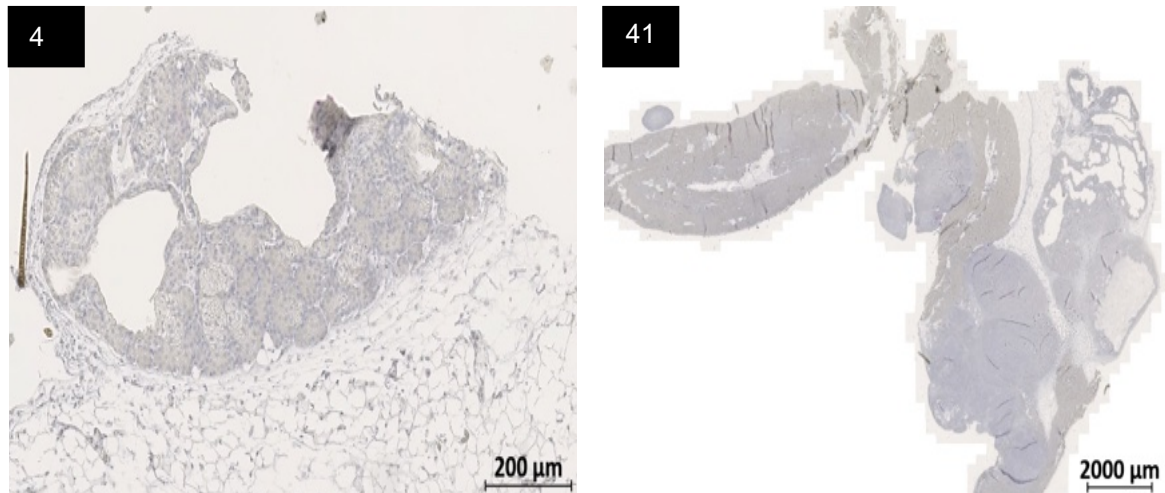


Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung mit Integrin $\beta 3$ – TZV exprimieren kein Integrin $\beta 3$, exemplarisch Präparat 212-1-20 (4) und 270-1-20 (41)

4.4.2 Immunglobulin Superfamilie (IgSF)

4.4.2.1 Übersicht über die IHC Färbung der IgSF

Bei der Mehrheit der Präparate wurde auf den TZV ab Tag 7 eine positive Expression für die untersuchten Moleküle der IgSF gefunden. Dabei wurde nur für CEACAM7 durchgehend eine Expression auf allen TZV nachgewiesen. Im Vergleich wies CEACAM7 auch die größte Anzahl an Präparaten auf, die eine starke Expression (+++/3) zeigten. EpCAM wurde ebenfalls, mit Ausnahme an Tag 4, auf allen TZV exprimiert. Die Intensität für die Expression verhielt sich ähnlich zu CEACAM-7. ICAM-1 und L1CAM dagegen wurde auch auf TZV bei den Mauskoorten mit einer längeren Überlebenszeit als 4 Tage teilweise nicht exprimiert. Insgesamt war die Anzahl an Präparaten, die eine starke Expression (+++/3) aufwiesen für diese beiden Moleküle aus der IgSF niedriger.

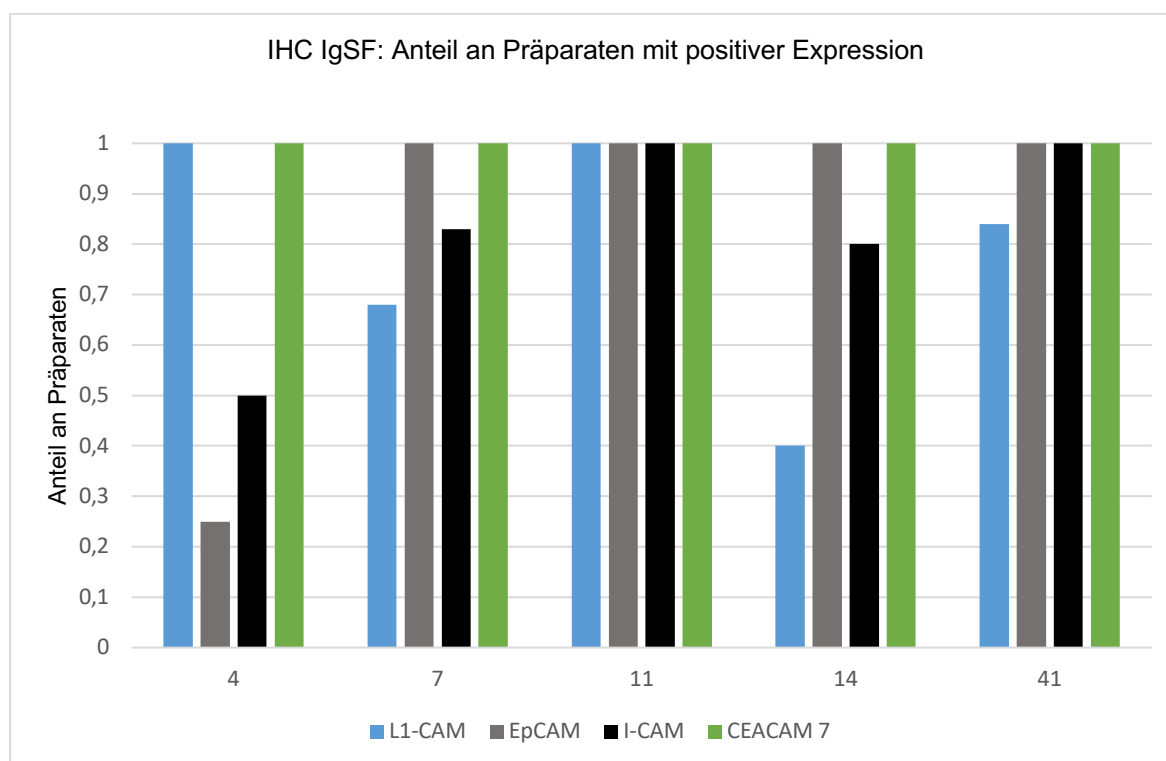


Abbildung 19: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose pro Mauskohte mit einer positiven Expression der jeweiligen Zelladhäsionsmoleküle der IgSF. Die X-Achse gibt das Überleben in Tagen an.

4.4.2.2 CEACAM7

Alle Tumorzellverbände der Präparate mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose exprimierten CEACAM7. Für die Beobachtungszeitpunkte ab einem Überleben von 11 Tagen war bei allen TZV eine starke (+++/3) Expression für CEACAM7 vorzufinden mit Ausnahme für ein Präparat aus der Gruppe mit einem Überleben von 14 Tagen, welches eine mittelgradige (+/2) Intensität hatte. Bei der Mauskohte mit einem Überleben von 4 Tagen wiesen von 4 Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose 3 Präparate eine starke (+++/3) auf und ein Präparat eine schwache (+/1) Expression für CEACAM7 auf. In der Mauskohte mit einem Überleben von 7 Tagen zeigte sich für die Intensität der IHC-Färbung bei 4 Präparaten eine mittelgradige (+/2) Expression und bei 2 Präparaten eine starke (+++/3) Expression.

Tabelle 18: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen CEACAM7 Expression

CEACAM 7	Anzahl der Präparate mit einer positiven Expression	Anzahl der Präparate mit negativer Expression	Anteil an Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose und positiver Expression

Überleben in Tagen			
4	4(83,3%)	2 (33,3%)	4 von 4 (100%)
7	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)
11	4 (66,7%)	2 (33,3%)	4 von 4 (100%)
14	5 (83,3%)	1 (16,7%)	5 von 5 (100%)
41	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)

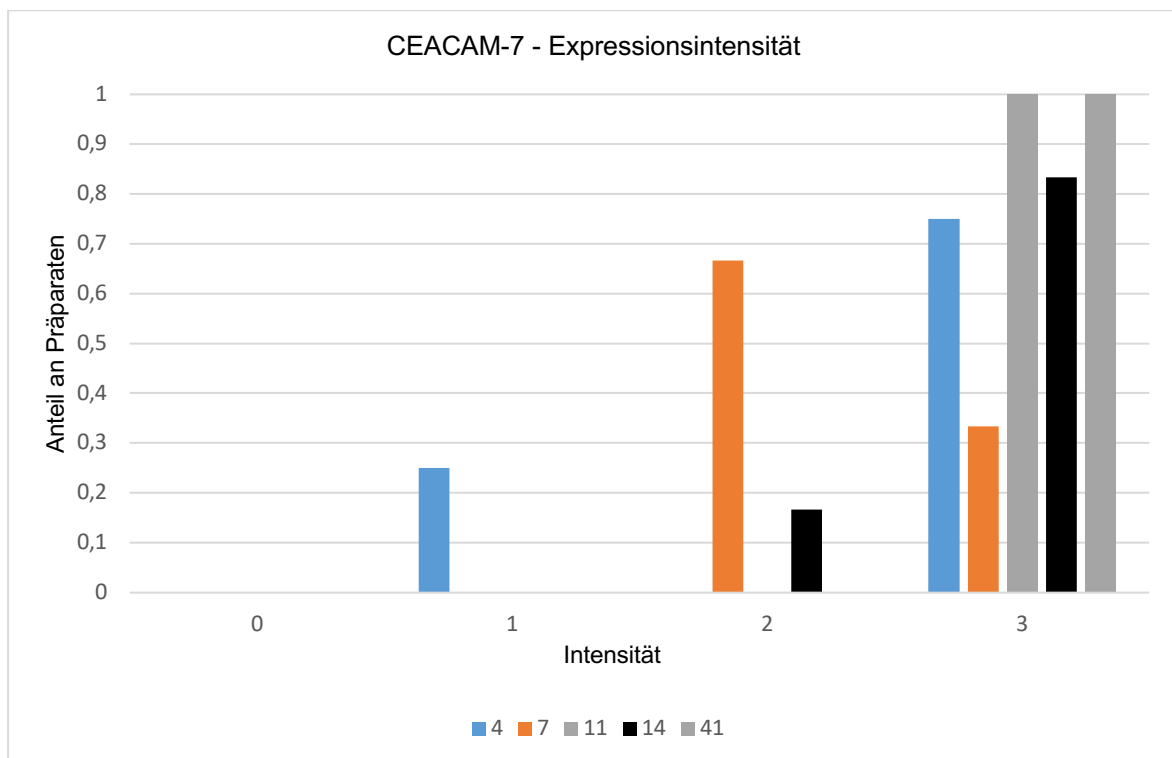
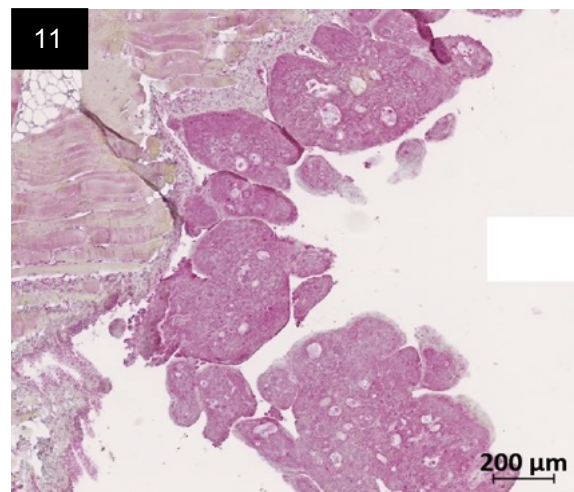
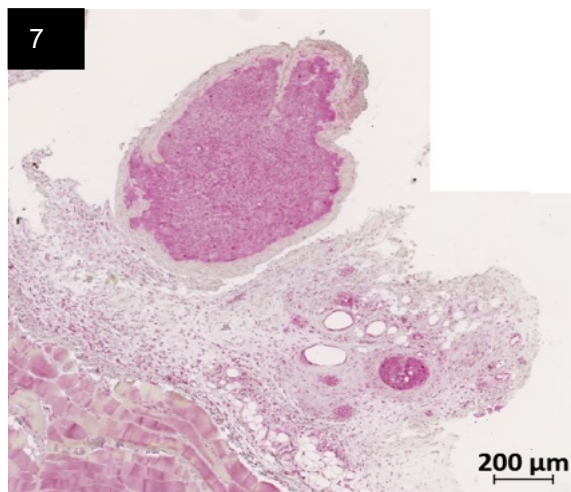


Abbildung 20: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose (y-Achse) pro Mauskoorte, die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(+/+/2) oder starke (+/+/+/3) Expression (x-Achse) für CEACAM7 aufweisen.



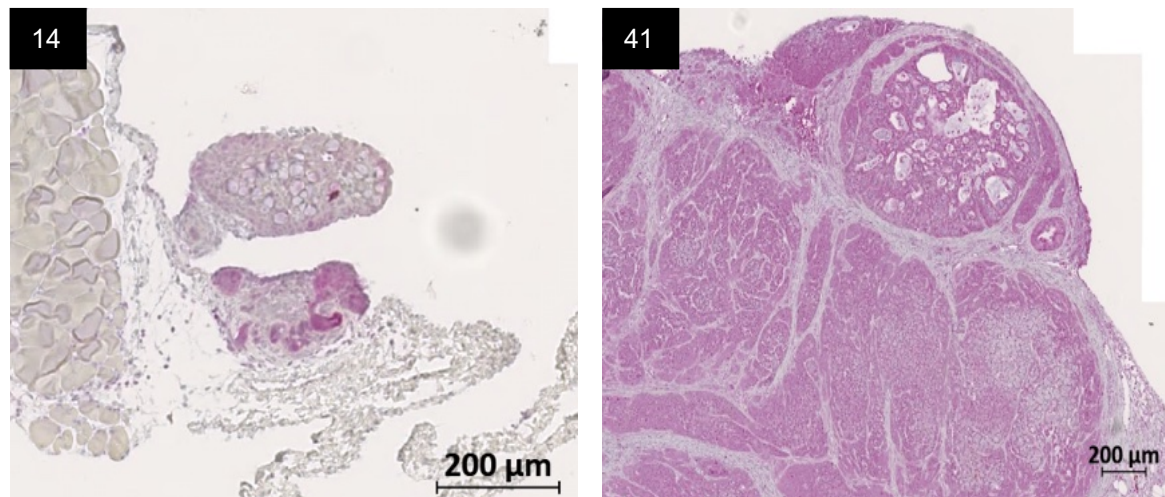


Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung mit CEACAM 7 Expression, exemplarisch mittelgradige (++/2) Expression bei Präparat 233-1-20 (14) und Präparat 270-1-20 (41) mit einer starken (+++/3) Expression.

4.4.2.3 EpCAM

Mit Ausnahme für die Mauskoorte mit der kürzesten Überlebenszeit (4 Tage), zeigten alle Präparate mit nachweisbarer peritonealer Karzinose eine positive Expression für EpCAM. In der Mauskoorte mit einem Überleben von 4 Tagen wies nur ein Präparat eine Expression mit starker Intensität: +++/3) für EpCAM auf (+++/3). Die Mauskoorte mit einem Überleben von 4 Tagen zeigte damit im Vergleich zu den anderen Mauskoorten die geringste Intensität für die Expression von EpCAM. In den Mauskoorten mit einer Überlebenszeit von 7, 11 und 14 Tagen wiesen die Präparate mit mikroskopisch nachweisbaren peritonealen Karzinose eine mittelgradige (++/2) bis starke Expression (+++/3) für EpCAM auf. Alle Präparate aus der Mauskoorte mit einem Überleben von 41 Tagen zeigten für EpCAM eine mittelgradige (++/2) Expression. Damit war an Tag 41 im Vergleich zu den Untersuchungszeitpunkten von Tag 7 bis 14 die geringste Intensität der Expression für EpCAM vorzufinden.

Tabelle 19: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen EpCAM Expression

EpCAM	Anzahl der Präparate mit einer positiven Expression	Anzahl der Präparate mit negativer Expression	Anteil an Präparaten mit nachweisbarer peritonealen Karzinose und positiver Expression
Überleben in Tagen			
4	1(16,7%)	5(83,3%)	1 von 4 (25%)
7	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)
11	4 (66,7%)	2 (33,3%)	4 von 4 (100%)

14	5 (83,3%)	1 (16,7%)	5 von 5 (100%)
41	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)

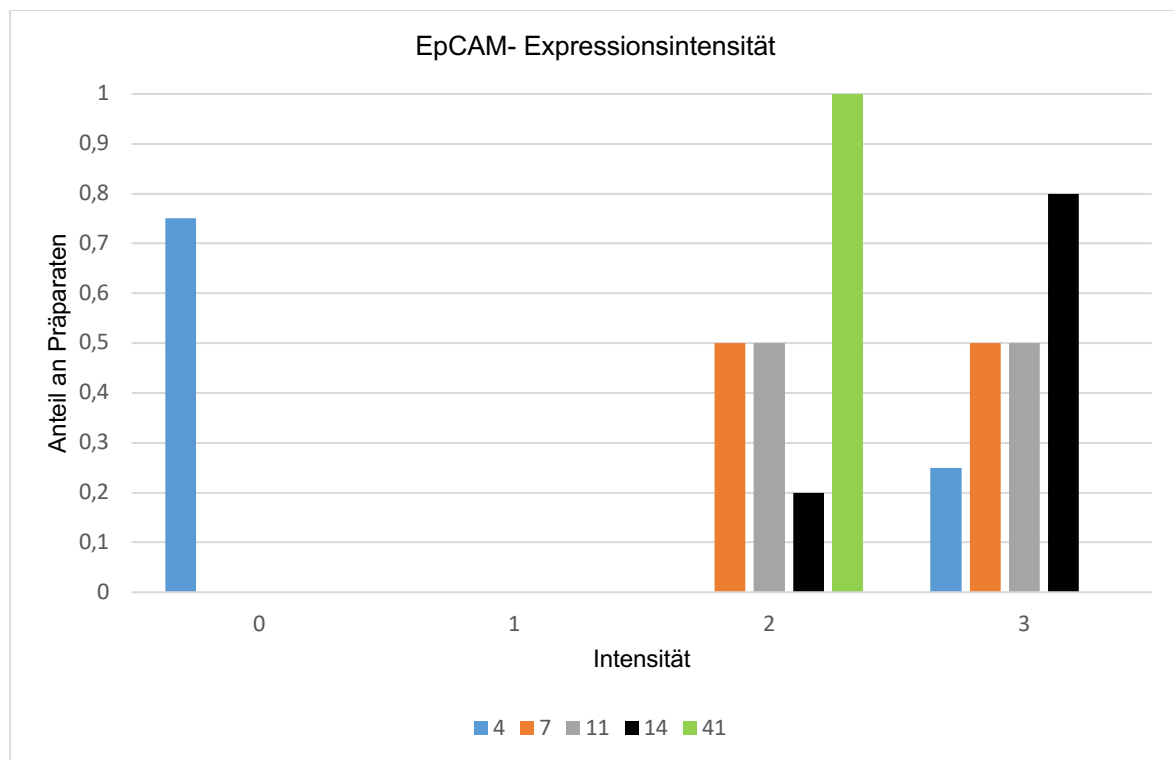


Abbildung 22: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer Karzinose (y-Achse) pro Mauskoorte, die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(+/+/2) oder starke (+/+/+/3) Expression (x-Achse) für EpCAM aufweisen.

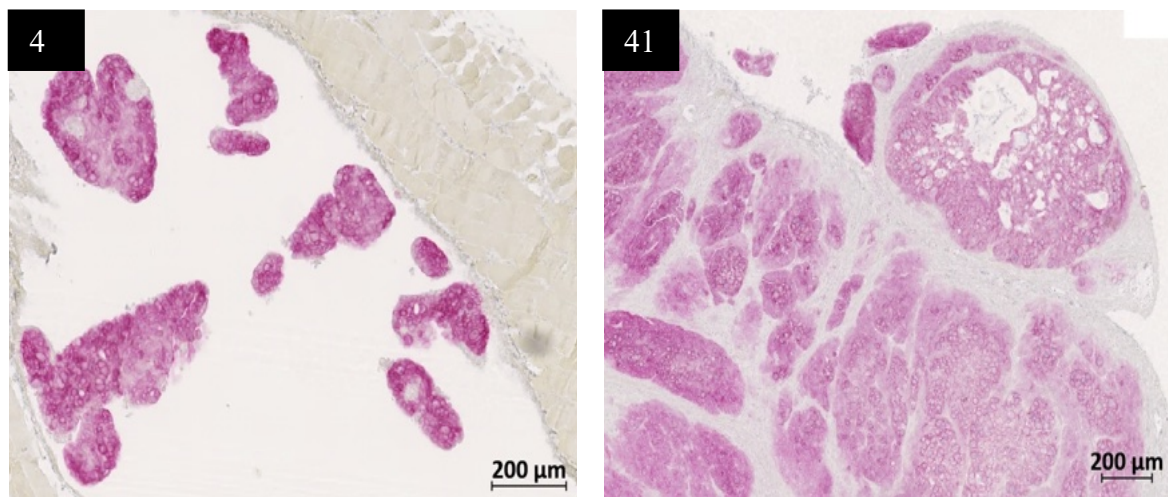


Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung mit EpCAM, exemplarisch Präparat 212-5-20 (4) mit einer starken Expression (+/+/+/3) und Präparat 270-1-20 (41) mit einer mittelgradigen (+/+/2) Expression.

4.4.2.4 L1CAM

Mit Ausnahme der Mauskoorten mit einem Überleben von 4 und 11 Tagen, gab es in den anderen Mauskoorten mindestens ein Präparat mit peritonealer Karzinose, für

das keine Expression von L1CAM nachweisbar war. Bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 14 Tagen exprimierten 2 von 5 Präparaten mit peritonealer Karzinose L1CAM. Damit ist in der Mauskohorte mit einem Überleben von 14 Tagen der geringste Anteil an Präparaten vorzufinden, die L1CAM exprimieren. Bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 7 Tagen exprimierten 4 von 6 und bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 41 Tagen 5 von 6 Präparaten L1CAM. Über alle Mauskohorten hinweg betrachtet schwankte die Intensität der L1CAM Expression zwischen keiner (-/0) bis zu einer mittelgradigen (++) Expression. Bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 14 Tagen zeigten die beiden positiven Präparate lediglich eine schwache Expression (+/1). In der Mauskohorte mit einem Überleben von 11 Tagen zeigten alle Präparate mit peritonealer Karzinose eine schwache (+/1) Expression. In der Mauskohorte mit einem Überleben von 4 Tagen zeigten alle Präparate mit mikroskopisch nachweisbaren peritonealen Karzinose eine mittelgradige Expression (++) für L1CAM. Die Mauskohorte mit der kürzesten Überlebenszeit wies damit im Vergleich zu den anderen Mauskohorten eine stärkere Expression für L1CAM auf.

Tabelle 20: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen L1CAM Expression

L1CAM	Anzahl der Präparate mit einer positiven Expression	Anzahl der Präparate mit negativer Expression	Anteil an Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose und positiver Expression
Überleben in Tagen			
4	4(66,7%)	2(33,4%)	4 von 4 (100%)
7	4 (66,7%)	2 (33,4)	4 von 6 (66,7%)
11	4 (66,7%)	2 (33,3%)	4 von 4 (100%)
14	2(33,4%)	4 (66,7%)	2 von 5 (40%)
41	5 (83,3%)	1 (16,7%)	5 von 6 (83,3%)

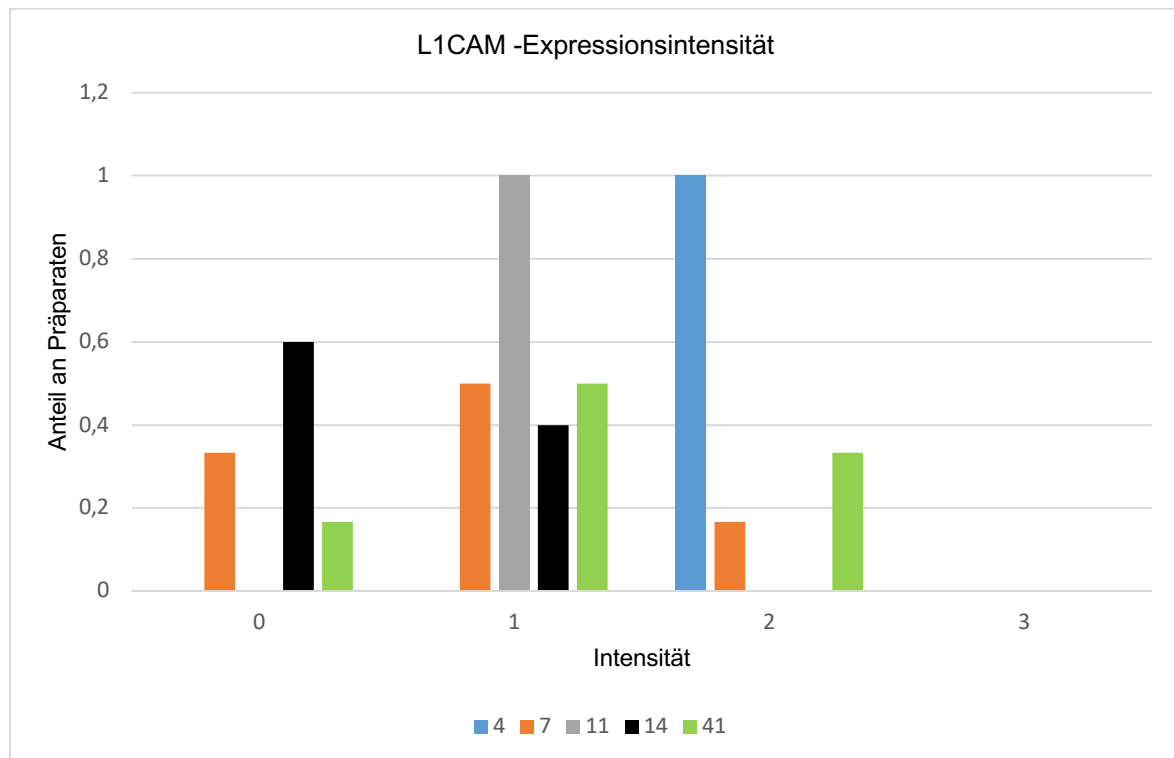


Abbildung 24: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose (y-Achse) pro Mauskoorte, die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(+/2) oder starke (+++/3) Expression (x-Achse) für L1CAM aufweisen. Die Legende gibt an, welcher Farbbalken welcher Überlebenszeit entspricht.

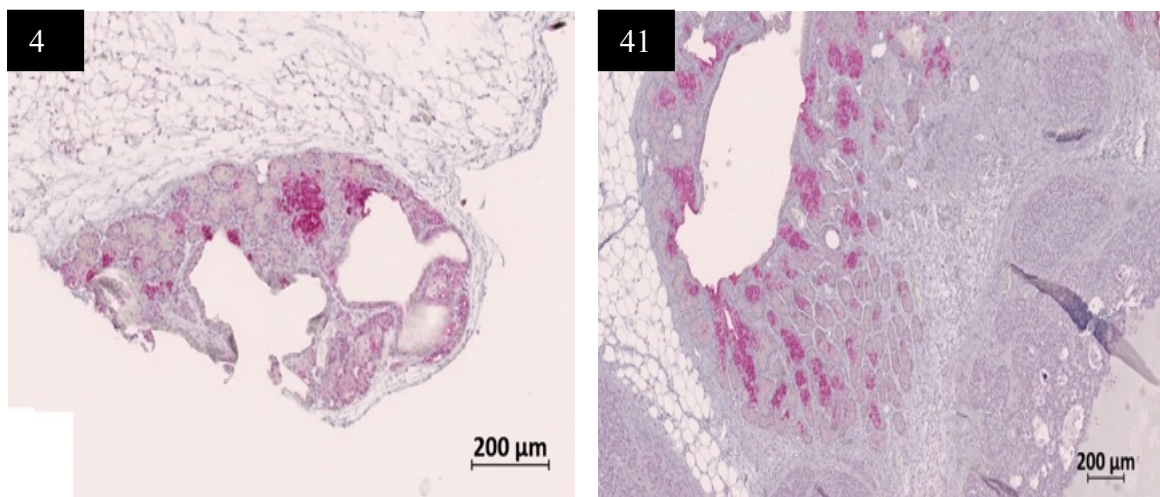


Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung mit L1CAM, exemplarisch Präparat 212-1-20 (4) und 270-1-20 (41) mit einer mittelgradigen (+/2) Expression.

4.4.2.5 ICAM-1

Die immunhistochemische Färbung für ICAM-1 erkennt als Antigen sowohl murines als auch humanes ICAM-1. Außer auf den humanen Tumorzellen konnte keine positive ICAM-1 Expression detektiert werden. Bei den humanen Tumorzellen wurde in der Mauskoorte mit einem Überleben von 4 Tagen bei der Hälfte der Präparate, bei denen sich eine peritoneale Karzinose nachweisen lies, ICAM-1 exprimiert. In der

Mauskohorte mit einem Überleben von 7 Tagen zeigten 5 von 6 Präparaten eine positive Expression für ICAM-1. Die Stärke der Intensität der Expression variierte in dieser Kohorte zwischen einer negativen (-/0) und starken Expression (+++/3). Die Mauskohorte mit einem Überleben von 11 Tagen zeigte für alle Präparaten, bei denen eine peritoneale Karzinose nachweisbar war, eine positive Expression. Bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 14 Tagen zeigten 4 von 5 Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose eine positive Expression und bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 41 Tagen alle Präparate.

Tabelle 21: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen ICAM Expression

ICAM-1	Anzahl der Präparate mit einer positiven Expression	Anzahl der Präparate mit negativer Expression	Anteil an Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose und positiver Expression
Überleben in Tagen			
4	2(33,4%)	4(66,7%)	2 von 4 (50%)
7	5 (83,3%)	1 (16,7%)	5 von 6 (83,3%)
11	4 (66,7%)	2 (33,3%)	4 von 4 (100%)
14	4 (66,7%)	2(33,4%)	4 von 5 (80%)
41	6 (100%)	0(0%)	6 von 6 (100%)

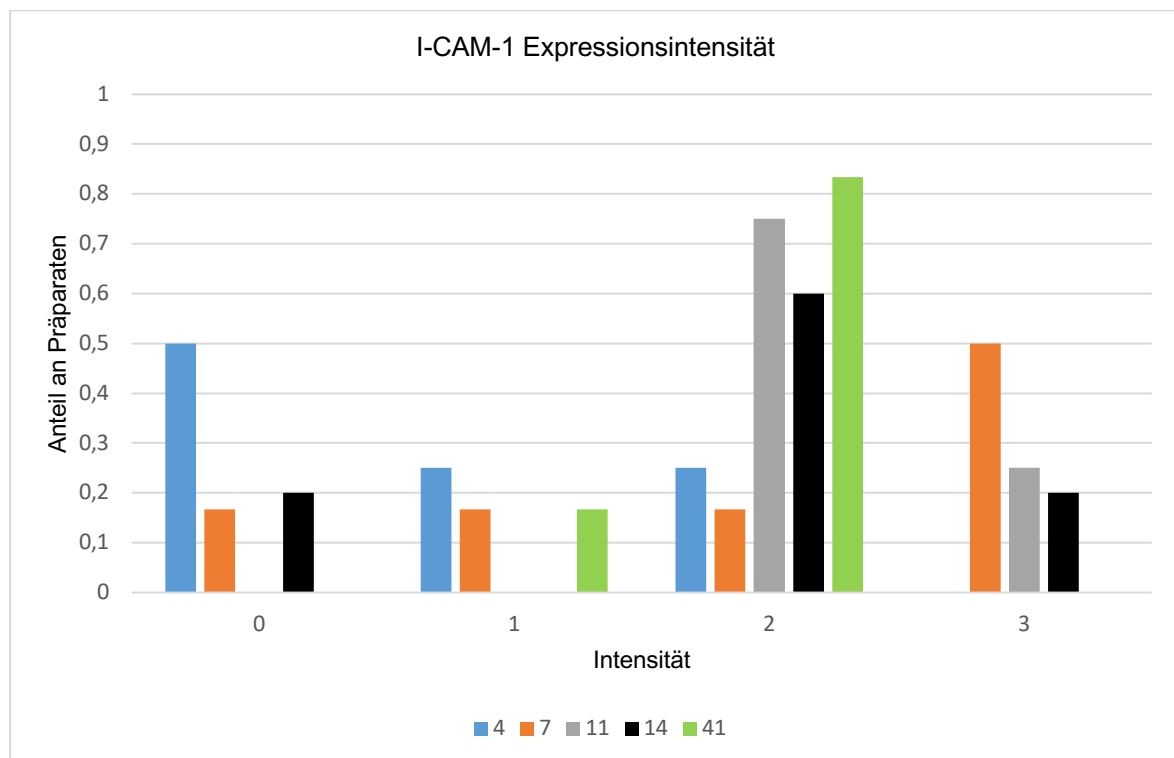


Abbildung 26: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose (y-Achse) pro Mauskohorte, die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(++/2)

oder starke (+++/3) Expression (x-Achse) für ICAM-1 aufweisen. Die Legende gibt an, welcher Farbbalken welcher Überlebenszeit entspricht.

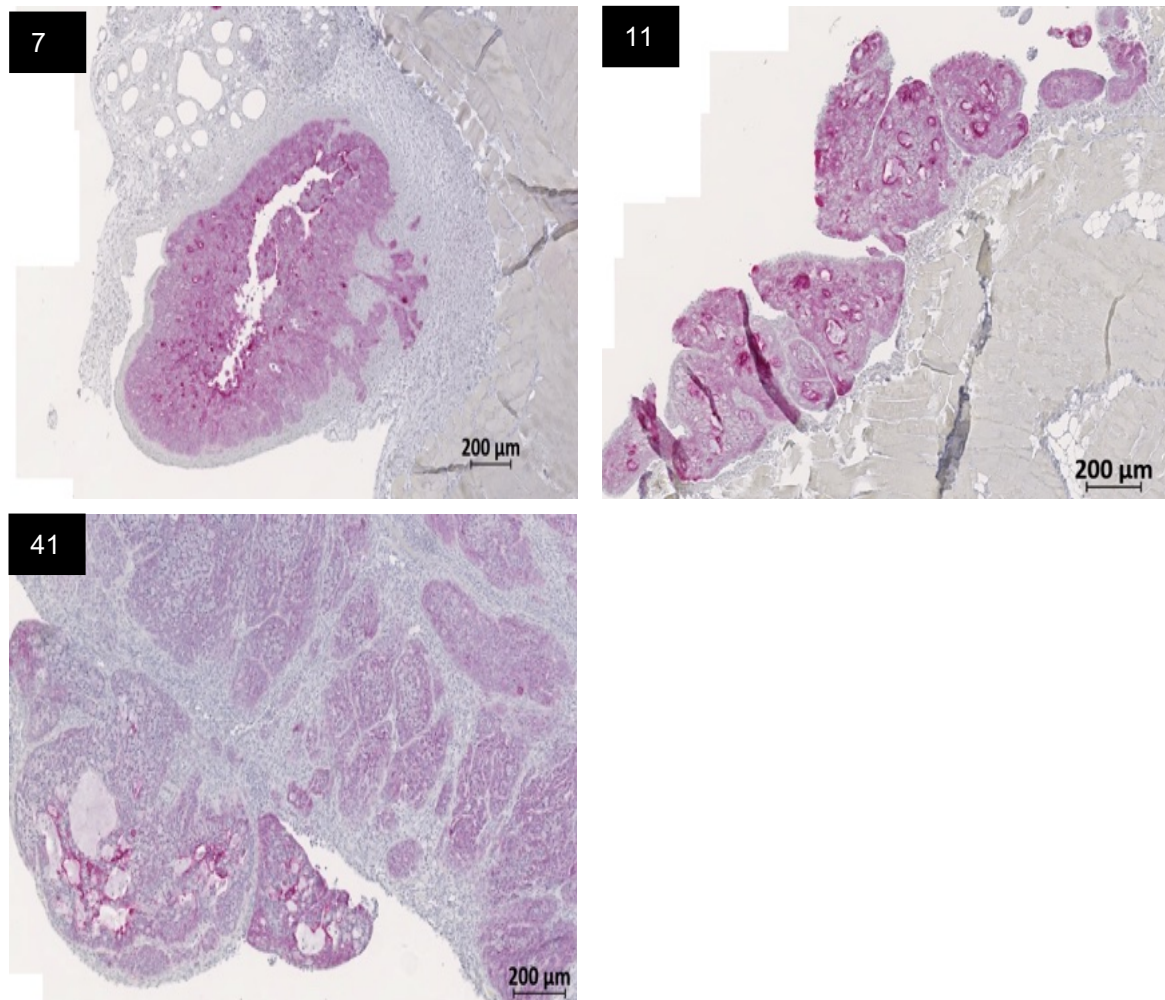


Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung mit ICAM, exemplarisch mit einer starken Expression bei Präparat 216-1-20 (7) und Präparat 224-2-20 (11) und Präparat 270-1-20 (41) mit einer mittelgradigen Expression (++/2).

4.4.3 Cadherine und Vimentin

4.4.3.1 Übersicht über die IHC Färbung der Cadherine und Vimentin

E-Cadherin wurde, mit Ausnahme bei einem Präparat aus der Mauskoorte mit einem Überleben von 14 Tagen, auf allen TZV exprimiert. Vimentin und N-Cadherin wurden dagegen nicht von den Tumorzellverbänden exprimiert. Die Ausnahme bildet ein Präparat aus der Mauskoorte mit einem Überleben von 4 Tagen, welches als einziges Präparat eine positive Expression von N-Cadherin zeigte.

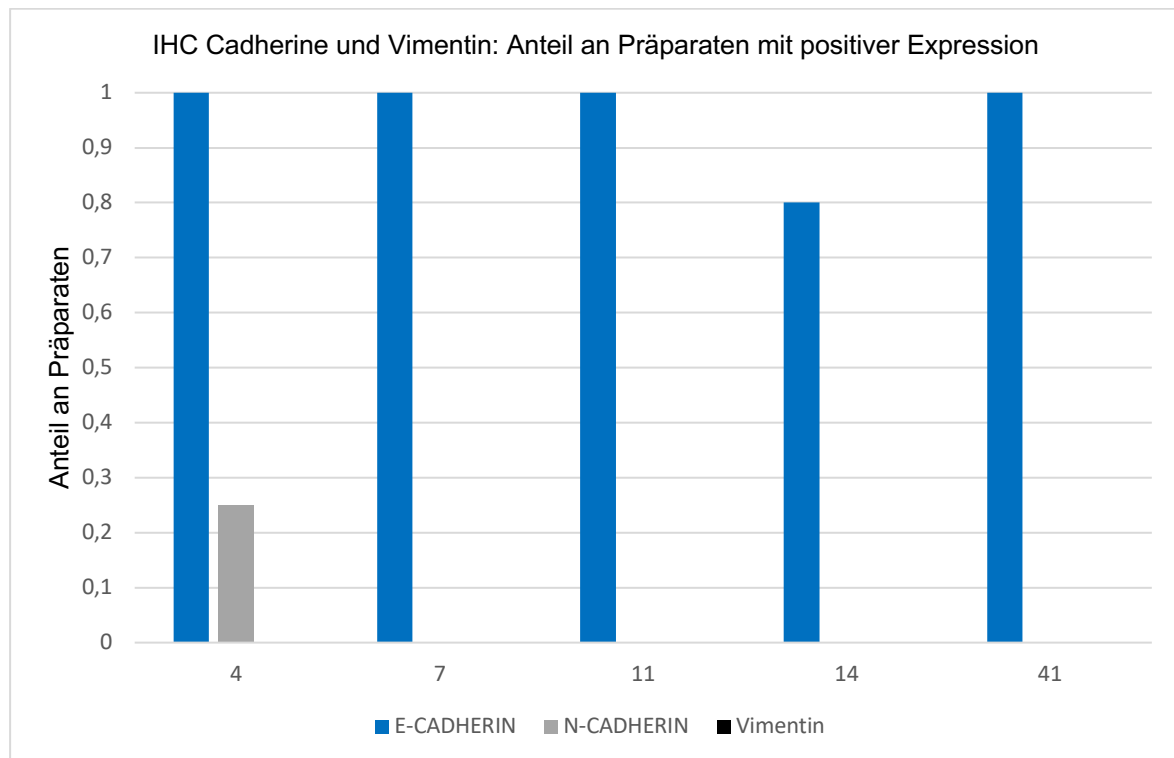


Abbildung 28: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose und positiver Expression der untersuchten Cadherine und Vimentin. Die X-Achse gibt das Überleben in Tagen an.

4.4.3.2 N-Cadherin

Der Befund auf N-Cadherin Expression war bei allen Präparaten negativ (-/0). Dementsprechend wiesen die Tumorzellen der in unserem Beobachtungszeitraum untersuchten Mäuse keine positive Expression für N-Cadherin auf, mit Ausnahme von einem Präparat in der Mauskoorte mit einem Überleben von 7 Tagen, welches eine starke Expression (+++/3) für N-Cadherin zeigte (Vergleich Abbildung 29 - 4).

Tabelle 22: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen N-Cadherin Expression

N-Cadherin	Anzahl der Präparate mit einer positiven Expression	Anzahl der Präparate mit negativer Expression	Anteil an Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose und positiver Expression
Überleben in Tagen			
4	16,7(0%)	83,3 (100%)	1 von 4 (25%)
7	0 (0%)	6 (100%)	0 von 6 (0%)
11	0 (0%)	6 (100%)	0 von 4 (0%)
14	0 (0%)	6 (100%)	0 von 5 (0%)
41	0 (100%)	0 (100%)	0 von 6 (0%)

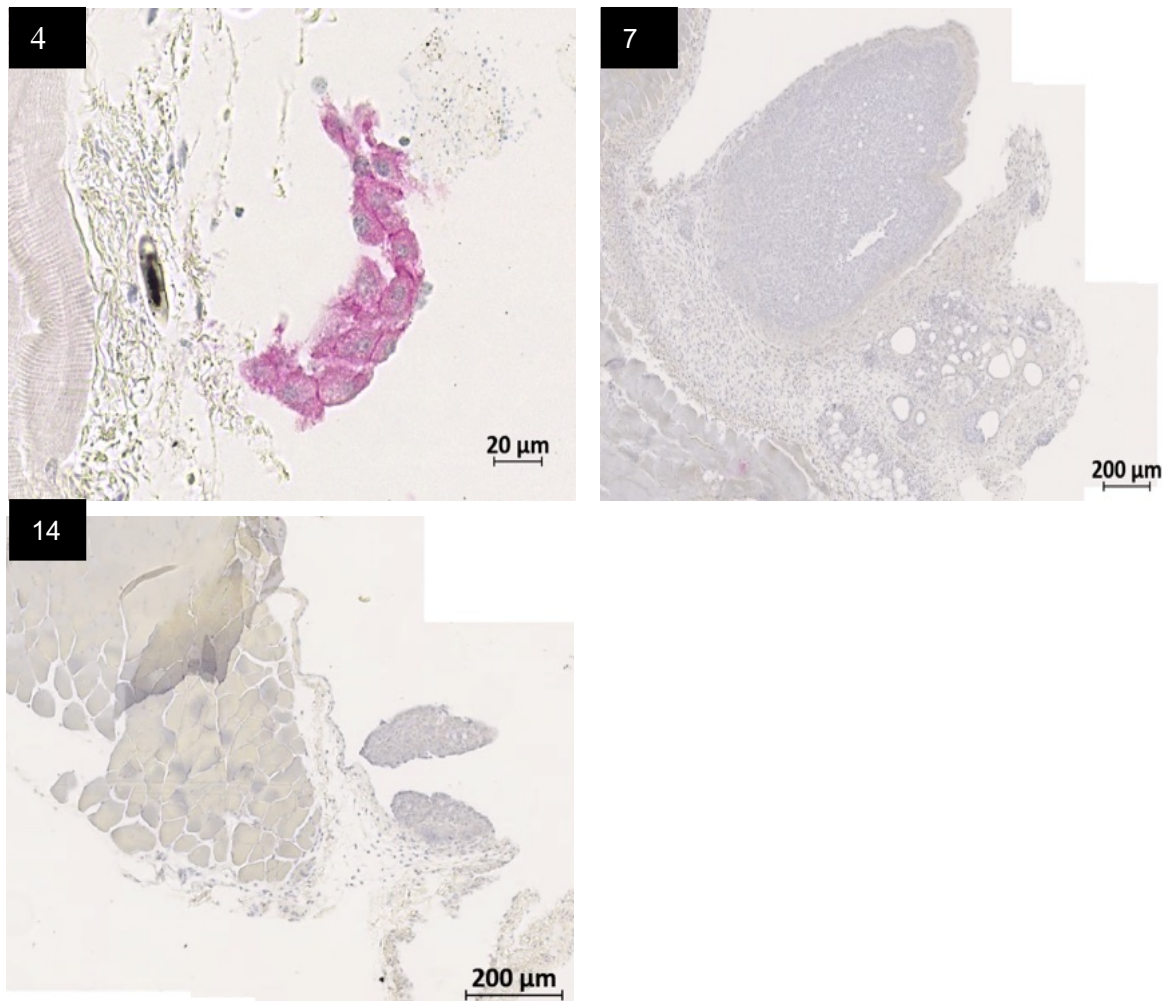


Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung mit N-Cadherin, exemplarisch einzige Präparat mit einer positiven und starke Expression (+++/3) aus der Mauskoorte mit einem Überleben von 4 Tagen –Präparat 212-3-20 (4) und exemplarisch Präparat 216-1-20 (7) und Präparat 233-1-20 (14) mit einer negativen (-/0) Expression.

4.4.3.3 E-Cadherin

Die IHC Färbung für E-Cadherin zeigte, dass bei allen Präparaten, bei denen mikroskopisch eine peritoneale Karzinose nachweisbar war, E-Cadherin exprimiert wurde. Ausgenommen davon war ein Präparat aus der Mauskoorte mit einem Überleben von 14 Tagen, wo lediglich 4 von 5 Präparate mit nachweisbaren peritonealer Karzinose E-Cadherin exprimierten. Die Intensität der IHC Färbungen und damit die Stärke der Expression variierte in der Mauskoorte mit einem Überleben von 4 Tagen zwischen einer schwachen Expression (+/1) und starken Expression (+++/3). Die anderen Mauskoorten ab einer Überlebenszeit von 7 Tagen zeigten für alle Präparate mit nachweisbarer peritonealen Karzinose eine starke (+++/3) Expression für E-Cadherin. Die Ausnahme bilden 2 Präparate aus der Mauskoorte mit einem Überleben von 14 Tagen, wo ein Präparat eine schwache Expression (+/1) und ein Präparat keine Expression (0/-) für E-Cadherin aufwies.

Tabelle 23: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen E-Cadherin Expression

E-Cadherin	Anzahl der Präparate mit einer positiven Expression	Anzahl der Präparate mit negativer Expression	Anteil an Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose und positiver Expression
Überleben in Tagen			
4	4(66,7%)	2(33,3%)	4 von 4 (100%)
7	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)
11	4 (66,7%)	2 (33,3%)	4 von 4 (100%)
14	4 (66,7%)	2 (33,3%)	4 von 5 (80%)
41	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)

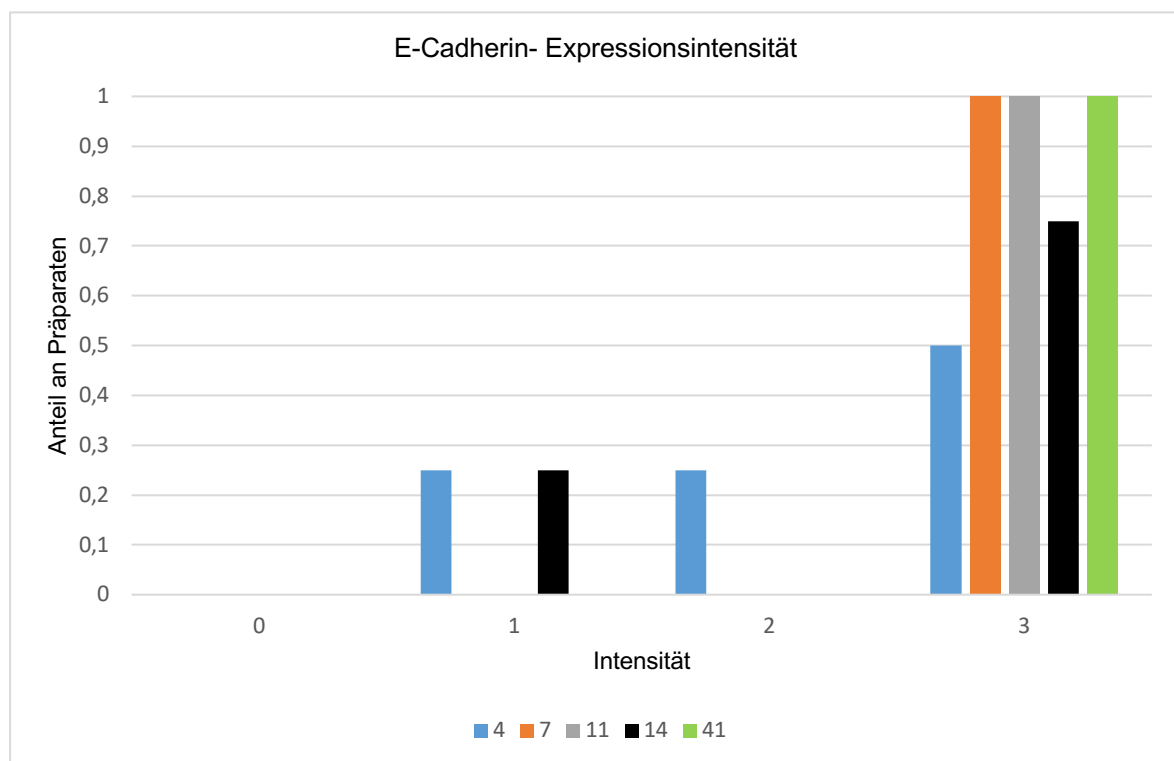


Abbildung 30: Anteil an Präparaten (y-Achse) pro Mauskoorte, die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(+/2) oder starke (+++/3) Expression (x-Achse) für E-Cadherin aufweisen.

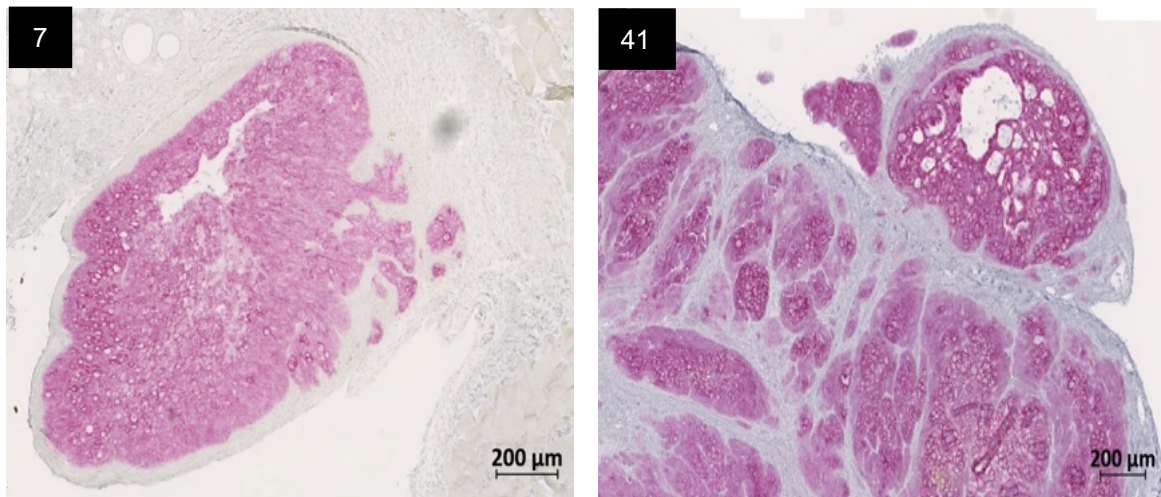


Abbildung 31: Immunhistochemische Färbung mit E-Cadherin, exemplarisch Präparat 216-1-20 (7) und 270-1-20 (41) mit einer starken Expression (+++/3).

4.4.3.4 Vimentin

Für die Vimentin Expression zeigte die Immunhistochemie für alle Präparate eine negative (-/0) Expression. Dementsprechend wiesen die Tumorzellen der in den in unserem Beobachtungszeitraum untersuchten Mäusen offensichtlich keine Expression von Vimentin auf (Vergleich Abbildung 32).

Tabelle 24: Vimentin Expressionsmuster zusammengefasst für die Mauskohorten nach dem Überleben in Tagen

Vimentin	Anzahl der Präparate mit einer positiven Expression	Anzahl der Präparate mit negativer Expression	Anteil an Präparaten mit nachweisbarer peritonealen Karzinose und positiver Expression
Überleben in Tagen			
4	0(0%)	6 (100%)	0 von 4 (0%)
7	0 (0%)	6 (100%)	0 von 6 (0%)
11	0 (0%)	6 (100%)	0 von 4 (0%)
14	0 (0%)	6 (100%)	0 von 5 (0%)
41	0 (100%)	0 (100%)	0 von 6 (0%)

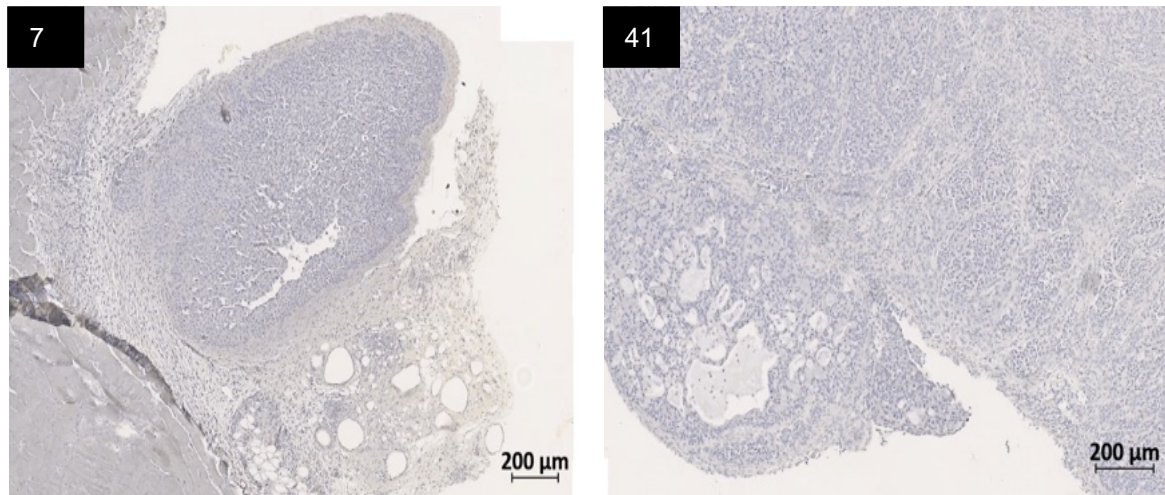


Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung mit Vimentin, alle Präparate wiesen eine negative Expression (-/0) vor, exemplarisch Präparat 216-1-20 (7) und Präparat 270-1-20 (41).

4.4.4 CD44

Die IHC Färbung für die Expression von CD44 zeigte, dass der Anteil der Präparate, die CD44 exprimieren, mit zunehmender Beobachtungszeit steigt (vergleiche Abbildung 28). Während bei der Mauskoorte mit einem Überleben von 4 Tagen die Hälfte der Präparate mit peritonealer Karzinose CD44 exprimierten, war bei der Mauskoorte mit einem Überleben von 7 Tagen schon bei etwas über 80% der Präparate eine positive Expression vorzufinden. Ab einem Überleben von 11 Tagen konnte bei allen Präparaten mit nachweisbarer peritonealer Karzinose eine positive Expression für CD44 vorgefunden werden.

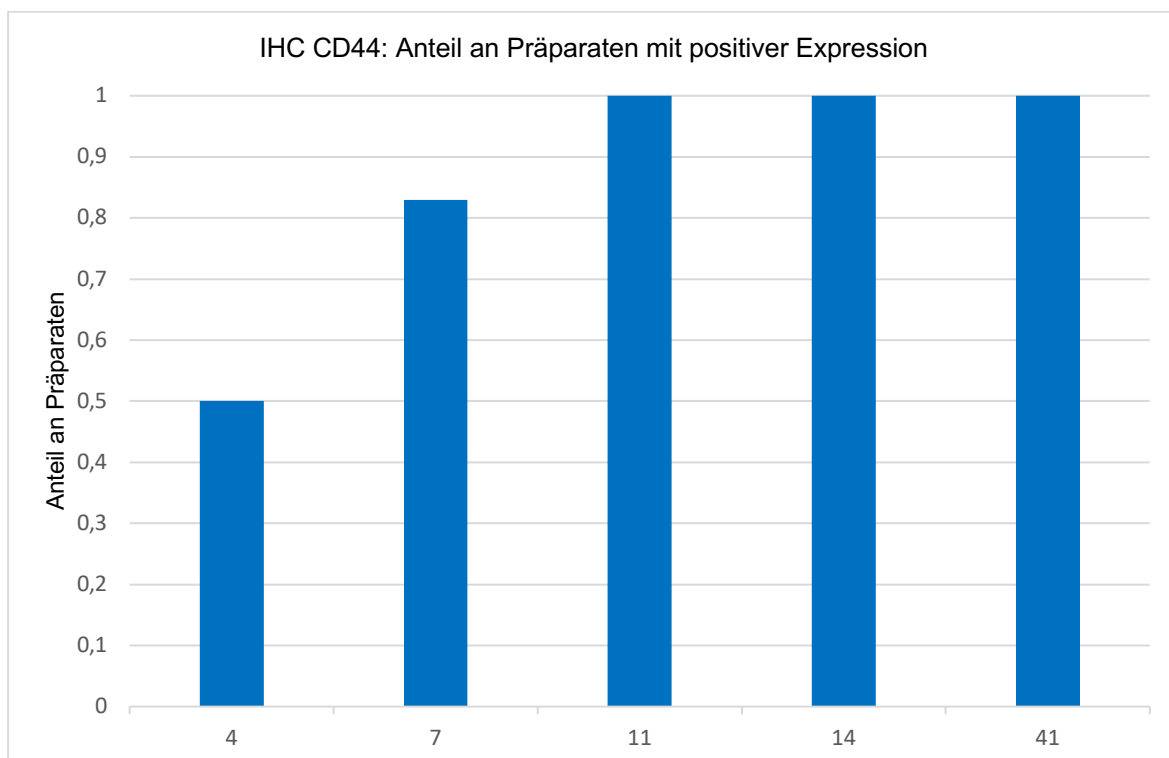


Abbildung 33: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose und positiver CD44 Expression. Die X-Achse gibt das Überleben in Tagen an.

Tabelle 25: CD44 Expressionsmuster zusammengefasst für die Mauskohorten nach dem Überleben in Tagen

CD44	Anzahl der Präparate mit einer positiven Expression	Anzahl der Präparate mit negativer Expression	Anteil an Präparaten mit nachweisbarer peritonealen Karzinose und positiver Expression
Überleben in Tagen			
4	2(33,4%)	4(66,7%)	2 von 4 (50%)
7	5 (83,3%)	1 (16,7%)	5 von 6 (83,3%)
11	4 (66,7%)	2 (33,3%)	4 von 4 (100%)
14	4 (66,7%)	2(33,4%)	5 von 5 (100%)
41	6 (100%)	0 (0%)	6 von 6 (100%)

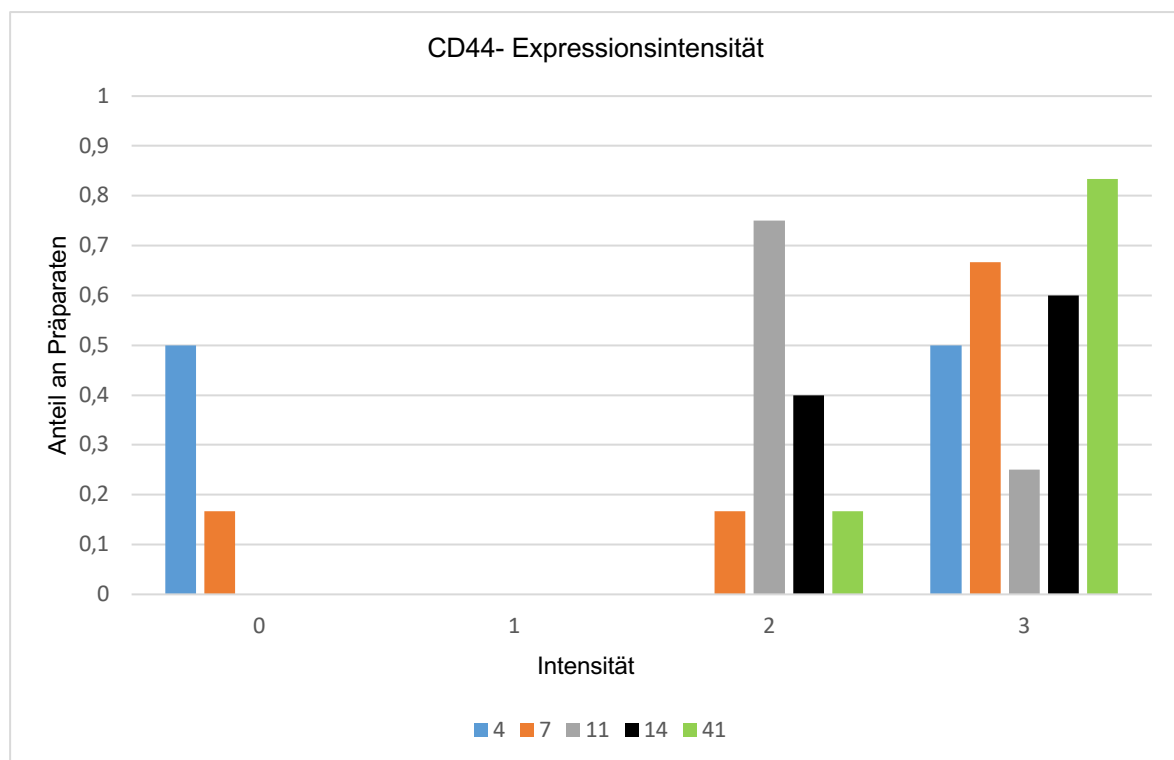


Abbildung 34: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose (y-Achse) pro Mauskohorte, die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(+/+/2) oder starke (+/+/+/3) Expression (x-Achse) für CD44 aufweisen.

Bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 4 Tagen zeigten die beiden Präparate mit einer positiven CD44 Expression eine starke Expression (+/+/+/3) für CD44. In der Mauskohorte mit einem Überleben von 7 Tagen schwankte die Expression zwischen einer negativen (-/0) und hohem Expressionslevel (+/+/+/3) mit einem Präparat, welches

keine (-/0), einem welches eine mittelgradige(++/2) und 4 Präparaten, welche eine starke Expression (+++/3) vorwiesen. Bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 11 Tagen zeigte nur ein Präparat eine starke Expression (+++/3) für CD44 vor. Damit hat die Mauskohorte mit einem Überleben von 11 Tagen den geringsten Anteil an Präparaten mit einer starken (+++/3) CD44 Expression. Bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 14 und 41 Tagen zeigte die Mehrheit der Präparate eine starke CD44 Expression (+++/3). Jeweils

7 Tagen zeigte anderen Präparaten wiesen eine mittelgradige (1Präparat) und hohe CD44 Expression (4 Präparate) auf. Bei der Mauskohorte mit einem Überleben zeigten 2 Präparate ein mittelgradiges Expressionslevel (++/2) für CD44 und 3 Präparate ein hohes Expressionslevel (+++/3) auf. Bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 41 Tagen zeigten 5 Präparate ein hohes Expressionslevel (+++/3) und ein Präparat ein mittelgradiges Expressionslevel (++/2) für CD44 auf. CD44An Tag 14 und 41 wiesen jedoch die Mehrheit der Präparate in der Regel bei ungefähr 25% der Fläche eines TZV keine CD44 Expression auf.

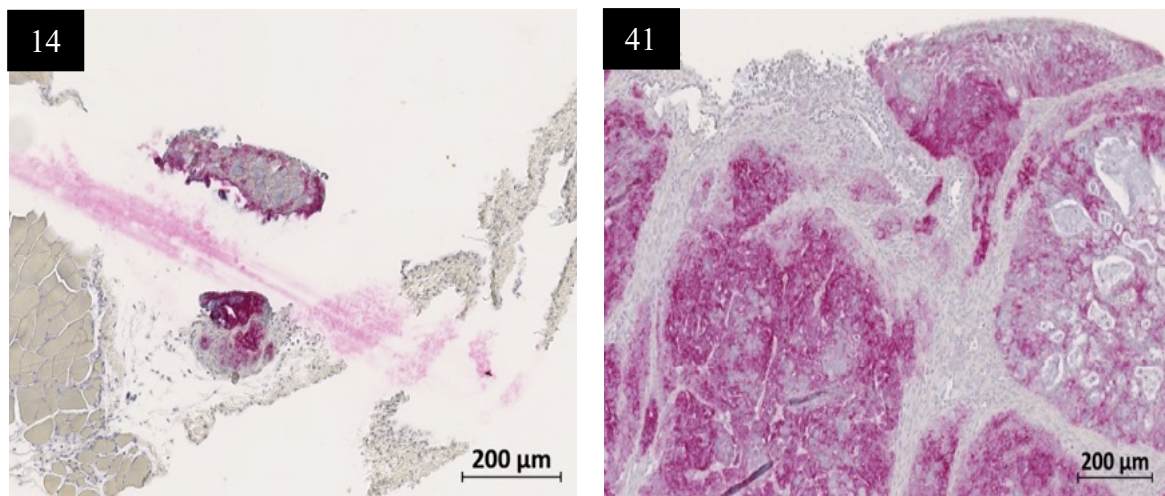


Abbildung 35: Immunhistochemische Färbung mit CD44 Expression, exemplarisch Präparat 224-2-20 (11) mit einer mittelgradigen (++) und Präparat 270-1-20 (41) mit einer starken (+++) Expression.

4.5 Immunhistochemische Färbungen mesothelialer Zellen des Peritoneums

4.5.1 Mesothelin

Bei der IHC-Färbung mit Mesothelin wurde beurteilt, ob das Mesothel an der Anheftungsstelle der Tumorzellen intakt oder unterbrochen ist. Bei allen Präparaten mit TZV konnte über alle Mauskohorten hinweg eine Unterbrechung des Mesothels an der Anheftungs- beziehungsweise Invasionsstelle des TZV beobachtet werden.

Nur bei jeweils einem Präparat aus der Gruppe mit einem Überleben von 7 und 14 Tagen war das Mesothel an der Anheftungsstelle der TZV noch intakt. Bei einem Teil der Präparate war es nicht möglich eine Aussage in Bezug zur Intaktheit des Mesothels an der Anheftungsstelle der TZV zu treffen. Dies war der Fall, wenn gar kein Mesothel am gesamten Präparat detektiert werden konnte, wenn keine TZV beim Präparat vorhanden waren oder wenn das Mesothel nur spärlich in einigen wenigen Bereichen erhalten geblieben war (s. Methoden Abschnitt 3.18). Präparate, denen die Zahl 2 zugeordnet wurde, waren entsprechend nicht auswertbar in Bezug auf die Fragestellung, ob das Mesothel an der Anheftungsstelle der TZV intakt war. Eine Übersicht zu dem Verhalten des Mesothels an der Anheftungsstelle der TZV, sortiert nach dem Überleben in Tagen, ist in nachfolgender Abbildung zu sehen.

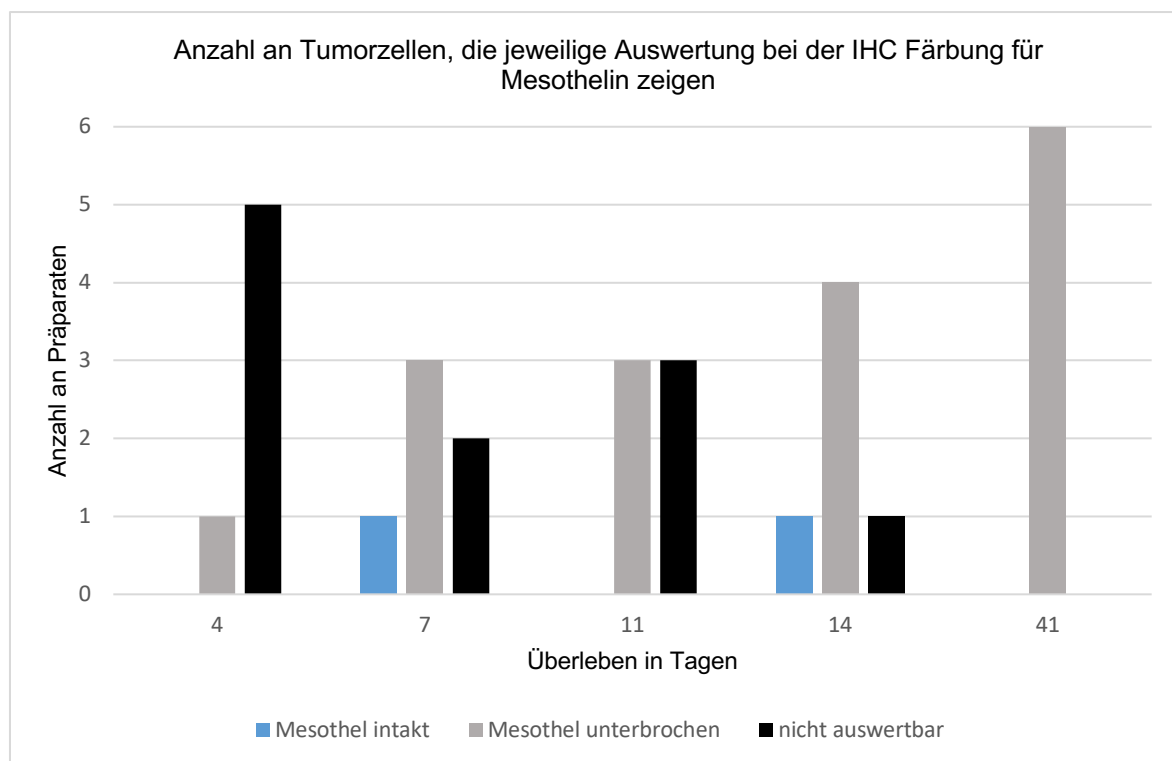


Abbildung 36: Verhalten des Mesothels an der Anheftungsstelle der TZV. Anzahl an Präparaten (y-Achse) je Mauskoorte (gruppiert nach dem Überleben in Tage auf der x-Achse), bei denen das Mesothel an der Anheftungsstelle des TZV noch intakt ist (blau), das Mesothel an der Anheftungsstelle unterbrochen ist (grau) und Anzahl an Präparaten, die nicht auswertbar sind (grau).

Darüber hinaus konnte bei den meisten Präparaten beobachtet werden, dass das Mesothel die intraperitoneale Karzinose teilweise (exemplarisch Abbildung 37- 4.) bis vollständig (exemplarisch Abbildung 37- 14.) überdeckte.

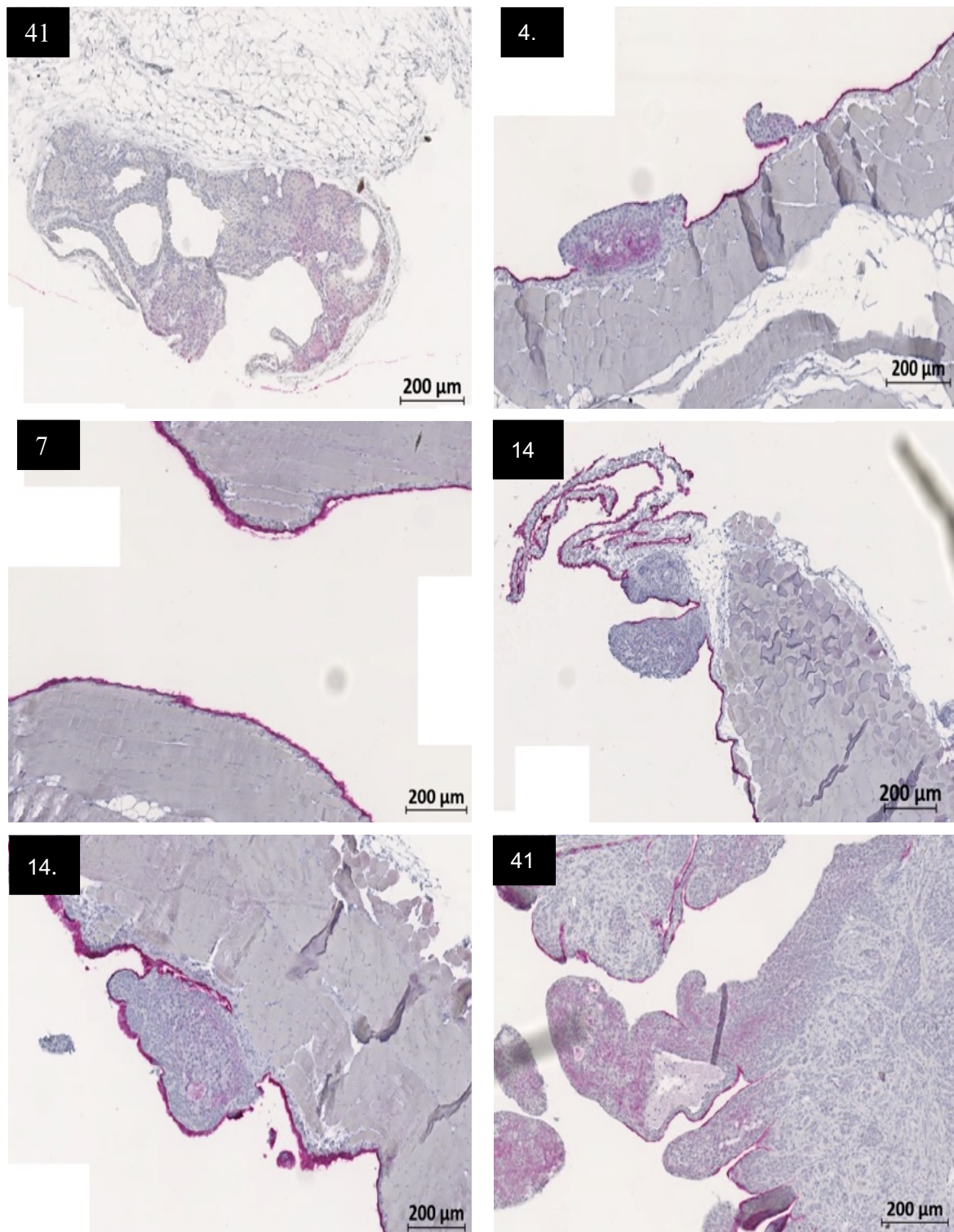


Abbildung 37: Immunhistochemische Färbung mit Mesothelin, exemplarisch Mauskoorten mit einem Überleben von 4 Tagen – Präparat 212-2-20 (4.) und 212-5-20 (4.), 7 Tagen- Präparat 216-2-20 (7), 11 Tage- Präparat 224-2-20 (11), 14 Tagen- Präparat 233-1-20 (14) und Präparat 233-5-20 (14.) und 41 Tagen-Präparat 270-5-20 (41.)

4.6 Immunhistochemische Färbung der Zellen in Agar

Tumorzellen aus einer Zellsuspension (s. Methoden 3.8), wurden in Agar in Paraffin eingebettet. Bei diesen konnten von insgesamt 6 Präparaten pro Mauskoorte mit der

gleichen Überlebenszeit, keine Tumorzellen bei den Mauskohorten mit einem Überleben von 4 Tagen vorgefunden werden, bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 7 und 14 Tagen konnte man bei 2 von 6 Präparaten Tumorzellen detektieren. Bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 11 und 41 Tagen bei 4 von 6 Präparaten. Bei den Präparaten, bei denen sich Tumorzellverbände fanden, konnte bei allen Tumorzellverbänden eine Expression für CD44, Integrin $\beta 1$ und L1CAM nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte bei allen Mauskohorten (mit Ausnahme für die Mauskohorte mit einem Überleben von 4 Tagen) in einigen Fällen eine Expression für EpCAM, Integrin $\beta 4$, CEACAM7 und E-Cadherin nachgewiesen werden. Allerdings konnte nicht bei allen Tumorzellverbänden eine positive Expression für diese Antigene nachgewiesen werden. Beispielsweise exprimierten alle Tumorzellverbände der Mauskohorte mit einem Überleben von 7 und 11 Tagen EpCAM. Bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 14 Tagen aber nur ein Präparat von zwei und bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 41 Tagen 3 von 4 Präparaten (Vergleich Tabelle 26).

ICAM-1 wurde nicht von den Tumorzellverbänden der 7-Tage Kohorte exprimiert. Bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 11 Tagen wiesen 3 von 4, bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 14 Tagen ein von zwei Präparaten und bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 41 Tagen alle Präparate mit Tumorzellverbänden eine positive Expression auf.

Durchgängig keine Expression zeigten die Tumorzellverbände für Integrin $\beta 6$, Vimentin und Integrin $\beta 3$.

N-Cadherin wurde nur von den Tumorzellverbänden eines Präparates bei der Mauskohorte mit einem Überleben von 11 und 41 Tagen exprimiert. Ähnliches lässt sich für Integrin αV beobachten. Hier konnte nur bei 2 von 4 Präparaten aus der Mauskohorte mit einem Überleben von 41 Tagen eine positive Expression für Integrin αV nachgewiesen werden.

Tabelle 26: Anteil der Präparate mit einer positiven Expression der jeweiligen Antigene bei den Tumorzellverbänden der Zellen in Agar.

Zellen in Agar	Überleben in Tagen und Anzahl an Präparaten mit Tumorzellverbänden von insgesamt n =6 Präparaten	4 (n=0)	7 (n=2)	11 (n=4)	14 (n=2)	41 (n=4)
Zelladhäsionsmolekül und entsprechender Anteil an						

Tumorzellverbänden mit positiver Expression						
CD44		0	1	1	1	1
CEACAM7		0	0,5	0,75	0,5	1
E-Cadherin		0	1	0,5	0,5	0,75
EpCAM		0	1	1	0,5	0,75
ICAM		0	0	0,75	0,5	1
Integrin α V		0	0	0	0	0,5
Integrin β 1		0	1	1	1	1
Integrin β 3		0	0	0	0	0
Integrin β 4		0	0,5	1	0,5	1
Integrin β 6		0	0	0	0	0
L1CAM		0	1	1	1	1
N-Cadherin		0	0	0,25	0	0,25
Vimentin		0	0	0	0	0

4.7 Auswertung ALU-PCR

4.7.1 ALU-PCR Blut

Die Fernmetastasierungen wurden in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach der peritonealen Injektion der Tumorzellen betrachtet. Die Anzahl der im Blut zirkulierenden Tumorzellen war bei den Mauskoorten mit einem Überleben von 4, 7, 11 und 14 Tagen nicht signifikant unterschiedlich. Im Durchschnitt war bei der Mauskoorte mit einem Überleben von 4 Tagen die geringste durchschnittlich Anzahl Tumorzellen pro 60ng Blut DNA mit 0,002 (SD 0,004). Bei der Mauskoorte mit einem Überleben von 7 Tagen waren durchschnittlich 0,03 (SD 0,04) Tumorzellen pro 60 ng Blut DNA nachweisbar. Die Mauskoorten mit einem Überleben von 11 und 14 Tagen wiesen im Durchschnitt 0,01 (SD 0,02) Tumorzellen pro 60 ng Blut DNA auf. Die Anzahl von humanen Zellen (und damit Tumorzellen) pro 60ng Blut DNA ist für die Mauskoorte der Überlebenszeit von 41 Tagen mit durchschnittlich mit 0,19 (SD 0,2) Tumorzellen am größten. Dies sind im Vergleich zu den Mauskoorten mit einer kürzeren Überlebenszeit signifikant ($p < 0,05$) mehr Tumorzellen pro 60 ng Blut DNA (Abbildung 38).

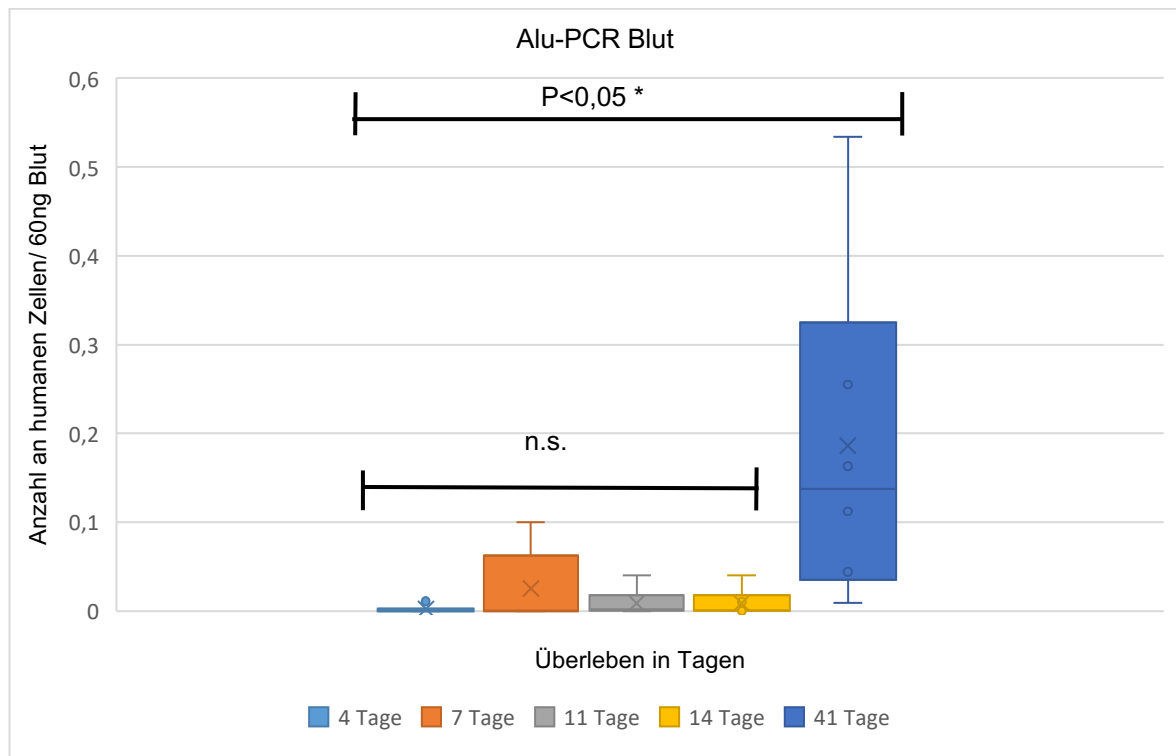


Abbildung 38: Durch ALU-PCR ermittelte hämatogene Fernmetastasierung für die Mauskohten mit einer Überlebenszeit von 4, 7, 11, 14 und 41 Tagen (x-Achse) nach peritonealer Injektion der Tumorzellen: Die Mauskohten mit einem Überleben von 41 Tagen hat signifikant mehr Tumorzellen pro 60ng Blut DNA im Vergleich zu den anderen Mauskohten mit einer kürzeren Überlebenszeit. Die Anzahl an Tumorzellen im Blut unterscheidet sich für die Mauskohten mit einem Überleben von 4,7,11 und 14 Tagen nicht signifikant untereinander. Die statistische Auswertung erfolgte nach der Man Whitney Testung mit $p<0,05$ als Signifikanzniveau.

4.7.2 Alu-PCR Leber

Die Metastasierung in die Leber der Tiere unterschied sich für die Mauskohten mit einem Überleben von 4, 7, 11, 14 und 41 Tagen nicht signifikant voneinander. Im Durchschnitt waren bei der Mauskohte mit einem Überleben von 41 Tagen die geringste Anzahl an Tumorzellen pro 60ng Leber DNA mit 1,1 Tumorzellen (SD 1,12) vorhanden. Die höchste durchschnittliche Anzahl hatte die Mauskohte mit einem Überleben von 11 Tagen mit 10,45 Tumorzellen (SD 13,01) pro 60 ng Leber DNA. Die durchschnittliche Anzahl an Tumorzellen pro 60ng Leber DNA für die Mauskohte mit einem Überleben von 4 Tagen betrug 3,06 (SD 4,57), bei der Mauskohte mit einem Überleben von 7 Tagen 3,24 (SD 3,29) und bei der Mauskohte mit einem Überleben von 14 Tagen 2,91 (SD 3,5). Obwohl die Entnahme des Peritoneums zuletzt erfolgte, um die Kontaminierung anderer Gewebe durch intraperitoneale Tumorzellen zu vermeiden (vergleich Abschnitt 3.2.1), wurde das Risiko für solch eine Streuung in die Leber aufgrund der räumlichen Nähe zum Peritoneum als höher eingeschätzt. Deshalb wurden zusätzlich Gewebeschnitte von der Leber angefertigt, die immunhistochemisch auf HSP60 gefärbt und untersucht wurden. Hier konnten bei 2 Präparaten

Tumorzellverbände detektiert werden, bei denen es sich mutmaßlich um gestreute peritoneale Tumorzellen handelt (siehe Abbildung 40).

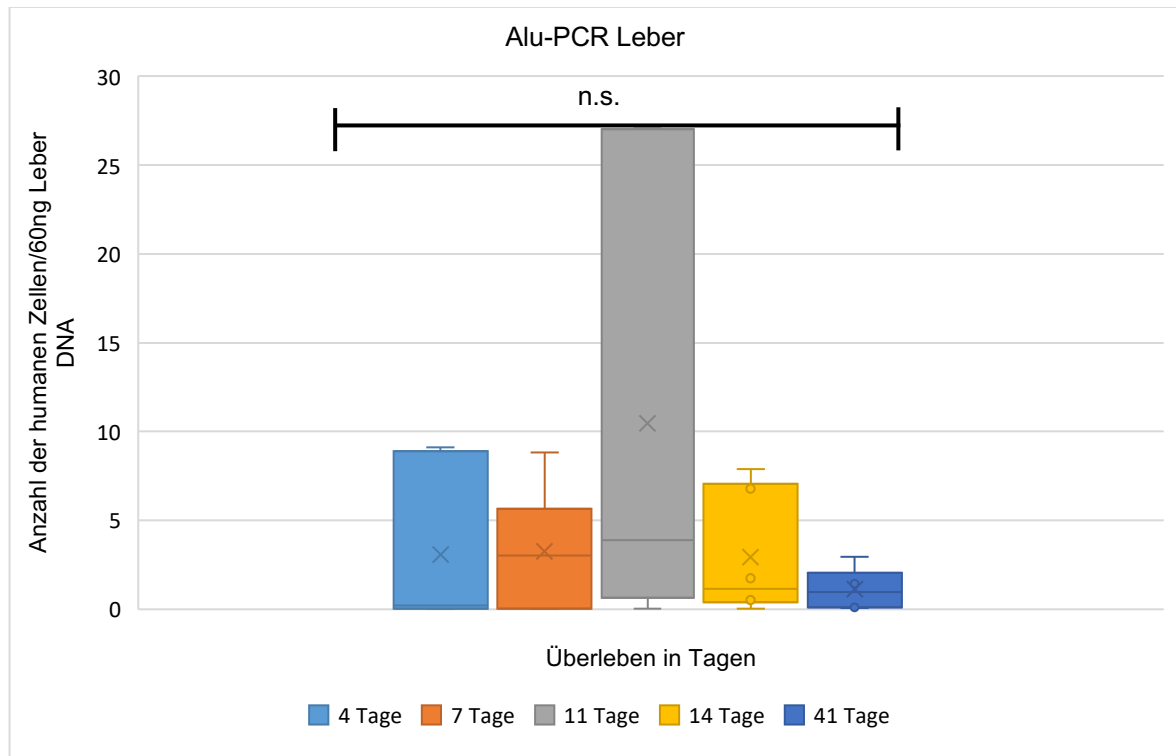
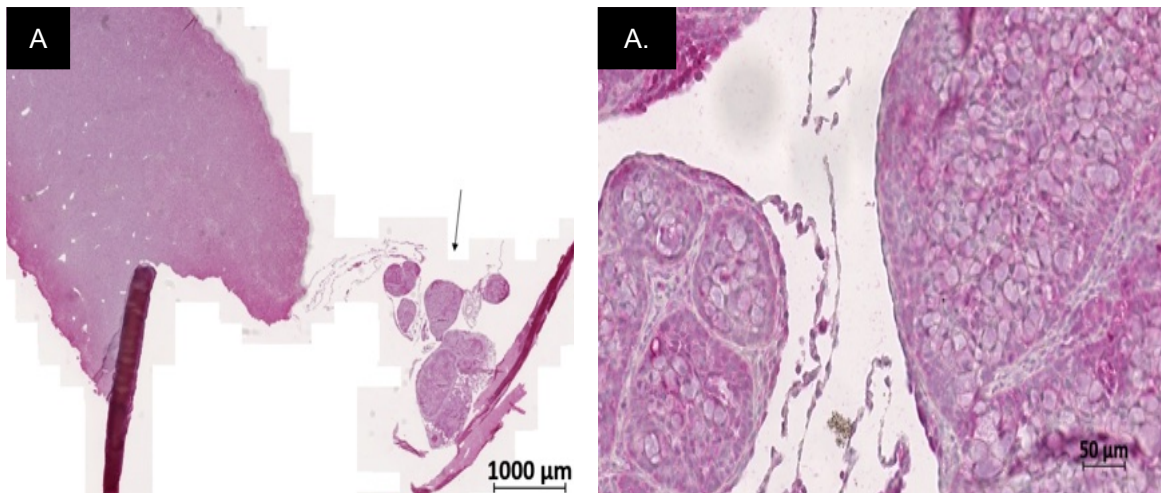


Abbildung 39: Durch ALU-PCR ermittelte hepatogene Fernmetastasierung für die Mauskoorten mit einer Überlebenszeit von 4, 7, 11, 14 und 41 Tagen (aufgetragen auf die x-Achse) nach peritonealer Injektion der Tumorzellen: Die Anzahl an Tumorzellen pro 60ng Leber DNA unterscheiden sich nicht signifikant (n.s.) voneinander. Die statistische Auswertung erfolgte nach der Man Whitney Testung mit $p < 0,05$ als Signifikanzniveau.



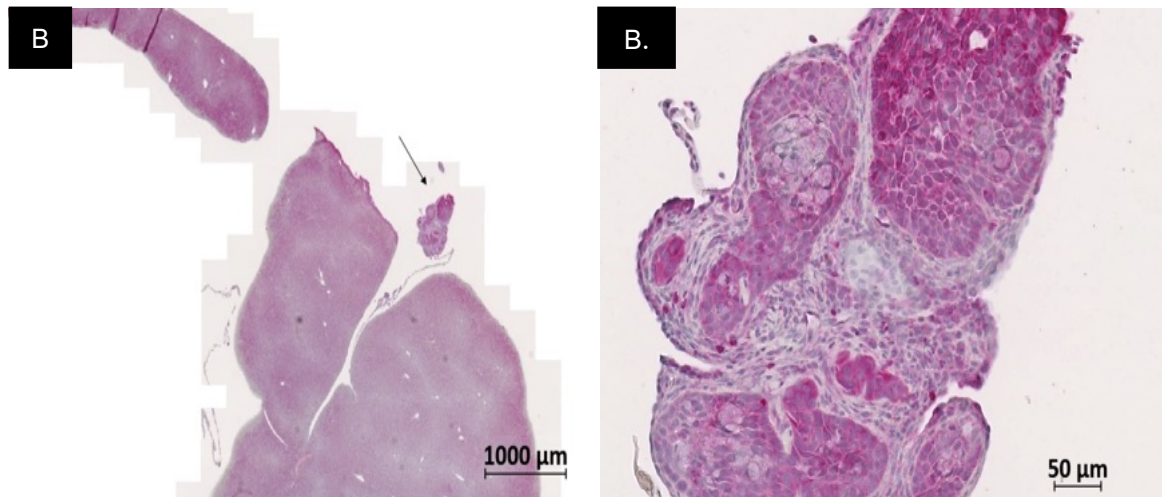


Abbildung 40: Immunhistochemische Färbung des Lebergewebes mit HSP 60. Dargestellt sind die Präparate, bei denen wahrscheinlich vom Peritoneum disseminierte Tumorzellverbände vorgefunden werden konnten. Einmal Präparat 224-4-20 aus der Mauskoorte mit einem Überleben von 11 Tagen mit einem Maßstab von 1:1000 µm (A) und einem Maßstab von 1:50 (A.). Präparat 233-1-20 aus der Mauskoorte mit einem Überleben von 14 Tagen mit einem Maßstab von 1:1000 µm (B) und einem Maßstab von 1:50 (B.). Mit dem Pfeil sind die Tumorzellverbände markiert.

4.7.3 Alu-PCR Lunge

Die pulmonale Fernmetastasierung unterschied sich für die Mauskoorten mit einem Überleben von 4, 7, 11, 14 und 41 Tagen nicht signifikant. Im Durchschnitt waren bei der Mauskoorte mit einem Überleben von 41 Tagen die höchste Anzahl Tumorzellen pro 60ng Lungen DNA mit 21,73 Tumorzellen (SD 45,1) vorzufinden. Die geringste durchschnittliche Anzahl an Tumorzellen pro 60 ng Lungen DNA hatte die Mauskoorte mit einem Überleben von 14 Tagen mit 2,29 Tumorzellen (SD 4,04) pro 60 ng Leber DNA. Die durchschnittliche Anzahl an Tumorzellen pro 60ng Leber DNA für die Mauskoorte mit einem Überleben von 4 Tagen betrug 3,63 (SD 4,47), bei der Mauskoorte mit einem Überleben von 7 Tagen 10,28 Tumorzellen (SD 10,93) und bei der Mauskoorte mit einem Überleben von 11 Tagen 2,51 (SD 4,1).

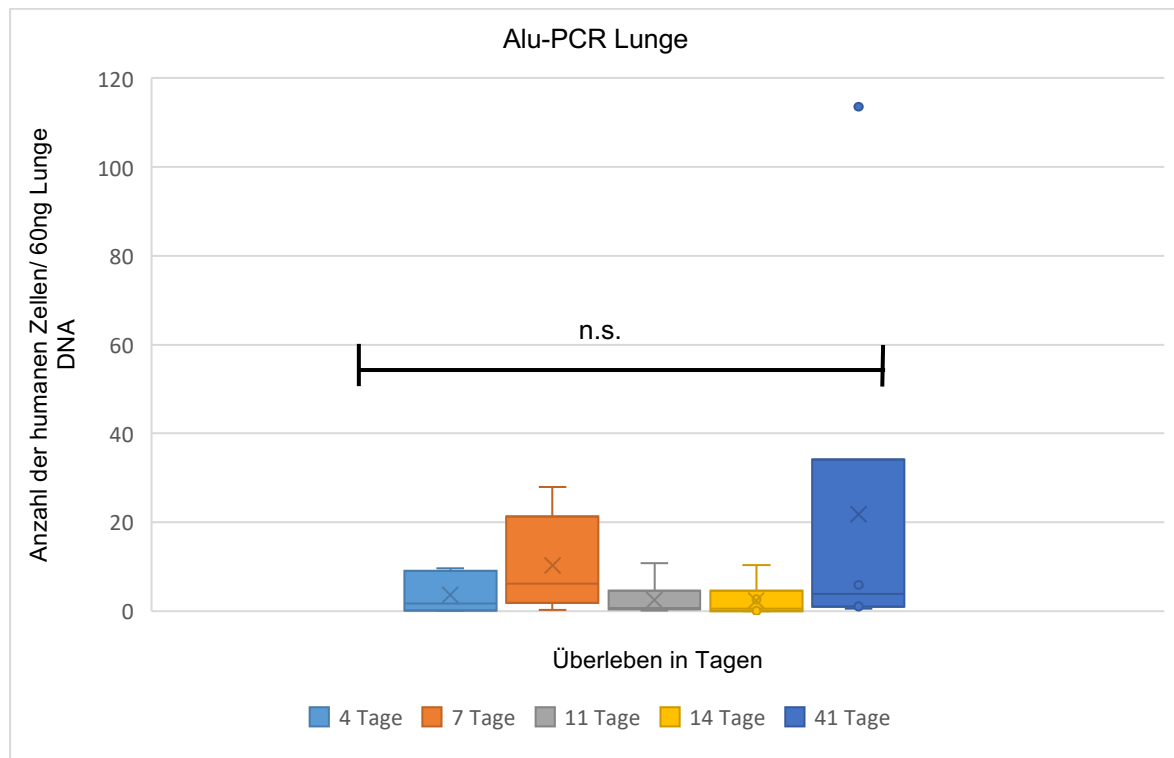


Abbildung 41: Durch ALU-PCR ermittelte pulmonale Fernmetastasierung für die Mauskoorten mit einer Überlebenszeit von 4, 7, 11, 14 und 41 Tagen (aufgetragen auf die x-Achse) nach peritonealer Injektion der Tumorzellen: Die Anzahl an Tumorzellen pro 60ng Lungen DNA unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die statistische Auswertung erfolgte nach der Man Whitney Testung mit $p < 0,05$ als Signifikanzniveau.

4.7.4 Alu-PCR Knochenmark

Die Fernmetastasierung in das Knochenmark unterschied sich zwischen den Mauskoorten mit einem Überleben von 4, 7, 11, und 14 Tagen sowie zwischen der Mauskoorte mit einem Überleben von 41 Tagen im Vergleich zu der Mauskoorte mit einem Überleben von 7 und 11 Tagen nicht signifikant. Im Durchschnitt waren bei der Mauskoorte mit einem Überleben von 7 Tagen die geringste Anzahl an Tumorzellen pro 60ng Knochenmark DNA mit 0,00004 Tumorzellen (SD 0,00003) vorhanden. Die höchste durchschnittliche Anzahl hatte die Mauskoorte mit einem Überleben von 11 Tagen mit 0,15 Tumorzellen (SD 0,34) pro 60 ng Knochenmark DNA. Die durchschnittliche Anzahl an Tumorzellen pro 60ng Knochenmark DNA für die Mauskoorte mit einem Überleben von 4 Tagen betrug 0,012 (SD 0,03) und bei der Mauskoorte mit einem Überleben von 14 Tagen 0,005 (SD 0,008) und unterschied sich signifikant von der Anzahl an Tumorzellen pro 60ng Knochenmark DNA im Vergleich zu der Mauskoorte mit einem Überleben von 41 Tagen. Hier sind durchschnittlich 0,042 (SD 0,04) Tumorzellen pro 60ng Knochenmark DNA vorzufinden (Abbildung 42).

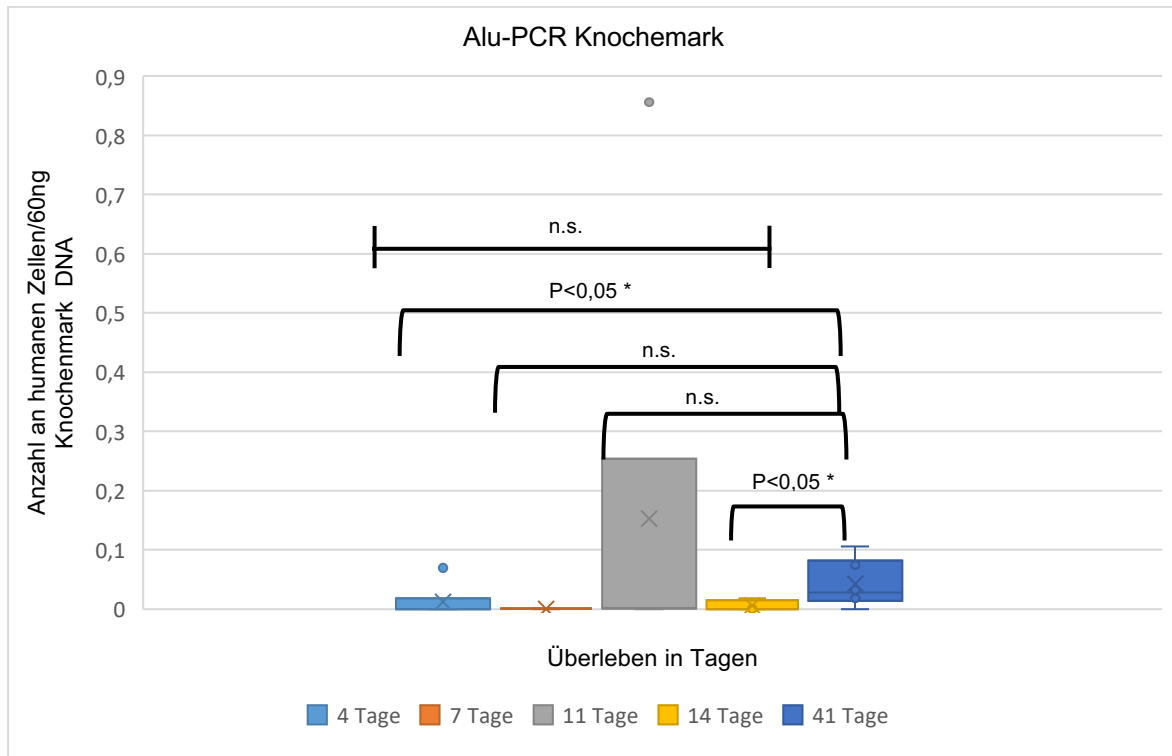


Abbildung 42: Durch ALU-PCR ermittelte Fernmetastasierung in das Knochenmark für die Mauskoorten mit einer Überlebenszeit von 4, 7, 11, 14 und 41 Tagen (aufgetragen auf die x-Achse) nach peritonealer Injektion der Tumorzellen. Die Anzahl an Tumorzellen pro 60ng Knochenmark DNA ist bei der Mauskoorte mit einem Überleben von 41 Tagen signifikant mehr als in der Mauskoorte mit einem Überleben von 4 und im Vergleich zu der Mauskoorte mit einem Überleben von 14 Tagen. Die Unterschiede in der Anzahl der metastasierten Tumorzellen zwischen den anderen hier betrachteten Überlebenszeiten sind nicht signifikant. Die statistische Auswertung erfolgte nach der Man Whitney Testung mit $p < 0,05$ als Signifikanzniveau.

5 Diskussion

Das Pankreaskarzinom ist eine der tödlichsten bösartigen Erkrankungen. Dabei stellt die Metastasierung die führende Todesursache bei Krebserkrankungen dar. Es wird angenommen, dass eine mögliche Erklärung für die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms eine frühe Metastasierung ist. Somit liegt zum Zeitpunkt der Diagnose meistens bereits eine systemische Erkrankung vor (Yachida et al., 2010).

Gestützt wird dies durch die Beobachtungen, dass es auch nach chirurgischer Resektion des Primärtumors häufig zu Rezidiven kommt - entweder lokal oder in Form von Fernmetastasen (Wolfgang et al., 2013). Eine Studie von Rhim et al. konnte zeigen, dass in einem Stadium, in dem das PDAC histologisch noch als präinvasiv gilt, bereits ein Eintritt von Tumorzellen in den Blutkreislauf und eine Besiedlung der Leber auftritt. Dies lässt annehmen, dass es sogar vor der Bildung eines (makroskopisch erkennbaren) Primärtumors zu einer Aussaat von Tumorzellen in entfernte Organe kommen kann (Rhim et al., 2012).

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie sich das Ausmaß der Fernmetastasierung in weitere Organe mit dem Fortschreiten der Peritonealkarzinose beim Pankreaskarzinom entwickelt. Dafür wurde das Ausmaß der Fernmetastasierung in die verschiedenen Organe mittels ALU-PCR bestimmt.

Zelladhäsionsmoleküle nehmen, wie bereits erläutert, eine wichtige Rolle bei allen Schritten der Metastasierungskaskade ein. Die Expression von Zelladhäsionsmoleküle verhält sich dynamisch und kann sich je nach Tumortyp, dem zu infiltrierenden Gewebe und abhängig vom Schritt in der Metastasierungskaskade unterscheiden (Reymond et al., 2013). Patienten mit einer peritonealen Metastasierung zeigen eine deutlich reduzierte Gesamtüberlebensrate auf (Coccolini et al., 2013). Ein besseres Verständnis für die Zelladhäsionsmoleküle, die diese Metastasierung fördern könnte helfen, diese Situation zu verbessern. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, wie sich die Expression von Zelladhäsionsmolekülen mit dem zeitlichen Fortschreiten der initialen Peritonealkarzinose verändert.

Untersucht wurde zudem, wie sich die Expression dieser Zelladhäsionsmoleküle auf den Zellen, die durch die intraperitoneale Lavage gewonnen wurden (Zellen in Agar) verändert. In erster Linie ist anzunehmen, dass Tumorzellen in der intraperitonealen Lavage metastatischen Tumorzellen entsprechen, die sich aus der intraperitonealen Karzinose lösen, bevor sie möglicherweise andernorts eine Karzinose initiieren.

Weniger wahrscheinlich ist es, dass die Tumorzellen in der intraperitonealen Lavage die injizierten Tumorzellen (PaCa 5061) vor ihrer Adhäsion an das Peritoneum repräsentieren. Dies würde nämlich voraussetzen, dass die frei flottierenden Zellen den gesamten Beobachtungszeitraum über im Bauchraum überlebt haben müssen. Zum anderen konnte bei einem Experiment aus der Forschungsgruppe von Daniel Wicklein gezeigt werden, dass die Eigenschaften der Tumorzellen, die sich in der intraperitonealen Lavage befinden, im Vergleich zu den injizierten Tumorzellen unterscheiden. Dabei wurden unter anderem Zellen aus der Zellkultur mittels Durchflusszytometrie untersucht. In der nachfolgenden Tabelle ist exemplarisch ein Ausschnitt dieser Ergebnisse eingefügt. Übereinstimmend hierzu zeigten die in unserem Versuch durch eine intraperitonealen Lavage gewonnen Tumorzellen keine Integrin $\beta 3$ und mehrheitlich eine positive Integrin $\beta 4$ und Integrin $\beta 1$ Expression. Allerdings zeigte sich ein Unterschied in der Integrin $\beta 6$ und αV Expression. Hier exprimierten nämlich die Tumorzellen, die durch die peritonealen Lavage gewonnen wurden, kein Integrin $\beta 6$ und kaum Integrin αV .

Tabelle 27: Ausschnitt noch nicht publizierter Daten der Durchflusszytometrie aus der Forschungsgruppe von Daniel Wicklein

	αV	$\beta 1$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 6$
PaCa 5061	++	++	-	++	+

5.1 Fortschreiten der Peritonealkarzinose und Ausmaß der Fernmetastasierung in weitere Organe

In unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits in der Anfangsphase der Krebsentstehung (nach 4 Tagen) Tumorzellen mittels Alu-PCR im Blut, im Knochenmark, in der Leber und in der Lunge nachzuweisen waren. Das Ausmaß der Fernmetastasierung unterschied sich im weiteren zeitlichen Verlauf zunächst nicht signifikant voneinander. Für das Fortschreiten des Tumors am Ort der initialen Metastase (Peritoneum) konnte gezeigt werden, dass bereits 4 Tage nach Injektion der Tumorzellen, mikroskopisch nachweisbare Tumorkläsionen entstanden waren. Allerdings waren zu diesem Zeitpunkt noch keine makroskopisch sichtbaren Tumorkläsionen vorhanden. Erst bei der Mauskohte mit einem Überleben von 41 Tagen, dem längsten Beobachtungszeitpunkt in unserer Arbeit, waren beim Peritoneum aller Mäuse makroskopisch sichtbare Tumorkläsionen zu erkennen. Die mikroskopisch ermittelte Größe der Tumorkläsionen beim Peritoneum blieb zunächst ebenfalls konstant. Erst nach einer Überlebenszeit von 41 Tagen nahm die

Tumorgröße signifikant zu. Ab diesem Zeitpunkt konnte auch erstmalig ein signifikanter Anstieg bei der hämatogenen und ossären Metastasierung verzeichnet werden.

Die Tumorgröße war für in einem frühen Stadium diagnostizierte PDAC einer der aussagekräftigsten Prädiktoren für das Überleben (Hur et al., 2016). Eine weitere Studie stellte eine dramatische Verschlechterung der Überlebensrate fest, wenn die Größe des Pankreaskarzinoms um 1 cm zunahm (Agarwal et al., 2008). Eine weitere Studie zeigte ebenfalls, dass eine zunehmende Tumorgröße beim PDAC, welches sich zum Zeitpunkt der Diagnose in einem lokalisierten Stadium befand, mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Es wird angenommen, dass mit einer zunehmenden Größe beim Primärtumor mehr metastatische Tumorzellen diesen verlassen, in den Blutkreislauf gelangen und expandieren können (Ansari et al., 2017). Eine Studie zeigte, dass auch das Volumen und damit die Größe von Metastasen ein unabhängiges Prognosekriterium für das Risiko einer Progression sowie für das Überleben bei verschiedenen Krebsarten darstellte (Cao et al., 2021).

Falls eine zunehmende Tumorgröße am Ort der initialen Metastase das Risiko für die Ausbildung weiterer Metastasen und die Mortalität steigert, könnten Patienten von einer frühzeitigeren Metastasenresektion profitieren.

Die Annahme, dass mit einer zunehmenden Tumorgröße mehr metastatische Tumorzellen diesen verlassen und in den Blutkreislauf gelangen können, könnte nach unseren Ergebnissen auch auf den Größenprogress am Ort der initialen Metastasierung übertragen werden. Zu dem Zeitpunkt, an dem nämlich zum ersten Mal eine signifikante Zunahme des Tumorwachstums beobachtet werden konnte (nach 41 Tagen), konnte ebenfalls zum ersten Mal eine signifikante Zunahme bei der Anzahl der Tumorzellen in der hämatogenen Zirkulation beobachtet werden. Die Tumorgröße am Ort der initialen Metastasierung könnte damit beeinflussen, wie viele Tumorzellen disseminieren. Allerdings würde dies nicht automatisch bedeuten, dass die disseminierenden Tumorzellen in der Lage sind, andernorts weitere Metastasen zu initiieren. In unserem Mausmodell nimmt zwar nach 41 Tagen die Größe der Peritonealkarzinose und das Ausmaß der hämatogenen Metastasierung signifikant zu, allerdings konnte bei der Anzahl der Tumorzellen in der Leber und Lunge keine signifikante Zunahme beobachtet werden. Eine zunehmende Tumorgröße am Ort der initialen Metastase könnte also dazu führen, dass zwar mehr Tumorzellen in die

Zirkulation gelangen, diese jedoch nicht unbedingt zur Bildung weiterer Metastasen beitragen. Ähnliches konnte in einer Studie beobachtet werden, bei der aus metastatischen Läsionen hervorgehende zirkulierende Tumorzellen nicht in der Lage waren, weitere Metastasen auszubilden (Sugarbaker et al., 1971). Eine zunehmende Größe bei der Peritonealkarzinose (Ort der initialen Metastase) ist damit im Gegensatz zu einer zunehmenden Größe am Ort des Primärtumors (PDAC) nicht unbedingt mit einem erhöhtem Risiko für die Ausbildung weiterer Metastasen assoziiert.

In unserem Versuch konnte in der Leber und in der Lunge durchschnittlich die größte Anzahl an Tumorzellen vorgefunden werden. Die Anzahl der Tumorzellen nimmt im Beobachtungszeitraum jedoch im Vergleich zur hämatogenen Metastasierung und im Vergleich zur ossären Metastasierung nicht signifikant zu. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse für die Fernmetastasierung in die Leber mit Vorsicht zu betrachten sind. Aufgrund der räumlichen Nähe und anatomischen Verbindung von Leber und Peritoneum ist es trotz größter Vorsicht wahrscheinlich, dass während der Entnahme der Organe, peritoneale Tumorzellen in die Leber gelangen. Zudem könnten während der intraperitonealen Inokulation Tumorzellen Kontakt zur Leberoberfläche haben. Die Ergebnisse der Alu-PCR mit einem Peak für die Anzahl an Tumorzellen nach 11 Tagen und die immunhistochemische Färbung dieser Gewebe mit HSP60 (s. Abbildung 40) suggerieren stark, dass nicht Lebermetastasen selbst, sondern eine Kontamination des Gewebes mit TZV vom Peritoneum verantwortlich für den Peak und die hohe Anzahl von Tumorzellen in der Leber war. Beim Anschnitt des Lebergewebes (s. Abbildung 40) war zu sehen, dass das das Organstroma umgebende Bindegewebe (Organkapsel) intakt war und die Tumorzellen keinen Kontakt zur Oberfläche der Leber hatten.

Anhand der Beobachtungen für das Fortschreiten des Tumors am Ort der initialen Metastasierung ergibt sich für die Tumorprogression ein Muster, bei dem das Wachstum zunächst stagniert und erst nach einer längeren Zeit, in unserem Versuch nach 41 Tagen, signifikant zunimmt. Das Tumorstadium stagniert somit zuerst einmal. Die Tumorzellen sind also nicht sofort in der Lage, ein Wachstum zu initiieren. Dieser Zustand kann als ruhender, beziehungsweise als ein Zustand der Dormanz betrachtet werden (Aguirre-Ghiso and Sosa, 2018, Recasens and Munoz, 2019).

Im Zustand dieser Dormanz verbleibt die Größe von metastatischen Läsionen unverändert (Gomis and Gawrzak, 2017). Die genauen Mechanismen, die sich in dem

Zustand abspielen, sind größtenteils unbekannt. Es wird angenommen, dass Tumorzellen im Zustand der Dormanz sich an die neue Umgebung adaptieren, was es ihnen schließlich ermöglichen, im Wachstum weiter voranzuschreiten und damit aus dem Zustand der Dormanz auszutreten (Recasens and Munoz, 2019). Das kann der Grund dafür sein, warum in unserem Versuch das Tumorstadium zunächst stagnierte und erst nach 41 Tagen signifikant zunahm. Unser Versuch unterstützt damit die Annahme, dass Tumorzellen des PDAC nicht direkt in der Lage dazu sind, Metastasen auszubilden und zuerst in einen Zustand der Dormanz eintreten.

Die Zeitspanne, in der die Tumorzellen im Zustand der Dormanz bleiben bis zum Zeitpunkt, ab dem klinisch nachweisbare Metastasen auftreten, wird als Latenzzeit bezeichnet. In unserem Mausmodell verzeichneten wir für die Peritonealkarzinose beim PDAC eine maximale Latenzzeit von 41 Tagen. Da keine Beobachtungszeitpunkte zwischen Tag 14 und 41 vorhanden waren, kann der exakte Zeitpunkt, ab dem die Tumorzellen aus dem Zustand der Dormanz austreten, nicht bestimmt werden. Weitere Experimente mit mehr Beobachtungszeitpunkten, insbesondere zwischen Tag 14 und 41 nach Injektion der Tumorzellen sind hierfür erforderlich. Zudem wäre es auch interessant zu beobachten, was passiert, nachdem Tumorzellen aus diesem Zustand der Dormanz austreten. Vorstellbar wäre, dass das Tumorstadium danach kontinuierlich ansteigt oder die Tumorzellen erneut in die Ruhephase übergehen und sich die Zustände von Tumorstadium und Dormanz abwechseln. Ein Problem in der heutigen Krebstherapie ist, dass Tumorzellen, die sich in einem Zustand der Dormanz befinden, weniger empfindlich gegenüber Krebstherapien sind (Ma et al., 2021, De Angelis et al., 2019, Li et al., 2014). Ein genaueres Verständnis über die Abfolge von Tumorstadium und Tumordormanz könnte helfen, Therapien besser zu planen, um bei Phasen des Tumorstadiums zu intervenieren.

Es ist noch nicht bekannt, welche Mechanismen den Zustand der Ruhephase aufrechterhalten und was genau es den Tumorzellen ermöglicht, aus diesem Zustand auszutreten. Es wird vermutet, dass therapeutische Ansätze, die Tumorzellen in einem Zustand der Dormanz halten, das Fortschreiten der Krebserkrankung verhindern könnten (Risson et al., 2020, Pantel et al., 2008, Dasgupta et al., 2017).

Die Dauer der Latenzzeit beeinflusst die Malignität eines Tumors, wobei Tumore mit einer kurzen Latenzzeit eher eine hohe Rückfall- und Mortalitätsrate zeigen. Die

Latenzzeiten für das Prostatakarzinom und das HR-positive Mammakarzinom sind zum Beispiel vergleichsweise lang. Beide Karzinome zeigen auch eine im Vergleich zu anderen Krebsarten lange 5-JahresÜberlebensraten. Aggressive Karzinome wie das nichtkleinezzellige Lungenkarzinom dagegen zeigen eine kurze Latenz zwischen der Dissemination von Tumorzellen und dem Auftreten von Metastasen (Gomis and Gawrzak, 2017).

Das PDAC ist nach allgemeinen Erkenntnissen ein aggressiver Tumor mit einer kurzen Latenzzeit. Die Frage die sich stellt ist, ob die durch uns beobachtete maximale Latenzzeit von 41 Tagen für die PaCa 5061 Zelllinie als kurze Latenzzeit betrachtet werden kann und inwiefern dies die Herstellung einer Analogie zur Tumorprogression beim Menschen erlaubt. Ein Problem ist, dass Mausmodelle den komplexen Prozess der metastatischen Ruhephase nicht akkurat widerspiegeln. Das ist ein Grund dafür, dass es bis heute nur wenige Experimente gibt, die die Latenzphase des Tumorwachstums untersuchen. Die Wachstumskinetik von Tumorzellen unterscheidet sich in Mausmodellen im Vergleich zum Menschen (Gomis and Gawrzak, 2017, Giancotti, 2013). Es gibt jedoch Versuche, Mausmodelle zu entwickeln, die das Verhalten des Pankreaskarzinoms beim Menschen akkurater nachbilden (Giri et al., 2021). Die Immundefizienz in Mausmodellen fördert das Tumorwachstum. Auch durch den Immundefekt (Pfp-/Rag2-), den unsere Mäuse hatten, wird das Tumorwachstum beschleunigt (Zitvogel et al., 2016). Die Übertragung der Ergebnisse für die Dauer der Latenzzeit und der Geschwindigkeit der Tumorprogression auf die Krebsentwicklung beim Menschen ist damit nur eingeschränkt möglich. Allerdings könnten Vergleiche innerhalb von Mausmodellen akkurater widerspiegeln, ob eine Latenzzeit eher als kurz oder lang anzusehen ist.

In der Studie von Marsden et al., wurde beispielsweise die Entwicklung eines Mammakarzinoms in immundefizienten Mäusen untersucht. Erst 3 Monate nach der Injektion von $1-5 \times 10^3$ Zellen in das Fettgewebe der Mammae konnten durch eine PCR-Analyse Mikrometastasen in der Lunge, Leber, Niere und dem Gehirn nachgewiesen werden. Sichtbare Makrometastasen (in Lunge, Leber und in der Niere) waren erst nach 6 Monaten zu beobachten (Marsden et al., 2012). In unserem Versuch konnten wir bereits 4 Tage nach Injektion der Tumorzellen in entfernten Organen Mikrometastasen nachweisen. Zudem waren 7 Tage nach der Injektion der Tumorzellen bereits makroskopische Tumorformationen beim Peritoneum sichtbar, nach 41 Tagen sogar bei allen Mäusen. Ein weiteres Mausmodell, welches die Phase

der Dormanz bei metastatischen Läsionen des Mammakarzinoms im Knochen untersuchte, konnte Mikrometastasen 4 Wochen nach Injektion von Tumorzellen nachweisen. Es dauerte zudem 3 Monate, bis 10% der Mäuse makroskopisch sichtbare Knochenmetastasen entwickelten. Dieses Intervall wurde in der Studie als Phase der Dormanz interpretiert (Lu et al., 2011).

Verglichen mit Studien, die die Metastasierung des Mammakarzinoms in Mausmodellen untersuchten, ist damit die in unserem Versuch beobachtete Latenzzeit eher als kurz anzusehen. Auch die Prognose beim Mammakarzinom ist besser als beim Pankreaskarzinom. Während die 5-Jahres- Überlebensrate für Patienten mit Brustkrebs bei 91% liegt, überleben gerade mal 13% der Patienten mit einem Pankreaskarzinom 5 Jahre lang (Siegel et al., 2024). Klinisch liegt in der Regel der Zeitraum, in dem Tumorzellen beim Brustkrebs (nach Mastektomie) in einem Zustand der Dormanz verbleiben, bei ungefähr 10 Jahren (Karrison et al., 1999). Bei Patienten mit einem PDAC (nach potenziell kurativer Resektion), liegt diese Zeitspanne in der Regel bei 9,4 Monaten (Neoptolemos et al., 2004).

Die von uns beobachtete kurze Phase der Dormanz im Mausmodell kann daher ein Indikator für einen aggressiven Tumor-Phänotypen sein und könnte eine Erklärung dafür sein, warum das PDAC eine so schlechte Prognose aufweist.

Das Stadium der Dormanz wird als essentiell angesehen, damit Tumorzellen die Fähigkeit zur Ausbildung von Metastasen erlangen. In der Phase der Dormanz adaptieren sich die Tumorzellen an die neue Mikroumgebung und erlernen Mechanismen, um einer Destruktion durch das Immunsystem zu entgehen (Recasens and Munoz, 2019). Die Fähigkeit, aus dem Zustand der Dormanz in den Zustand des Tumorwachstums überzugehen unterscheidet sich zwischen verschiedenen Tumorentitäten. Dieser Unterschied wird dadurch erklärt, dass Tumorzellen unterschiedlich auf wachstums-fördernde und hemmende Signale reagieren und sich unterschiedlich gut an die neue Mikroumgebung adaptieren können. Dementsprechend bleiben einige Tumorentitäten länger und einige kürzer in einem Zustand der Dormanz (Klein, 2020). Die Mikroumgebung des metastatischen Zielorgans kann spezifische Signale abgeben, über die sie in der Lage ist, mit den Tumorzellen zu interagieren. Über diese Interaktion kann das Wachstum der Tumorzellen gesteuert werden. Je nach Signal kann damit das Tumorwachstum und damit der Austritt aus einem Zustand der Dormanz gefördert werden. Diese

Kommunikation hat sich als grundlegendes Prinzip in der Regulation der Ruhephase erwiesen (Aguirre-Ghiso and Sosa, 2018). Nachdem beispielsweise ruhenden Tumorzellen in einer Zellkultur Wachstumsfaktoren wie der Epidermal Growth Factor (EGF) und der Fibroblast Growth Factor 2 zugesetzt wurden, erlangten sie erneut die Fähigkeit zu proliferieren (Pantel et al., 2008).

Es gibt es bereits Krebstherapien, die in den Prozess der Tumordormanz eingreifen. Beim fortgeschrittenen ER+- Mammakarzinom wird beispielsweise klinisch bereits der CDK4/6-Inhibitor Palbociclib eingesetzt, der darauf abzielt, die Tumorzellen in einem Ruhezustand zu halten. Ein vielversprechender Therapieansatz, um disseminierte Tumorzellen in einem Zustand der Dormanz zu halten, ist beispielsweise die Inhibition des β 1-Integrinsignales (Recasens and Munoz, 2019). In der Behandlung des Pankreaskarzinoms finden diese Ansätze noch keine Anwendung (Seufferlein et al., 2024). Modellierungen zufolge kann die Unterdrückung von Signalen, die durch Zelladhäsionsmoleküle vermittelt werden, Tumorzellen in einem Zustand der Dormanz halten (Ghajar, 2015). Die Dynamik in der Expression von Zelladhäsionsmolekülen könnte damit einen entscheidenden Faktor für die Regulation des Tumorwachstums darstellen. Die Untersuchung dieser Dynamik könnte daher helfen, Zelladhäsionsmoleküle zu identifizieren, deren Expression mit einer Krebsprogression assoziiert sind und neue therapeutische Ansatzpunkte bereitstellen.

5.2 Expression von Zelladhäsionsmolekülen mit dem zeitlichen Fortschreiten der initialen Peritonealkarzinose des Pankreaskarzinoms

5.2.1 Mesothelin

Damit Tumorzellen beim Peritoneum Kolonien metastatischer Tumorzellen ausbilden, muss es zuerst zu einer Adhäsion an das Peritoneum mit anschließender Invasion des darunter liegenden Stromas kommen (Ceelen and Levine, 2015). Tumorzellen exprimieren verschiedene Rezeptoren und Liganden, die eine Interaktion und Bindung an Mesothelzellen und an Komponenten der ECM ermöglichen. Zu bekannten Adhäsionsmolekülen, die bei dieser Interaktion mitwirken, zählen unter anderem auch die in dieser Arbeit untersuchten Adhäsionsmoleküle wie ICAM1 oder Integrin β 1. Diese Interaktion wird durch Schädigungen der mesothelialen Schicht verstärkt (Cortés-Guiral et al., 2021). Die genauen Mechanismen, mit denen Tumorzellen an das Peritoneum adhären, sind noch unklar (van Baal et al., 2017).

Das Mesothel bildet eine Art Barriere aus, die verhindert, dass Tumorzellen in die darunter liegenden Schichten eindringen. Ist das Mesothel verletzt, können Tumorzellen einfacher an diese Stelle adhären (van den Tol et al., 1998).

Mesotheliale Zellen können daher als eine Art Schutzschicht betrachtet werden. *In vitro* inhibierte das Mesothel sogar die Adhäsion und Invasion von Tumorzellen des Ovarialkarzinoms (Kenny et al., 2007).

Unser Versuch zeigte, dass an der Adhäsionsstellen der TZV das Mesothels unterbrochen war. Davon ausgenommen waren insgesamt nur 2 Präparate, bei denen das Mesothel an der Anheftungsstelle der TZV noch intakt war. Dass die Unversehrtheit des Mesothels bei der Invasion von Tumorzellen unterbrochen wird, wurde bereits in verschiedenen Experimenten beobachtet. *In vitro* konnte mit einem Modell des Peritoneums gezeigt werden, dass die Invasion von Tumorzellen eines gastrotintestinalen Tumors mit der Störung der mesothelialen Schicht einhergeht (Jayne et al., 1999). Es wird angenommen, dass Tumorzellen entweder zuerst an das Mesothel binden und dann die extrazelluläre Matrix invadieren oder dass Tumorzellen direkt das Mesothel zerstören und anschließend eine Adhäsion mit der extrazellulären Matrix eingehen (Ceelen and Levine, 2015). Eine Studie, die mikroskopisch die Morphogenese peritonealer Metastasen des Magenkarzinoms untersucht hat, konnte zeigen, dass noch bevor die Tumorzellen an das Peritoneum adhären, sich die Form der mesothelialen Zellen verändert hat und sich diese ablösen. Die Tumorzellen adhärten schließlich direkt an die unbedeckten Bereiche des submesothelialen Bindegewebes (Kiyasu et al., 1981).

Bereits 4 Tage nach Injektion der Tumorzellen konnte eine Adhäsion der Tumorzellen mit einer entsprechenden Unterbrechung des Mesothels an der Anheftungsstelle der TZV beobachtet werden. Daher könnte man annehmen, dass Tumorzellen des Pankreaskarzinom schon früh invasive Eigenschaften besitzen, mit denen sie entsprechend in der Lage sind, die Integrität des Mesothels aufzuheben. Durch unseren Versuch ist es jedoch nicht möglich auszusagen, ob die Tumorzellen zuerst an das Mesothel adhären und dann die darunter liegende ECM invadieren oder ob die Tumorzellen noch bereits vor der Adhäsion an das Peritoneum die Integrität stören und direkt an die ECM adhären. Dass das Mesothel an der Anheftungsstelle einiger TZV noch intakt war spricht eher dafür, dass es zuerst zu einer Adhäsion an das Mesothel kommt. Die Schädigung der mesothelialen Integrität erleichtert, wie bereits geschildert, das Eindringen von Tumorzellen. Eine Möglichkeit, wie das Mesothel

geschädigt werden kann, ist durch Metalloproteasen. Einige Daten deuten auch darauf hin, dass Mesothelzellen genau wie Tumorzellen auch eine mesenchymale Transition durchlaufen und so zur Metastasenbildung beitragen könnten. Der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) fördert bei Tumorzellen bekanntermaßen die Beweglichkeit und erleichtert invasive Prozesse (Cortés-Guiral et al., 2021).

Wenn die Integrität des Mesothels verloren geht, wird eine schnelle Heilung eingeleitet. In einem Mausversuch wurde beobachtet, dass bereits 3 Tage nach Verletzung des Peritoneums parietale mesotheliale Zellen an der Wundoberfläche auftauchten und nach 8 Tagen die mesotheliale Regeneration vollständig erfolgt ist (Raftery, 1979).

Der Heilungsmechanismus des Mesothels ist einzigartig, denn im Gegensatz zum Epithel erfolgt die Reparatur des Mesothels nicht nur über Zellen, die vom Wundrand auf die Wundoberfläche wandern, sondern auch durch freiflottierende Mesothelzellen, die sich z.B in der peritonealen Flüssigkeit befinden und an die Wundoberfläche ansetzen (Mutsaers et al., 2016). In unserem Versuch konnte beobachtet werden, dass das Mesothel die intraperitoneale Karzinose teilweise bis vollständig überdeckt (Vergleich Abbildung 37). War die interperitoneale Karzinose dabei nur teilweise mit dem Mesothel überdeckt, war die Stelle, an dem sich die peritoneale Karzinose mit dem Mesothel überdeckt gezeigt hat, an den Tumor- beziehungsweise an den Wundrändern. Unser Versuch bekräftigt damit, dass es wahrscheinlich vom Wundrand aus zu einer Reparatur vom Mesothels kommt.

Interessanterweise scheint dieser Heilungsprozess vom Wundrand aus so weit voranzuschreiten, bis die gesamte peritoneale Karzinose, die eigentlich kein Bestandteil des Peritoneums ist, mit dem Mesothel überdeckt ist. Es besteht damit am Ende eine Koexistenz vom Mesothel mit der peritonealen Karzinose. Dadurch, dass die peritoneale Karzinose von außen mit Mesothel bedeckt ist, ist diese von außen wahrscheinlich nicht mehr für Immunzellen erkennbar und kann nicht von anderen Organen unterschieden werden.

Eine peritoneale Metastasierung ist mit einer schlechten Prognose für die Patienten verbunden (Chu et al., 1989). Bei Patientin mit einem peritoneal metastasiertem Pankreaskarzinom betrug in einer Studie das mediane Überleben gerade mal 6 Monate (Thomassen et al., 2013). Die Peritonealkarzinose wird allgemein als unheilbare Erkrankung angesehen und die verfügbaren Therapieoptionen haben nur eine eingeschränkte Wirkung (Simón-Gracia et al., 2018). Es ist denkbar, dass der

Überzug, der durch die mesothelialen Zellen über die Peritonealkarzinose ausgebildet wird, zu dieser schlechten Prognose und Therapiemöglichkeit beiträgt.

Das Mesothel, welches nämlich eigentlich eine Barriere und Schutzschicht für die intraabdominellen Organe ausbildet, könnte genauso auch eine Barriere und Schutzschicht für die Peritonealkarzinose darstellen, die es vor dem Immunsystem und vor einer Chemotherapie schützt.

Ein Ansatz, das Ansprechen auf eine intraperitoneale Chemotherapie zu verbessern ist das milde Erhitzen einer intraperitoneal applizierten chemotherapeutika (HIPEC). Diese soll die Absorption des chemotherapeutikums verbessern und zeigte bei ausgewählten Patienten bereits gute Ergebnisse (Tentes et al., 2018) . Die intraperitonealen Therapien sind jedoch kein Behandlungsstandard und finden keinen Einzug in der aktuellen Leitlinie (Seufferlein et al., 2024). Aktuell liegt damit keine effektive Behandlung bei einer Peritonealkarzinose vor. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Interaktion mit dem Mesothel eine wichtige Rolle in der Ausbildung von peritonealen Metastasen einnimmt und eine Koexistenz mit dem Mesothel vorliegt. Dabei ist es wahrscheinlich, dass das zerstörte Mesothel vom Rand der Tumorzellen aus weiter auf die Oberfläche der Tumorzellen wandert, bis es diese vollständig überdeckt. Dies stellt möglicherweise einen neuen interessanten Therapieansatz dar. Es ist nämlich vorstellbar, dass eine Applikation einer intraperitonealen Chemotherapie in dem Stadium, wo die Tumorzellen noch nicht vollständig mit dem Mesothel überdeckt sind, das Ansprechen auf die Therapie verbessern könnte. Eventuell müsste man, um dieses Stadium klinisch ausnutzen zu können, eine präventive Spülung der Peritonealhöhle vornehmen. Weitere interessante therapeutische Ansatzpunkte, die sich durch die Interaktion der Tumorzellen mit dem Mesothel ergeben, wurden bereits in verschiedenen Studien untersucht. Dabei wurden Chemotherapeutika an tumorspezifische Liganden, wie zum Beispiel an Integrin $\alpha V\beta 3$ gekoppelt. Es konnte gezeigt werden, dass hierdurch eine höhere Bindung an peritoneale Tumorzellen und signifikante Steigerung im Überleben erreicht werden konnte (Simón-Gracia et al., 2018).

5.2.2 Integrine

Es wurde immunhistochemisch die Expression der Integrine $\beta 3$, $\beta 6$, $\beta 4$, $\beta 1$ und αV auf den Tumorzellen untersucht. Es konnte für alle untersuchten Integrine, mit Ausnahme für Integrin $\beta 3$, eine positive Expression nachgewiesen werden.

Integrin $\beta 6$ und Integrin αV sind die Integrine, die am frühesten und stärksten (nach 4 Tagen) von den Tumorzellen exprimiert werden. Dagegen ist in der frühesten Phase der hier untersuchten Tumorprogression (nach 4 Tagen) kaum eine positive Expression für die Integrine $\beta 4$ und $\beta 1$ nachweisbar.

Eine peritoneale Karzinose konnte in unserem Versuch ausgebildet werden, ohne dass Integrin $\beta 3$ exprimiert wird. Das Integrin $\beta 3$ scheint damit nicht essenziell für die Ausbildung von peritonealen Metastasen beim Pankreaskarzinoms zu sein. Von den durch eine peritoneale Lavage gewonnen Tumorzellen wird ebenfalls kein Integrin $\beta 3$ exprimiert. Auch wenn eine Adhäsion an das Peritoneum nach unseren Ergebnissen ohne Integrin $\beta 3$ möglich ist, schließt dies nicht aus, dass eine positive Integrin $\beta 3$ Expression die Adhäsion an das Peritoneum und die Metastasierung beim Pankreaskarzinom steigern könnte. Beim Pankreaskarzinoms selbst konnte zumindest keine signifikante Korrelation zwischen der Expression vom Integrin $\beta 3$, der Tumorgroße, dem Tumorgrad oder der peripankreatischen Invasion nachgewiesen werden (Hosotani et al., 2002). Um zu beurteilen, ob eine positive Integrin $\beta 3$ Expression die Adhäsion an das Peritoneum und die Ausbildung peritonealer Metastasen fördert, wäre ein Vergleich mit einer Tumorzellpopulation erforderlich, welche das Integrin $\beta 3$ exprimiert. Es ist möglich, dass die von uns verwendete Zelllinie PaCa 5061 eine Subpopulation ist, welche kein Integrin $\beta 3$ exprimiert. Eine Studie zeigte, dass vom Pankreaskarzinom ausgehende metastatische Tumorzellen sowohl eine positive als auch negative Integrin $\beta 3$ Expression aufweisen können (Desgrosellier et al., 2009). Welche dieser Subpopulationen ein höheres metastatisches Potential hat und eine peritoneale Metastasierung beim Pankreaskarzinom fördert, wurde bisher nicht untersucht.

Für das Ovarialkarzinom konnte gezeigt werden, dass Integrin $\beta 3$ die Adhäsion der Tumorzellen an das Peritoneum steigerte. Gleichzeitig schränkte jedoch die Expression vom Integrin $\beta 3$ auch die Tumorprogression ein und reduzierte das Auftreten von Metastasen (Kaur et al., 2009). Bei anderen Karzinomen wie beim Brustkrebs dagegen waren Tumorzellen mit hohem metastatischen Potential durch eine starke Expression des Integrins $\alpha V\beta 3$ charakterisiert (Wong et al., 1998). Auch für die Metastasierung von Tumorzellen eines Melanoms (Hsu et al., 1998), Glioblastoms (Gladson and Cheresch, 1991) und Prostatakarzinoms (Cooper et al., 2002) konnte die Wichtigkeit dieses Integrins aufgezeigt werden. Beim Melanom

erlangten Tumorzellen mit der Hochregulation des Integrin $\beta 3$ die Fähigkeit zur Invasion, Ausbreitung und Besiedlung entfernter Organe (Hsu et al., 1998).

Verglichen mit den anderen untersuchten Integrinen, konnte für das Integrin $\beta 1$ keine so starke Expression gefunden werden. Am frühesten Beobachtungszeitpunkt (Tag 4), wurde Integrin $\beta 1$ von der Mehrheit der Tumorzellverbände (75%) nicht exprimiert. Erst zu den Beobachtungszeitpunkten danach konnte auf allen Tumorzellverbänden eine Expression von Integrin $\beta 1$ nachgewiesen werden. Allerdings schwankte die Intensität für Integrin $\beta 1$ hier zumeist zwischen einer schwachen (+/1) und mittelgradigen Expression (++/2).

Eine Studie lieferte Beweise dafür, dass Integrin $\beta 1$ durch Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix des Peritoneums verantwortlich für die initiale Adhäsion von Tumorzellen ist (Schlaeppli et al., 1997). Auch die Studie von Hosono et al., kommt zu dem Schluss, dass Integrin $\beta 1$ wichtig für die initiale Adhäsion von Tumorzellen des Pankreaskarzinoms an peritoneale Mesothelzellen ist (Hosono et al., 1998). Beim Pankreaskarzinom inhibierte zudem der Knock-Down von Integrin $\beta 1$ *in-vivo* die Adhäsion von Tumorzellen an verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix. Die Metastasierung konnte insgesamt durch den Knock-Down von Integrin $\beta 1$ reduziert werden (Grzesiak et al., 2011). Integrin $\beta 1$ scheint also nach der aktuellen Studienlage wichtig für die initiale Adhäsion von Tumorzellen des Pankreaskarzinoms an das Peritoneum zu sein. Ausgehend von dieser Annahme würde man erwarten, dass zum frühesten Beobachtungszeitpunkt, die stärkste Integrin $\beta 1$ Expression vorgefunden werden kann. Dies war jedoch nicht der Fall. Obwohl es an Tag 4 bereits zu einer Adhäsion an das Peritoneum kam, stieg die Integrin $\beta 1$ Expression erst nach dem 4. Tag an. Man könnte daher anhand dieser Beobachtung mutmaßen, dass Integrin $\beta 1$ für die initiale Adhäsion nicht so wichtig ist wie angenommen, sondern stärker an der nachfolgenden Tumorinvasion beteiligt ist. Dass die Integrin $\beta 1$ Expression im weiteren gesamten Beobachtungszeitraum, also auch zum Zeitpunkt, ab dem wieder ein Tumorwachstum verzeichnet werden kann, nicht wirklich steigt, spricht eher dafür, dass Integrin $\beta 1$ keinen so starken Einfluss auf die darauffolgende Tumorprogression hat.

Auf allen durch die peritoneale Lavage gewonnen Tumorzellen konnte eine positive Integrin $\beta 1$ Expression gezeigt werden. Wie bereits erläutert gehen wir davon aus,

dass dies Tumorzellen sind, die sich aus der intraperitonealen Karzinose lösen. Integrin $\beta 1$ scheint diesen Prozess nicht zu beeinflussen.

Genau wie für Integrin $\beta 1$ wurde auch bei Integrin $\beta 4$ bei fast allen Präparaten (75%) mit nachweisbarer peritonealer Karzinose nach 4 Tagen keine Expression vorgefunden. Daher ist anzunehmen, dass auch Integrin $\beta 4$ nicht essenziell für die initiale Adhäsion an das Mesothel sondern wahrscheinlich wichtiger für die nachfolgende Invasion ist. Im Gegensatz zum Integrin $\beta 1$ ist die Anzahl an Studien, die die Rolle von Integrin $\beta 4$ als ein Vermittler der initialen Adhäsion von Tumorzellen an das Peritoneum beschreiben, gering. Für Tumorzellen des Ovarialkarzinoms konnte zumindest beobachtet werden, dass durch eine gesteigerte Integrin $\beta 4$ Expression, eine stärkere Adhäsion von Tumorzellen an Mesothelzellen erreicht wird (Lee et al., 2015). Bei den weiteren Beobachtungszeitpunkten exprimierten alle Präparate mit peritonealer Karzinose Integrin $\beta 4$. Hier wiesen alle Präparate eine starke (+++/3) Expression vor. Da sich die Integrin $\beta 4$ Expression zum Zeitpunkt, an dem die TZV aus einem Zustand der Dormanz austreten nicht zu ändern scheint, ist anzunehmen, dass Integrin $\beta 4$ das Tumorstadium eher gering beeinflusst. Es gibt sogar Hinweise dafür, dass die Expression von Integrin $\beta 4$ die Ausbildung von peritonealen Metastasen unterdrücken könnte. Beim Magenkarzinom beispielsweise korrelierte das Level der Integrin $\beta 4$ Expression invers mit dem Potential der Tumorzellen, zu disseminieren (Ishii et al., 2000).

Nach 4 Tagen exprimierten fast alle TZV (75%) Integrin αV . Das Präparat, welches hier keine positive Integrin αV aufwies, exprimierte jedoch Integrin $\beta 6$. Da das Integrin $\beta 6$ nur in Verbindung mit αV -Integrin vorkommt (Hynes, 2002), ist anzunehmen, dass hier ein falsch-negativer Befund vorlag und von allen (100%) TZV nach 4 Integrin αV exprimiert wird. In der zeitlichen Phase, bei der sich das Tumorstadium nicht veränderte, nahm die Expressionsintensität vom Integrin αV ab. Ab Tag 41, wo ein signifikanter Anstieg des Tumorstadiums beobachtet werden konnte, stieg die Integrin αV Expression erneut an, so dass alle Präparate eine starke (+++/3) Integrin αV Expression aufwiesen. Integrin αV könnte demnach sowohl die initiale Adhäsion an das Peritoneum als auch die Tumorstadiumprogression peritonealer Metastasen beim Pankreaskarzinoms fördern. Gleichzeitig konnte bei den Zellen in Agar eine positive Integrin αV Expression nur bei der Mauskoorte mit einem Überleben von 41 Tagen vorgefunden werden. Da wir davon ausgehen, dass

die Zellen in Agar metastatische Tumorzellen sind, die sich von der intraperitonealen Karzinose lösen und schließlich in die hämatogene Zirkulation übergehen, könnte das bedeuten, dass Integrin αV nicht nur die Progression der intraperitonealen Karzinose fördert, sondern auch die Loslösung der Tumorzellen vom peritonealen Zellverband und Übertritt in die hämatogene Zirkulation.

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bei Selektin-defizienten Mäusen die Suppression vom Integrin αV nahezu vollständig die Ausbildung peritonealer Metastasen verhinderte. In Übereinstimmung mit unserer Vermutung wurde in der Studie davon ausgegangen, dass Integrin αV die Tumorprogression fördert (Kemper et al., 2021). Bei Brustkrebszellen ist eine hohe Expression des Integrins $\alpha V\beta 3$ mit einem hohen metastatischen Potential assoziiert (Wong et al., 1998). Beim Kolonkarzinom war die Integrin αV Expression (in Kombination mit dem Integrin $\beta 6$) ebenfalls mit einer gesteigerten Fähigkeit der Krebszellen, Metastasen auszubilden assoziiert. Zudem war eine gesteigerte $\alpha V\beta 6$ Expression mit einer erheblichen Reduktion des medianen Überlebens der Patienten verbunden (Bates et al., 2005). Ferner war die Expression von Integrin $\alpha V\beta 6$ bei vielen weiteren Karzinomen mit einer schlechteren Prognose und gesteigerten Metastasierung assoziiert (Elayadi et al., 2007). Integrin αV könnte damit als ein Indikator für das Risiko einer Tumorprogression bei der peritonealen Karzinose des Pankreaskarzinoms verwendet werden und einen prognostische Marker darstellen. Beim Gebärmutterhalskrebs war ebenfalls eine vermehrte Expression vom Integrin $\alpha V\beta 6$ mit einer schlechteren Prognose verbunden. Man vermutet, dass die Expression $\alpha V\beta 6$ mit einer gesteigerten Migration der Tumorzellen in Fibronektin reiche extrazelluläre Matrix verbunden ist. Bereits in der Anfangsphase der Krebsentstehung, also bereits bei der Vorstufe des Gebärmutterhalskrebs (zervikale intraepitheliale Neoplasie), wurde eine gesteigerte Integrin $\alpha V\beta 6$ Expression festgestellt (Hazelbag et al., 2007).

Die Integrin $\beta 6$ Expression verhielt sich in unserem Versuch ähnlich wie die Integrin αV Expression. Genau wie Integrin αV , wiesen alle Präparate mit einer peritonealen Karzinose eine positive Integrin $\beta 6$ Expression auf. Der einzige Unterschied zur Integrin αV Expression war, dass Integrin $\beta 6$ zu den Beobachtungszeitpunkten nach Tag 7 kontinuierlich eine eher niedrigere Expression aufwies und nicht hoch reguliert wurde. Integrin $\beta 6$ wird nur in Kombination mit Integrin αV exprimiert. Integrin $\beta 3$ wird ebenfalls nur in Kombination mit Integrin αV exprimiert (Hynes, 2002). Aufgrund des ähnlichen Expressionsmuster von Integrin αV und Integrin $\beta 6$ zwischen Tag 4 und 14

ist es wahrscheinlich, dass Integrin $\beta 6$ das korrespondierende Integrin ist, welches gemeinsam mit Integrin αV in der Phase der Tumordormanz auf der Oberfläche der Tumorzellen exprimiert wird. 41 Tage nach Injektion der Tumorzellen, also zu dem Zeitpunkt, wo ein signifikantes Tumorwachstum verzeichnet werden kann, stieg die Integrin αV Expression. Integrin αV könnte damit ein entscheidendes Zelladhäsionsmolekül sein, welches das Wachstum von Tumorzellen des PDAC bei peritonealen Metastasen fördert und mit einem Austritt aus dem Zustand der Dormanz assoziiert ist. Da die Integrin $\beta 6$ Expression zu dem Zeitpunkt weiterhin niedrig ist, könnte darauf hinweisen, dass die Kombination dieses Integrins mit Integrin αV zwar für die initiale Tumorformation wichtig ist, allerdings eine andere β -Untereinheit in Korrespondenz mit der Integrin αV Untereinheit die weitere Tumorprogression fördert. Integrin $\beta 6$ wurde auch im Gegensatz zu Integrin αV nicht auf der Oberfläche der Tumorzellen exprimiert, die nach 41 Tagen durch die intraperitoneale Lavage gewonnen wurden. Das bestärkt ebenfalls die Annahme, dass Integrin $\beta 6$ im Gegensatz zu Integrin αV bei der Tumorprogression und Metastasierung eine eher untergeordnete Rolle einnimmt und hier eine andere zu Integrin αV korrespondierende β -Untereinheit die Tumorprogression fördert.

Es ist sogar denkbar, dass ein Integrin $\alpha V\beta 6$ -positiver Tumor suppressierende Eigenschaften aufweist. Integrin $\alpha V\beta 6$ und TGF- β supprimierten beispielsweise gemeinsam die Tumorprogression beim Pankreaskarzinom (Hezel et al., 2012). Andererseits zeigten andere Ergebnisse wiederum, dass *in vitro* Integrin $\alpha V\beta 6$ das Wachstum, Überleben, die Migration und Invasion von PDAC-Zellen förderte (Reader et al., 2019). Auch wurde auf Tumorzellen des Pankreaskarzinoms und auf davon ausgehenden metastatischen Tumorzellen eine starke Integrin $\alpha V\beta 6$ Expression vorgefunden (Sipos et al., 2004) und hohes Level einer Integrin $\beta 6$ Expression waren beim Pankreaskarzinom mit einer schlechteren Prognose verbunden (Lenggenhager et al., 2021, Reader et al., 2019). Die aktuelle Studienlage zum Einfluss von Integrin $\beta 6$ auf die Metastasierung beim Pankreaskarzinom ist insgesamt ambivalent. Es sind weitere Forschungen notwendig, die die genaue Rolle vom Integrin $\beta 6$ bei der Metastasierung vom Pankreaskarzinom untersuchen.

5.2.3 IgSF

CEACAM7 wird auf allen untersuchten TZV exprimiert und über den gesamten Beobachtungszeitraum konnte kontinuierlich eine hohe Expression für CEACAM7

gezeigt werden. Für andere Adhäsionsmoleküle aus der CEACAM Gruppe konnte bereits gezeigt werden, dass sie klinisch einen Biomarker für das Pankreaskarzinom darstellen können (Gebauer et al., 2014).

Genanalysen zeigten bereits, dass beim PDAC ein höheres Level für die CEACAM7 Expression nachgewiesen werden kann im normalem Pankreasgewebe (Yoshida et al., 2003). Auch in der Studie von Raj et al. konnte bei der Mehrzahl der Zellen des PDAC eine positive CEACAM7 Expression nachgewiesen werden, während auf normalem Pankreasgewebe nur eine geringe, bis keine CEACAM7 Expression vorhanden war. CEACAM7 wurde damit sogar als Angriffsziel für die Behandlung des PDAC untersucht und wurde als potenzieller therapeutischer Angriffspunkt identifiziert (Raj et al., 2021). Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass CEACAM7 auch ein potenzieller frühzeitiger diagnostischer und/oder prognostischer Marker beim Pankreaskarzinom sein kann. Im Vergleich zu anderen Krebsarten und im Vergleich zum gesunden Pankreasgewebe wurde eine signifikant höhere Expression von CEACAM7 beim Pankreaskarzinom festgestellt. Allerdings sind weitere Studien notwendig, die die klinische Anwendbarkeit von CEACAM7 als Biomarker prüfen (Dhasmana et al., 2024).

Auch die kontinuierlich hohe Expression (+++/3) von CEACAM7, die man bei unserem Versuch bei der Peritonealkarzinose des Pankreaskarzinoms vorfinden kann, weist darauf hin, dass CEACAM7 ein vielversprechender Biomarker sein könnte. Eine erhöhte Expression von CEACAM7 war in der Studie von Dhasmana et al. zudem mit einer schlechteren Prognose der Patienten assoziiert (Dhasmana et al., 2024). Über den Einfluss der CEACAM7 Expression auf die Prognose beim Pankreaskarzinom lassen sich aufgrund unserer Versuchsanordnung keine eindeutige Aussagen treffen. Die CEACAM7 Expression änderte sich während der gesamten Beobachtungszeitpunkte nicht. Auch in der Phase, wo erneut ein signifikantes Tumorwachstum beobachtet werden konnte, blieb die CEACAM7 Expression unverändert. Der Tumorprogress ist in unserem Versuch damit nicht mit einer gesteigerten oder reduzierten CEACAM7 Expression assoziiert.

Die CEACAM7 Expression veränderte sich auch kaum auf den durch eine peritoneale Lavage gewonnen Tumorzellen. CEACAM7 verhinderte oder förderte demnach nicht, dass sich Tumorzellen vom peritonealen Zellverband lösen.

Im Vergleich zu den anderen untersuchten Adhäsionsmolekülen der IgSF wird EpCAM nach CEACAM7 am stärksten exprimiert. Zu allen Untersuchungszeitpunkten, mit Ausnahme an Tag 4, konnte auf allen TZV eine positive EpCAM Expression vorgefunden werden. Die Tumorzellen wiesen in unserem Versuch neben einer positiven EpCAM Expression auch eine positive E-Cadherin Expression auf. Gleichzeitig exprimierten die Tumorzellen kein Vimentin und N-Cadherin. Die Tumorzellen wiesen damit eher einen epithelialen Phänotyp auf.

4 Tage nach Injektion der Tumorzellen ist die EpCAM Expression im Vergleich zu den späteren Untersuchungszeitpunkten am niedrigsten. Die EpCAM Expression scheint damit in der Anfangsphase der peritonealen Metastasenentstehung hoch reguliert zu werden und sich danach nicht mehr deutlich zu verändern. In unserem Versuch war damit der Tumorprogress nicht mit einer gesteigerten oder reduzierten EpCAM Expression assoziiert. Die EpCAM Expression scheint sich nur ganz zu Beginn der Formation einer peritonealen Karzinose (zwischen Tag 4 und 7) zu verändern. Wie bereits für Integrin $\beta 1$ und $\beta 4$ angenommen, könnte EpCAM daher die Tumordinvasion fördern. Bei metastatischen Läsionen in einem Mausmodell des Darmkrebses konnte beobachtet werden, dass neu gebildete, kleine metastatische Foci kein EpCAM exprimierten, während größere metastatischen Läsionen erneut EpCAM exprimierten. Die Autoren schlussfolgerten, dass die EpCAM Expression in frühen Stadien der Metastasierung herunterreguliert wird und dass dies durch die EMT beeinflusst wird (Jojović et al., 1998). Bei unserem Versuch änderte sich die Tumorgroße der metastatischen Läsion nicht signifikant zwischen Tag 4 und 7 und nach Tag 7 bleibt die EpCAM Expression relativ konstant. Es ist vorstellbar, dass erst bei einer Tumorgroße, die die an Tag 41 übersteigt, sich die EpCAM Expression ändert. Hierfür wären bei zukünftigen Experimenten Beobachtungszeitpunkte über Tag 41 hinaus erforderlich. Welche Rolle EpCAM genau bei den jeweiligen Schritten der Metastasierungskaskade einnimmt und ob seine Expression die Metastasierung fördert oder sogar inhibiert, ist jedoch nicht ganz klar. EpCAM wird praktisch fast immer bei Adenokarzinomen exprimiert (Munz et al., 2009). Die Studie von Went et al. bestätigt, dass auch beim PDAC fast immer EpCAM exprimiert wird. Zudem zeigte sich, dass das PDAC im Vergleich zu vielen anderen Karzinomen eine besonders starke EpCAM Expression aufweist. Es wird daher angenommen, dass EpCAM genau wie CEACAM7 ein gezielter therapeutischer Ansatzpunkt beim PDAC sein könnte (Went et al., 2004).

L1CAM zeigte in unserer Arbeit im Vergleich zu den anderen untersuchten Adhäsionsmolekülen der IgSF, die geringste Expressionsintensität auf den TZV. Es kann zwar eine positive Expression für L1CAM auf den meisten TZV gefunden werden, allerdings schwankte die Expressionsintensität meist zwischen einer schwachen (+/1) und mittelgradigen (++/2) Expression. Die L1CAM Expression veränderte sich damit in unserem Versuch in Zusammenhang mit dem zeitlichen Fortschreiten der Peritonealkarzinose nicht. L1CAM scheint damit die Tumorprogression in unserem Versuch nicht zu beeinflussen. L1CAM wurde von den Tumorzellen, die durch die intraperitoneale Lavage gewonnen wurden zwar exprimiert, änderte sich im weiteren Verlauf jedoch nicht. L1CAM verhinderte oder förderte demnach nicht, dass sich Tumorzellen vom peritonealen Zellverband lösen.

Eine L1CAM-Expression beim PDAC ist mit einem schlechteren Überleben verbunden und ist ein Indikator für eine schlechtere Prognose (Tsutsumi et al., 2011). L1CAM hat aufgrund der aktuellen Studienlage einen eher fördernden Effekt auf die Tumormetastasierung, welche durch unseren Versuch weder bestätigt noch widerlegt werden kann. Eine antikörperbasierte Hemmung von L1CAM führte in einem Mausexperiment zur Reduktion der Tumormasse peritonealer Metastasen des Ovarialkarzinoms. Die Hemmung verminderte die Proliferation und Dissemination der Tumorzellen. Durch die Behandlung mit einem L1CAM Antikörper wurde die Adhäsion an das Peritoneum nicht beeinflusst. Tumorzellen hefteten trotz L1-Hemmung an denselben Stellen des Peritoneums an und verteilten sich genauso wie bei der Kontrollgruppe ohne anti-L1CAM Behandlung (Arlt et al., 2006). Auch die Studie von Weinspach et al. zeigte, dass eine Hemmung der L1CAM Expression zu einer verringerten Proliferation von Tumorzellen innerhalb der metastatischen Herde führte und zu einer verminderten Dissemination der Tumorzellen in das Lebergewebe. L1CAM wird als wichtiger Regulator des metastatischen Potenzials gesehen und seine Suppression führte zu einer Reduktion der Anzahl metastatischer Kolonien. Die Autoren schlussfolgern, dass L1CAM wahrscheinlich für das Wachstum von Tumorzellen im Zielorgan der Metastasierung notwendig ist (Weinspach et al., 2014).

Alle Tumorzellverbände zeigten bei den Beobachtungszeitpunkten ab Tag 7 eine positive Expression für ICAM-1. Insgesamt war ab diesen Zeitpunkten auf den meisten TZV ein mittelgradiges Expressionslevel für ICAM-1 vorzufinden. Allerdings konnte

keine Veränderung der ICAM-1 Expression in Zusammenhang mit dem Tumorwachstum festgestellt werden. In unserem Versuch war damit die Tumorprogression nicht mit einer veränderten ICAM-1 Expression assoziiert. In verschiedenen Studien wird beschrieben, dass ICAM-1 ein Vermittler der Adhäsion von Tumorzellen an peritoneale Mesothelzellen ist. Die Studie von Książek et al. beschreibt beispielsweise, dass eine Tumorzelllinie des Pankreaskarzinoms und des Kolonkarzinoms mit gesteigerter ICAM-1 Expression auch eine gesteigerte Adhäsion an das Mesothel aufwiesen und kamen somit zu der Schlussfolgerung, dass ICAM-1 wahrscheinlich die Adhäsion an das Peritoneum erleichtert (Książek et al., 2010). Die Expression von ICAM-1 auf Zellen des Mesothels ist ebenfalls wichtig für die Adhäsion von Tumorzellen an das Peritoneum (Alkhamesi et al., 2005). Die Blockade von ICAM-1 auf dem Mesothel führte zu einer reduzierten Fähigkeit von Tumorzellen des Pankreas- und Kolonkarzinoms, an das Mesothel zu binden. ICAM-1 als Zelladhäsionsmolekül auf den Mesothelzellen ist damit wahrscheinlich auch wichtig für die Ausbildung peritonealer Metastasen (Ziprin et al., 2003). ICAM-1 wurde am frühesten Beobachtungszeitpunkt (Tag 4) nur auf den Tumorzellen von einem Präparat exprimiert. Nach unseren Ergebnissen ist daher auch für ICAM-1 anzunehmen, dass es eher nicht an der initialen Adhäsion an das Mesothel beteiligt ist, aber wichtig für die nachfolgende Invasion sein könnte.

Es wird vermutet, dass die Expression von ICAM-1 die Loslösung von Krebszellen vom primären Tumor fördert und zur Migration der Krebszellen und Metastasierung in entfernte Organe beiträgt. Auf Krebszellen des Pankreaskarzinoms konnte eine deutliche Hochregulation der ICAM-1 Expression im Vergleich zu Zellen des physiologischen Pankreasgewebes nachgewiesen werden und es nimmt somit wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Metastasierung des Pankreaskarzinoms ein (Tempia-Caliera et al., 2002). Auf den Tumorzellen, die in unserem Versuch durch eine peritoneale Lavage gewonnen wurden, stieg die ICAM-1 Expression nach 41 Tagen gering an. ICAM-1 könnte demnach auch die Loslösung von Krebszellen von der peritonealen Karzinose fördern.

5.2.4 CD44

Bei verschiedenen Studien wird eine positive CD44 Expression beim Primärtumor des Pankreaskarzinoms mit einer gesteigerten Tumormetastasierung in Verbindung gebracht (Li et al., 2007). Eine Metaanalyse kommt zu dem Schluss, dass die CD44

Expression ein prognostischer Marker beim Pankreaskarzinom ist und die Überexpression mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Liu et al., 2018). Eine hohe CD44 Expression war zudem ein Prädiktor für einen frühen Rückfall nach operativer Resektion des PDAC (HSU et al., 2018).

Bisher steht in der klinischen Praxis kein auf CD44 abzielendes Medikament gegen das Pankreaskarzinom zur Verfügung. Allerdings bietet sich CD44 als Ziel von Therapiestrategien gegen das Pankreaskarzinom an. Durch die Unterdrückung des für CD44 kodierenden Genes auf Zelllinien des Pankreaskarzinoms konnte eine signifikante Hemmung der Tumorgenese, Migration und Invasion erreicht werden (Zhou et al., 2024). Auch auf anderen Tumorarten wie dem Brustkrebs (Chaffer et al., 2013), Kolonkarzinom (Mohamed et al., 2019) und Ovarialkarzinom (Lessan et al., 1999) scheint eine positive CD44 Expression die Tumorprogression zu fördern.

Bei anderen Tumorarten dagegen, wie beispielsweise beim Neuroblastom (Shtivelman and Bishop, 1991) oder beim Prostatakarzinom (Gao et al., 1997) scheint CD44 eher das metastatischen Potenzial der Tumorzellen negativ zu beeinflussen.

Während CD44 beim Primärtumor je nach Tumorart einen unterschiedlichen Einfluss auf die Tumormetastasierung zu haben scheint, stellt sich die Frage, ob eine CD44 Expression an Orten der Fernmetastasierung eher die Tumorprogression fördert oder diese hemmt. Unsere Ergebnisse zeigten, dass CD44 auf Tumorzellen des Pankreaskarzinoms exprimiert wurde, die eine initiale peritoneale Metastase ausbilden. CD44 wurde am frühesten Beobachtungszeitpunkt (Tag 4) und damit in der frühesten Phase der erfassten Tumorprogression kaum exprimiert. Ab Tag 7 stieg die Expression von CD44, blieb dann aber annähernd konstant. Dies lässt auch für CD 44 annehmen, dass es eher nicht an der initialen Adäsion an das Peritoneum beteiligt ist. Nach der Studie von Hosono et al. nehmen sowohl CD44 als auch Integrin $\beta 1$ eine wichtige Rolle bei der initialen Adhäsion von Tumorzellen des Pankreaskarzinoms an peritoneale Mesothelzellen ein. Durch die Verwendung von Antikörpern gegen CD44 oder Integrin $\beta 1$ konnte in einem Mausmodell die Adhäsion von Tumorzellen an das Peritoneum reduziert werden und durch die gleichzeitige Blockierung beider Adhäsionsmoleküle wurde die Adhäsion komplett blockiert (Hosono et al., 1998). Weitere Studien kommen ebenfalls zum Schluss, dass CD44 wichtig für die initiale Adhäsion von Krebszellen an peritoneale Mesothelzellen ist. Tumorzellen des Pankreas- und Magenkarzinoms mit positiver CD44 Expression konnten stärker Mesothelzellen binden und durch Hemmung von CD44 konnte der Adhäsion

entgegengewirkt werden (Nakashio et al., 1997). CD44 ist in der Lage, an verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix zu binden, wie an Hyaluron, Kollagen, Laminin und Fibronectin (Ponta et al., 2003). Es wird davon ausgegangen, dass CD44 in der Lage ist, an auf mesothelialen Zellen befindliche Hyaluronsäure und an stromale Komponenten des Peritoneums zu binden (Nishimura et al., 1996). CD44 wird auch beim Ovarialkarzinom als Vermittler der Adhäsion von Tumorzellen ans Peritoneum angesehen (Gardner et al., 1996, Cannistra et al., 1993). CD44-positive Tumorzellen des Magenkarzinoms wiesen eine signifikant höhere Effizienz bei der Initiierung peritonealer Metastase auf als CD44-negative Zellen. Eine Blockade von CD44 resultierte in signifikant reduzierter Dissemination von peritonealen Zellen *in vivo*. In der Studie wird daher davon ausgegangen, dass CD44 bei der Formation von peritonealen Metastasen hilfreich ist und damit die Blockade von CD44 eine Therapiestrategie zur Verhinderung von peritonealen Metastasen sein kann (Sihmbing et al., 2023). In einer Studie konnte durch gegen CD44 gerichtete Antikörper die Fähigkeit von Tumorzellen an das Mesothel zu binden inhibiert werden (Nishimura et al., 1996).

Die aktuelle Studienlage liefert damit viele Hinweise, dass CD44 eine wichtige Rolle in der Anfangsphase, mutmaßlich bei der initialen Adhäsion an das Mesothel einnimmt. Es gibt auch Studien, die auf eine geringe beziehungsweise keine Beteiligung von CD44 bei der Adhäsion an das Peritoneum hinweisen. Die Verwendung von gegen Integrin $\beta 1$ und CD44 gerichteten Antikörpern beeinflusste die Adhäsion von Tumorzellen eines kolorektalen Karzinoms an das Peritoneum nicht. Die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix konnte durch Blockierung von Integrin $\beta 1$, allerdings nicht durch die Blockierung von CD44, verhindert werden (Schlaeppli et al., 1997). Zudem wurde zwischen Zelllinien des Pankreaskarzinoms, die eine hohe und eine geringe peritoneale Dissemination aufwiesen, keine Unterschiede in der CD44 Expression gefunden (Furuyama et al., 2000). CD44 kommt in verschiedenen Isoformen vor. Es ist möglich, dass der Einfluss, den CD44 auf die Tumorprogression hat, sich je nach Isoform unterscheiden kann. Es wurden beispielsweise verschiedene Isoformen von CD44 auf metastatischen Tumorzellen und auf Tumorzellen des Primärkarzinoms bei einem PDAC nachgewiesen (Rall and Rustgi, 1995). CD44 ist durch die Interaktionen mit seinen korrespondierenden Liganden in der Lage, auf Veränderungen der extrazellulären Mikroumgebung zu reagieren. Es wird vermutet, dass CD44 durch Interpretation dieser Signale zwischen wachstums- und invasionsfördernden Zustand

wechseln kann und dies möglicherweise die Variabilität des Einflusses der CD44 Expression auf die Tumorprogression erklärt (Ponta et al., 2003).

Auf den Tumorzellen, die in unserem Versuch durch eine peritoneale Lavage gewonnen wurden, änderte sich die CD44 Expression im zeitlichen Verlauf nicht. CD44 verhinderte oder förderte demnach nicht, dass sich Tumorzellen vom peritonealen Zellverband lösen.

5.2.5 Cadherine und Vimentin

Bei unserem Versuch konnte auf allen Tumorzellverbänden, mit Ausnahmen von einem Präparat aus der Mauskoorte mit einem Überleben von 14 Tagen, eine positive E-Cadherin Expression nachgewiesen werden. Zudem wiesen alle TZV ab Tag 7 eine starke (+++/3) E-Cadherin Expression auf. Gleichzeitig wurden Vimentin und N-Cadherin nicht exprimiert. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes blieb das Expressionsmuster dieses epithelialen Phänotyps konstant. Das deutet darauf hin, dass Vimentin und N-Cadherin nicht essenziell für die Ausbildung peritonealer Metastasen beim PDAC sind. Es wird eigentlich angenommen, dass N-Cadherin im Zuge der Metastasierungskaskade wichtig für die initiale Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel und für die Diapedese ist (Sökeland and Schumacher, 2019). Unsere Ergebnisse zeigen, dass weder N-Cadherin noch Vimentin für die Adhäsion an das Mesothel und die Ausbildung einer peritonealer Karzinose erforderlich sind.

Die E-Cadherin Expression war in der Mauskoorte mit einem Überleben von 4 Tagen im Vergleich zu den späteren Untersuchungszeitpunkten am geringsten.

Eine positive E-Cadherin Expression auf Karzinometastasen mit vorausgegangenem transientem Verlust der E-Cadherin Expression, wird oft bei der Karzinogenese verschiedener Tumoren beobachtet (Yates et al., 2007). Es wird vermutet, dass eine gesteigerte E-Cadherin Expression und hierdurch vermittelte Adhäsion eine Phase der Dormanz bei frühen mikrometastatischen Läsionen einleitet (Wells et al., 2008). Das die E-Cadherin zum frühesten Beobachtungszeitpunkt am niedrigsten ist, spricht eher dagegen, dass E-Cadherin maßgeblich an der initialen Adhäsion an das Peritoneum beteiligt ist.

An Tag 41, also der Zeitpunkt, an dem wieder ein Tumorwachstum verzeichnet werden konnte, blieb die E-Cadherin Expression unverändert. Das spricht dafür, dass eine Tumorprogression trotz starker E-Cadherin Expression möglich ist. Am Ort des Primärkarzinoms wirkt sich E-Cadherin supprimierend auf die Tumorprogression aus

(van Roy and Berx, 2008) und der Verlust von E-Cadherin beim Primärtumor wird mit einem gesteigerten invasiven Verhalten, Migration und Metastasierung der Tumorzellen in Verbindung gebracht (Christofori, 2006). Um nachzuvollziehen, inwiefern E-Cadherin einen Einfluss auf die Tumorprogression bei metastatischen Läsionen hat, wäre ein Vergleich mit Tumorzellen notwendig, bei denen ein Knockout von E-Cadherin vorgenommen wurde. Tumorzellen des Pankreaskarzinoms mit positiver E-Cadherin Expression zeigten *in vitro* im Vergleich zu Tumorzellen mit geringerer oder nicht vorhandener E-Cadherin Expression, keine Migration mehr. Der Verlust der E-Cadherin Expression ist mit einem invasiveren Phänotyp des Pankreaskarzinoms assoziiert (Weinel et al., 1996). Tumorzellen, die bei unserem Versuch durch eine intraperitoneale Lavage gewonnen wurden, exprimierten E-Cadherin und wiesen eine negative Vimentin und N-Cadherin auf. Tumorzellen können also demnach von metastatischen Läsionen disseminieren, obwohl sie E-Cadherin exprimieren. Nach der aktuellen Studienlage schränkt E-Cadherin beim Primärkarzinom jedoch eindeutig die Tumorprogression ein. Beispielsweise korrelierte der Verlust der E-Cadherin Expression mit einer gesteigerten Lymphknotenmetastasierung, einem fortgeschrittenerem Tumorstadium und einer schlechteren Differenzierung des Tumors (Pignatelli et al., 1994).

Auch bei Patienten, bei denen sich das Pankreaskarzinom in einem noch resektablen Stadium befindet, stellte der Verlust der E-Cadherin Expression auf dem Gewebe einen unabhängigen Prädiktor für ein schlechtes Outcome dar (Hong et al., 2011). Es konnte zudem eine positive Korrelation zwischen dem Level der E-Cadherin Expression auf dem Pankreasgewebe und dem Gesamtüberleben der Patienten festgestellt werden (Wang et al., 2018). Nach der Metaanalyse von Wang und Zhu steht die E-Cadherin Expression stark im Zusammenhang mit dem Risiko, den klinischen Eigenschaften und der Prognose des Pankreaskarzinoms. Das lässt annehmen, dass E-Cadherin ein effektiver Biomarker für die klinische Beurteilung und für die Einschätzung der Prognose beim Pankreaskarzinom sein könnte (Wang and Zhu, 2021).

6 Zusammenfassung

Zelladhäsionsmoleküle nehmen eine wichtige Rolle bei der Metastasierung ein. Ihre Rolle, insbesondere in der frühen Phase der Metastasierung ist jedoch noch gering erforscht. Ein tieferes Verständnis könnte künftig helfen, Metastasen bereits in ihrer Entstehung zu verhindern. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels immunhistochemischer Verfahren untersucht, wie sich die Expression bestimmter Zelladhäsionsmoleküle, die bekanntermaßen eine zentrale Rolle bei der Metastasierung spielen, in der frühen Phase der Peritonealkarzinose- Entstehung beim PDAC verhält.

Das Tumorwachstum der Peritonealkarzinose sowie das Ausmaß der mittels Alu-PCR analysierten Fernmetastasierung blieb zwischen Tag 4 und 14 unverändert. Erst nach 41 Tagen nahm die Tumorgroße der Peritonealkarzinose und das Ausmaß der hämatogenen Metastasierung signifikant zu. Dies deutet darauf hin, dass erst nach einem vorübergehenden Wachstumsstillstand (Dormanz) eine Tumorprogression stattfindet. Nur für das Integrin αV konnte eine gesteigerte Expression im Zusammenhang mit der Tumorprogression festgestellt werden. Aufgrund der Ergebnisse gehen wir davon aus, dass Integrin αV die Tumorprogression bei der Peritonealkarzinose fördert. Die Integrin $\beta 6$ Expression korrelierte in der Phase der Tumordormanz mit der Integrin αV Expression, stieg zum Zeitpunkt der Tumorprogression jedoch im Gegensatz zu Integrin αV nicht an. Integrin $\beta 6$ könnte damit die zu Integrin αV korrelierende Untereinheit sein, die die initiale Adhäsion an das Peritoneum fördert, an der weiteren Tumorprogression scheint jedoch eine andere zu Integrin αV korrespondierende beta Untereinheit beteiligt zu sein. Zudem konnten wir zeigen, dass Integrin $\beta 3$, Vimentin und N-Cadherin nicht essenziell für die Ausbildung einer Peritonealkarzinose sind. Die Expression von Integrin $\beta 1$, $\beta 4$, ICAM-1, EpCAM und CD44 ist erst nach 4 Tagen, also nachdem es bereits zu einer Adhäsion an das Peritoneum kam, angestiegen. Das spricht eher dagegen, dass diese Zelladhäsionsmoleküle, wie in den meisten Studien angenommen wird, die initiale Adhäsion an das Peritoneum fördern. Die Expression dieser Zelladhäsionsmoleküle und von CEACAM 7 änderte sich im Weiteren zeitlichen nicht wesentlich. Anhand unserer Ergebnisse ergaben sich damit keine Hinweise dafür, dass sich diese Zelladhäsionsmoleküle fördernd auf die Tumorprogression bei der initialen Peritonealkarzinose des Pankreaskarzinoms auswirken könnten.

7 Abstract

Cell adhesion molecules play an important role in metastasis. However, their role, particularly in the early phase of metastasis, is still poorly understood. In the future, a deeper understanding could help prevent metastases from occurring. In the present study, immunohistochemical methods were used to investigate the expression of specific cell adhesion molecules, which are known to play a central role in metastasis, during the early phase of peritoneal carcinomatosis development in PDAC. The tumor growth of peritoneal carcinomatosis as well as the extent of distant metastasis analyzed by Alu-PCR remained unchanged between day 4 and day 14. Only after 41 days did the tumor size of the peritoneal carcinomatosis and the extent of hematogenous metastasis increase significantly. This suggests that tumor progression occurs only after a temporary growth arrest (dormancy). Increased expression related to tumor progression was observed only for integrin αV . Based on the results, we assume that integrin αV promotes tumor progression in peritoneal carcinomatosis. Integrin $\beta 6$ expression correlated with integrin αV expression during the tumor dormancy phase but did not increase at the time of tumor progression, in contrast to integrin αV . This suggests that integrin $\beta 6$ may be the subunit corresponding to integrin αV that promotes initial adhesion to the peritoneum, while another beta subunit corresponding to integrin αV appears to be involved in further tumor progression. Additionally, we were able to show that integrin $\beta 3$, vimentin, and N-cadherin are not essential for the development of peritoneal carcinomatosis. The expression of integrin $\beta 1$, $\beta 4$, ICAM-1, EpCAM, and CD44 increased after 4 days, that means after adhesion to the peritoneum had already occurred. This argues against the assumption, as suggested in most studies, that these cell adhesion molecules promote initial adhesion to the peritoneum. The expression of these cell adhesion molecules and CEACAM7 did not change significantly over time. Based on our results, there is no evidence that these cell adhesion molecules promote tumor progression in the initial peritoneal carcinomatosis of pancreatic cancer.

Literaturverzeichnis

- AGARWAL, B., CORREA, A. M. & HO, L. 2008. Survival in Pancreatic Carcinoma Based on Tumor Size. *Pancreas*, 36, e15-e20.
- AGUIRRE-GHISO, J. A. & SOSA, M. S. 2018. Emerging Topics on Disseminated Cancer Cell Dormancy and the Paradigm of Metastasis. *Annual Review of Cancer Biology*, 2, 377-393.
- ALEXAKIS, N., HALLORAN, C., RARATY, M., GHANEH, P., SUTTON, R. & NEOPTOLEMOS, J. P. 2004. Current standards of surgery for pancreatic cancer. *British Journal of Surgery*, 91, 1410-1427.
- ALKHAMESI, N. A., ZIPRIN, P., PFISTERMULLER, K., PECK, D. H. & DARZI, A. W. 2005. ICAM-1 Mediated Peritoneal Carcinomatosis, A Target for Therapeutic Intervention. *Clinical & Experimental Metastasis*, 22, 449-459.
- ALTEVOGT, P., DOBERSTEIN, K. & FOGEL, M. 2016. L1CAM in human cancer. *International Journal of Cancer*, 138, 1565-1576.
- ANSARI, D., BAUDEN, M., BERGSTRÖM, S., RYLANCE, R., MARKO-VARGA, G. & ANDERSSON, R. 2017. Relationship between tumour size and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Surg*, 104, 600-607.
- ARLT, M. J. E., NOVAK-HOFER, I., GAST, D., GSCHWEND, V., MOLDENHAUER, G., GRÜNBERG, J. R., HONER, M., SCHUBIGER, P. A., ALTEVOGT, P. & KRÜGER, A. 2006. Efficient Inhibition of Intra-Peritoneal Tumor Growth and Dissemination of Human Ovarian Carcinoma Cells in Nude Mice by Anti-L1-Cell Adhesion Molecule Monoclonal Antibody Treatment. *Cancer Research*, 66, 936-943.
- BATES, R. C., BELLOVIN, D. I., BROWN, C., MAYNARD, E., WU, B., KAWAKATSU, H., SHEPPARD, D., OETTGEN, P. & MERCURIO, A. M. 2005. Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest*, 115, 339-47.
- BEAUCHEMIN, N. & ARABZADEH, A. 2013. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32, 643-671.
- BERGMANN, F., WANDSCHNEIDER, F., SIPOS, B., MOLDENHAUER, G., SCHNIEWIND, B., WELSCH, T., SCHIRRMACHER, P., KLÖPPEL, G., ALTEVOGT, P., SCHÄFER, H. & SEBENS MÜERKÖSTER, S. 2010. Elevated L1CAM expression in precursor lesions and primary and metastatic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep*, 24, 909-15.
- BRAY, F., LAVERSANNE, M., SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., SOERJOMATARAM, I. & JEMAL, A. 2024. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74, 229-263.
- BUCK, C. A. 1992. Immunoglobulin superfamily: Structure, function and relationship to other receptor molecules. *Seminars in Cell Biology*, 3, 179-188.
- CANNISTRA, S. A., KANSAS, G. S., NILOFF, J., DEFRANZO, B., KIM, Y. & OTTENSMEIER, C. 1993. Binding of Ovarian Cancer Cells to Peritoneal Mesothelium in Vitro Is Partly Mediated by CD44H1. *Cancer Research*, 53, 3830-3838.
- CAO, Y., CHEN, H., SAHGAL, A., ERLER, D., BADELLINO, S., BISWAS, T., DAGAN, R., FOOTE, M. C., LOUIE, A. V., POON, I., RICARDI, U. & REDMOND, K. J. 2021. Volumetric burden of metastatic lesions drives outcomes in patients with extracranial oligometastatic disease. *Cancer Med*, 10, 8091-8099.
- CEELEN, W. P. & LEVINE, E. 2015. *Intraperitoneal cancer therapy: principles and practice*, CRC Press.

- CHAFFER, CHRISTINE L., MARJANOVIC, NEMANJA D., LEE, T., BELL, G., KLEER, CELINA G., REINHARDT, F., D'ALESSIO, ANA C., YOUNG, RICHARD A. & WEINBERG, ROBERT A. 2013. Poised Chromatin at the ZEB1 Promoter Enables Breast Cancer Cell Plasticity and Enhances Tumorigenicity. *Cell*, 154, 61-74.
- CHAMBERS, A. F., GROOM, A. C. & MACDONALD, I. C. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2, 563-572.
- CHAMBERS, A. F., NAUMOV, G. N., VARGHESE, H. J., NADKARNI, K. V., MACDONALD, I. C. & GROOM, A. C. 2001. Critical Steps in Hematogenous Metastasis: An Overview. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 10, 243-255.
- CHEN, J. & BAITHUN, S. I. 1985. Morphological study of 391 cases of exocrine pancreatic tumours with special reference to the classification of exocrine pancreatic carcinoma. *J Pathol*, 146, 17-29.
- CHRISTOFORI, G. 2006. New signals from the invasive front. *Nature*, 441, 444-450.
- CHU, D. Z. J., LANG, N. P., THOMPSON, C., OSTEEEN, P. K. & WESTBROOK, K. C. 1989. Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors. *Cancer*, 63, 364-367.
- COCCOLINI, F., GHEZA, F., LOTTI, M., VIRZÌ, S., IUSCO, D., GHERMANDI, C., MELOTTI, R., BAIOCCHI, G., GIULINI, S. M., ANSALONI, L. & CATENA, F. 2013. Peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol*, 19, 6979-94.
- COOPER, C. R., CHAY, C. H. & PIENTA, K. J. 2002. The role of alpha(v)beta(3) in prostate cancer progression. *Neoplasia*, 4, 191-4.
- CORTÉS-GUIRAL, D., HÜBNER, M., ALYAMI, M., BHATT, A., CELEN, W., GLEHEN, O., LORDICK, F., RAMSAY, R., SGARBURA, O., VAN DER SPEETEN, K., TURAGA, K. K. & CHAND, M. 2021. Primary and metastatic peritoneal surface malignancies. *Nature Reviews Disease Primers*, 7, 91.
- DASGUPTA, A., LIM, A. R. & GHAJAR, C. M. 2017. Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? *Molecular Oncology*, 11, 40-61.
- DE ANGELIS, M. L., FRANCESCANGELI, F., LA TORRE, F. & ZEUNER, A. 2019. Stem cell plasticity and dormancy in the development of cancer therapy resistance. *Frontiers in oncology*, 9, 626.
- DERMODY, T. S., KIRCHNER, E., GUGLIELMI, K. M. & STEHLE, T. 2009. Immunoglobulin Superfamily Virus Receptors and the Evolution of Adaptive Immunity. *PLOS Pathogens*, 5, e1000481.
- 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.
- DESGROSELLIER, J. S., BARNES, L. A., SHIELDS, D. J., HUANG, M., LAU, S. K., PRÉVOST, N., TARIN, D., SHATTIL, S. J. & CHERESH, D. A. 2009. An integrin alpha(v)beta(3)-c-*Src* oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat Med*, 15, 1163-9.
- DHASMANA, A., DHASMANA, S., KOTNALA, S., LASKAR, P., KHAN, S., HAQUE, S., JAGGI, M., YALLAPU, M. M. & CHAUHAN, S. C. 2024. CEACAM7 expression contributes to early events of pancreatic cancer. *Journal of Advanced Research*, 55, 61-72.
- DIMITROFF, C. J., LEE, J. Y., RAFII, S., FUHLBRIGGE, R. C. & SACKSTEIN, R. 2001. CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. *J Cell Biol*, 153, 1277-86.
- DISTLER, M., AUST, D., WEITZ, J., PILARSKY, C. & GRÜTZMANN, R. 2014. Precursor Lesions for Sporadic Pancreatic Cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed Research International*, 2014, 474905.

- DOMEV, H., AMIT, M., LAEVSKY, I., DAR, A. & ITSKOVITZ-ELDOR, J. 2012. Efficient engineering of vascularized ectopic bone from human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 18, 2290-302.
- DUXBURY, M. S., MATROS, E., CLANCY, T., BAILEY, G., DOFF, M., ZINNER, M. J., ASHLEY, S. W., MAITRA, A., REDSTON, M. & WHANG, E. E. 2005. CEACAM6 is a novel biomarker in pancreatic adenocarcinoma and PanIN lesions. *Ann Surg*, 241, 491-6.
- ELANGBAM, C. S., QUALLS, C. W. & DAHLGREN, R. R. 1997. Cell Adhesion Molecules—Update. *Veterinary Pathology*, 34, 61-73.
- ELAYADI, A. N., SAMLI, K. N., PRUDKIN, L., LIU, Y. H., BIAN, A., XIE, X. J., WISTUBA, II, ROTH, J. A., MCGUIRE, M. J. & BROWN, K. C. 2007. A peptide selected by biopanning identifies the integrin alphavbeta6 as a prognostic biomarker for nonsmall cell lung cancer. *Cancer Res*, 67, 5889-95.
- ESPOSITO, I., KONUKIEWITZ, B., SCHLITTER, A. M. & KLÖPPEL, G. 2014. Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: facts, challenges and future developments. *World J Gastroenterol*, 20, 13833-41.
- FARYAMMANESH, R., LANGE, T., WALDMANN, E., HAAS, S., MEYER, C., WICKLEIN, D., SCHUMACHER, U. & HAHN, U. 2014. SDA, a DNA Aptamer Inhibiting E- and P-Selectin Mediated Adhesion of Cancer and Leukemia Cells, the First and Pivotal Step in Transendothelial Migration during Metastasis Formation. *PloS one*, 9, e93173.
- FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D. M., FORMAN, D. & BRAY, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136, E359-86.
- FIDLER, I. J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3, 453-458.
- FIDLER, I. J. & POSTE, G. 2008. The “seed and soil” hypothesis revisited. *The Lancet Oncology*, 9, 808.
- FUJITA, S., SUZUKI, H., KINOSHITA, M. & HIROHASHI, S. 1992. Inhibition of Cell Attachment, Invasion and Metastasis of Human Carcinoma Cells by Anti-integrin $\beta 1$ Subunit Antibody. *Japanese Journal of Cancer Research*, 83, 1317-1326.
- FURUYAMA, H., ARII, S., MORI, A. & IMAMURA, M. 2000. Role of E-cadherin in peritoneal dissemination of the pancreatic cancer cell line, panc-1, through regulation of cell to cell contact. *Cancer Lett*, 157, 201-9.
- GALLMEIER, E. & GRESS, T. M. 2018. Duktales Adenokarzinom des Pankreas. *Der Internist*, 59, 805-822.
- GAO, A. C., LOU, W., DONG, J. T. & ISAACS, J. T. 1997. CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res*, 57, 846-9.
- GARDNER, M. J., CATTERALL, J. B., JONES, L. M. H. & TURNER, G. A. 1996. Human ovarian tumour cells can bind hyaluronic acid via membrane CD44: a possible step in peritoneal metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 14, 325-334.
- GEBAUER, F., WICKLEIN, D., HORST, J., SUNDERMANN, P., MAAR, H., STREICHERT, T., TACHEZY, M., IZBICKI, J. R., BOCKHORN, M. & SCHUMACHER, U. 2014. Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules (CEACAM) 1, 5 and 6 as Biomarkers in Pancreatic Cancer. *PLOS ONE*, 9, e113023.
- GEER, R. J. & BRENNAN, M. F. 1993. Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *The American Journal of Surgery*, 165, 68-73.

- GEISMANN, C., MORSHECK, M., KOCH, D., BERGMANN, F., UNGEFROREN, H., ARLT, A., TSAO, M. S., BACHEM, M. G., ALTEVOGT, P., SIPOS, B., FÖLSCH, U. R., SCHÄFER, H. & MÜERKÖSTER, S. S. 2009. Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor beta1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer. *Cancer Res*, 69, 4517-26.
- GHAJAR, C. M. 2015. Metastasis prevention by targeting the dormant niche. *Nature Reviews Cancer*, 15, 238-247.
- GIANCOTTI, FILIPPO G. 2013. Mechanisms Governing Metastatic Dormancy and Reactivation. *Cell*, 155, 750-764.
- GIRI, B., FERRANTELLA, A., SHARMA, P., JAIN, T., JACOB, H. K. C., MODI, S., KURTOM, S., ROY, P., SETHI, V., BANERJEE, S., MERCHANT, N., RAMAKRISHNAN, S., SALUJA, A. & DUDEJA, V. 2021. An Immunocompetent Model of Pancreatic Cancer Resection and Recurrence. *J Gastrointest Surg*, 25, 1271-1279.
- GLADSON, C. L. & CHERESH, D. A. 1991. Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest*, 88, 1924-32.
- GOMIS, R. R. & GAWRZAK, S. 2017. Tumor cell dormancy. *Mol Oncol*, 11, 62-78.
- GROOT, V. P., REZAEI, N., WU, W., CAMERON, J. L., FISHMAN, E. K., HRUBAN, R. H., WEISS, M. J., ZHENG, L., WOLFGANG, C. L. & HE, J. 2018. Patterns, Timing, and Predictors of Recurrence Following Pancreatectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg*, 267, 936-945.
- GRZESIAK, J. J., CAO, H. S. T., BURTON, D. W., KAUSHAL, S., VARGAS, F., CLOPTON, P., SNYDER, C. S., DEFTOS, L. J., HOFFMAN, R. M. & BOUVET, M. 2011. Knockdown of the $\beta 1$ integrin subunit reduces primary tumor growth and inhibits pancreatic cancer metastasis. *International Journal of Cancer*, 129, 2905-2915.
- GUMBINER, B. M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 622-34.
- GUO, W. & GIANCOTTI, F. G. 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 816-826.
- GUPTA, G. P. & MASSAGUÉ, J. 2006. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, 127, 679-695.
- HASSAN, R. & HO, M. 2008. Mesothelin targeted cancer immunotherapy. *Eur J Cancer*, 44, 46-53.
- HAYDINGER, C. D., ASHANDER, L. M., TAN, A. C. R. & SMITH, J. R. 2023. Intercellular Adhesion Molecule 1: More than a Leukocyte Adhesion Molecule. *Biology*, 12, 743.
- HAZELBAG, S., KENTER, G. G., GORTER, A., DREEF, E. J., KOOPMAN, L. A., VIOLETTE, S. M., WEINREB, P. H. & FLEUREN, G. J. 2007. Overexpression of the alpha v beta 6 integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival. *J Pathol*, 212, 316-24.
- HEALY, J. C. & REZNEK, R. H. 1998. The peritoneum, mesenteries and omenta: normal anatomy and pathological processes. *European Radiology*, 8, 886-900.
- HERRICK, S. E. & MUTSAERS, S. E. 2004. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 621-42.
- HEZEL, A. F., DESHPANDE, V., ZIMMERMAN, S. M., CONTINO, G., ALAGESAN, B., O'DELL, M. R., RIVERA, L. B., HARPER, J., LONNING, S., BREKKEN, R. A. & BARDEESY, N. 2012. TGF- β and $\alpha\beta 6$ Integrin Act in a Common Pathway to Suppress Pancreatic Cancer Progression. *Cancer Research*, 72, 4840-4845.
- HEZEL, A. F., KIMMELMAN, A. C., STANGER, B. Z., BARDEESY, N. & DEPINHO, R. A. 2006. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 20, 1218-49.

- HILL, C. A. S. 2011. Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis. *FBL*, 16, 3233-3251.
- HISHINUMA, S., OGATA, Y., TOMIKAWA, M., OZAWA, I., HIRABAYASHI, K. & IGARASHI, S. 2006. Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings. *J Gastrointest Surg*, 10, 511-8.
- HONG, S.-M., LI, A., OLINO, K., WOLFGANG, C. L., HERMAN, J. M., SCHULICK, R. D., IACOBUZIO-DONAHUE, C., HRUBAN, R. H. & GOGGINS, M. 2011. Loss of E-cadherin expression and outcome among patients with resectable pancreatic adenocarcinomas. *Modern Pathology*, 24, 1237-1247.
- HOSONO, J., NARITA, T., KIMURA, N., SATO, M., NAKASHIO, T., KASAI, Y., NONAMI, T., NAKAO, A., TAKAGI, H. & KANNAGI, R. 1998. Involvement of adhesion molecules in metastasis of SW1990, human pancreatic cancer cells. *J Surg Oncol*, 67, 77-84.
- HOSOTANI, R., KAWAGUCHI, M., MASUI, T., KOSHIBA, T., IDA, J., FUJIMOTO, K., WADA, M., DOI, R. & IMAMURA, M. 2002. Expression of Integrin $\alpha V\beta 3$ in Pancreatic Carcinoma: Relation to MMP-2 Activation and Lymph Node Metastasis. *Pancreas*, 25, e30-e35.
- HSU, C.-P., LEE, L.-Y., HSU, J.-T., HSU, Y.-P., WU, Y.-T., WANG, S.-Y., YEH, C.-N., CHEN, T.-C. & HWANG, T.-L. 2018. CD44 Predicts Early Recurrence in Pancreatic Cancer Patients Undergoing Radical Surgery. *In Vivo*, 32, 1533-1540.
- HSU, M. Y., SHIH, D. T., MEIER, F. E., VAN BELLE, P., HSU, J. Y., ELDER, D. E., BUCK, C. A. & HERLYN, M. 1998. Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma. *Am J Pathol*, 153, 1435-42.
- HUMPHRIES, J. D., BYRON, A. & HUMPHRIES, M. J. 2006. Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science*, 119, 3901-3903.
- HUR, C., TRAMONTANO, A. C., DOWLING, E. C., BROOKS, G. A., JEON, A., BRUGGE, W. R., GAZELLE, G. S., KONG, C. Y. & PANDHARIPANDE, P. V. 2016. Early Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Survival Is Dependent on Size: Positive Implications for Future Targeted Screening. *Pancreas*, 45, 1062-1066.
- HYNES, R. O. 1987. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell*, 48, 549-554.
- HYNES, R. O. 1999. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol*, 9, M33-7.
- HYNES, R. O. 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 110, 673-687.
- ISHII, Y., OCHIAI, A., YAMADA, T., AKIMOTO, S., YANAGIHARA, K., KITAJIMA, M. & HIROHASHI, S. 2000. Integrin $\alpha 6\beta 4$ as a suppressor and a predictive marker for peritoneal dissemination in human gastric cancer. *Gastroenterology*, 118, 497-506.
- JAYNE, D. G., O'LEARY, R., GILL, A., HICK, A. & GUILLOU, P. J. 1999. A three-dimensional in-vitro model for the study of peritoneal tumour metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 17, 515-23.
- JOJOVIĆ, M., ADAM, E., ZANGEMEISTER-WITTKE, U. & SCHUMACHER, U. 1998. Epithelial glycoprotein-2 expression is subject to regulatory processes in epithelial-mesenchymal transitions during metastases: an investigation of human cancers transplanted into severe combined immunodeficient mice. *Histochem J*, 30, 723-9.
- KALININA, T., GÜNGÖR, C., THIELTGES, S., MÖLLER-KRULL, M., MURGA PENAS, E. M., WICKLEIN, D., STREICHERT, T., SCHUMACHER, U., KALININ, V., SIMON, R., OTTO, B., DIERLAMM, J., SCHWARZENBACH, H., EFFENBERGER, K. E., BOCKHORN, M., IZBICKI, J. R. & YEKEBAS, E. F. 2010. Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung. *BMC Cancer*, 10, 295.

- KARRISON, T. G., FERGUSON, D. J. & MEIER, P. 1999. Dormancy of Mammary Carcinoma After Mastectomy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 91, 80-85.
- KAUR, S., KENNY, H. A., JAGADEESWARAN, S., ZILLHARDT, M. R., MONTAG, A. G., KISTNER, E., YAMADA, S. D., MITRA, A. K. & LENGYEL, E. 2009. β 3-integrin expression on tumor cells inhibits tumor progression, reduces metastasis, and is associated with a favorable prognosis in patients with ovarian cancer. *Am J Pathol*, 175, 2184-96.
- KELSEN, D. P., PORTENOY, R., THALER, H., TAO, Y. & BRENNAN, M. 1997. Pain as a predictor of outcome in patients with operable pancreatic carcinoma. *Surgery*, 122, 53-9.
- KEMPER, M., SCHIECKE, A., MAAR, H., NIKULIN, S., POLOZNIKOV, A., GALATENKO, V., TACHEZY, M., GEBAUER, F., LANGE, T., RIECKEN, K., TONEVITSKY, A., AIGNER, A., IZBICKI, J., SCHUMACHER, U. & WICKLEIN, D. 2021. Integrin α -V is an important driver in pancreatic adenocarcinoma progression. *J Exp Clin Cancer Res*, 40, 214.
- KENNY, H. A., KRAUSZ, T., YAMADA, S. D. & LENGYEL, E. 2007. Use of a novel 3D culture model to elucidate the role of mesothelial cells, fibroblasts and extra-cellular matrices on adhesion and invasion of ovarian cancer cells to the omentum. *Int J Cancer*, 121, 1463-72.
- KIEFEL, H., BONDONG, S., HAZIN, J., RIDINGER, J., SCHIRMER, U., RIEDLE, S. & ALTEVOGT, P. 2012. L1CAM: a major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell Adh Migr*, 6, 374-84.
- KIYASU, Y., KANESHIMA, S. & KOGA, S. 1981. Morphogenesis of peritoneal metastasis in human gastric cancer. *Cancer Res*, 41, 1236-9.
- KLEIN, C. A. 2009. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*, 9, 302-12.
- KLEIN, C. A. 2020. Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. *Nature Reviews Cancer*, 20, 681-694.
- KSIĄŻEK, K., MIKUŁA-PIETRASIŁ, J., CATAR, R., DWORACKI, G., WINCKIEWICZ, M., FRYDRYCHOWICZ, M., DRAGUN, D., STANISZEWSKI, R., JÖRRES, A. & WITOWSKI, J. 2010. Oxidative stress-dependent increase in ICAM-1 expression promotes adhesion of colorectal and pancreatic cancers to the senescent peritoneal mesothelium. *International Journal of Cancer*, 127, 293-303.
- KULENOVIĆ, A. & SARAC-HADZIHAILOVIĆ, A. 2010. Blood vessels distribution in body and tail of pancreas- a comparative study of age related variation. *Bosn J Basic Med Sci*, 10, 89-93.
- KUSAMURA, S., BARATTI, D., ZAFFARONI, N., VILLA, R., LATERZA, B., BALESTRA, M. & DERACO, M. 2010. Pathophysiology and biology of peritoneal carcinomatosis. *World journal of gastrointestinal oncology*, 2, 12-8.
- LEE, E. C., LOTZ, M. M., STEELE, G. D., JR & MERCURIO, A. M. 1992. The integrin α 6 β 4 is a laminin receptor. *Journal of Cell Biology*, 117, 671-678.
- LEE, J. G., AHN, J. H., JIN KIM, T., HO LEE, J. & CHOI, J. H. 2015. Mutant p53 promotes ovarian cancer cell adhesion to mesothelial cells via integrin β 4 and Akt signals. *Sci Rep*, 5, 12642.
- LEITLINIENPROGRAMM-ONKOLOGIE. 2023. *Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 3.01, 2023, AWMF Registernummer: 032-0100L* [Online]. Available: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/pankreaskarzinom/> [Accessed 03.01.24].

- LESSAN, K., AGUIAR, D. J., OEGEMA, T., SIEBENSON, L. & SKUBITZ, A. P. 1999. CD44 and beta1 integrin mediate ovarian carcinoma cell adhesion to peritoneal mesothelial cells. *Am J Pathol*, 154, 1525-37.
- LI, C., HEIDT, D. G., DALERBA, P., BURANT, C. F., ZHANG, L., ADSAY, V., WICHA, M., CLARKE, M. F. & SIMEONE, D. M. 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 67, 1030-7.
- LI, S., KENNEDY, M., PAYNE, S., KENNEDY, K., SEEWALDT, V. L., PIZZO, S. V. & BACHELDER, R. E. 2014. Model of Tumor Dormancy/Recurrence after Short-Term Chemotherapy. *PLOS ONE*, 9, e98021.
- LIU, Y., WU, T., LU, D., ZHEN, J. & ZHANG, L. 2018. CD44 overexpression related to lymph node metastasis and poor prognosis of pancreatic cancer. *The International Journal of Biological Markers*, 33, 308-313.
- LIU, Z., WANG, F. & CHEN, X. 2008. Integrin alpha(v)beta(3)-Targeted Cancer Therapy. *Drug Dev Res*, 69, 329-339.
- LU, X., MU, E., WEI, Y., RIETHDORF, S., YANG, Q., YUAN, M., YAN, J., HUA, Y., TIEDE, B. J., LU, X., HAFFTY, B. G., PANTEL, K., MASSAGUÉ, J. & KANG, Y. 2011. VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging $\alpha 4 \beta 1$ -positive osteoclast progenitors. *Cancer Cell*, 20, 701-14.
- LUO, W., WANG, J., CHEN, H., YE, L., QIU, J., LIU, Y., WANG, R., WENG, G., LIU, T., SU, D., TAO, J., DING, C., YOU, L. & ZHANG, T. 2023. Epidemiology of pancreatic cancer: New version, new vision. *Chin J Cancer Res*, 35, 438-450.
- MA, B., WELLS, A., WEI, L. & ZHENG, J. 2021. Prostate cancer liver metastasis: Dormancy and resistance to therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 71, 2-9.
- MAITRA, A., FUKUSHIMA, N., TAKAORI, K. & HRUBAN, R. H. 2005. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol*, 12, 81-91.
- MAITRA, A. & HRUBAN, R. H. 2008. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol*, 3, 157-88.
- MARSDEN, C. G., WRIGHT, M. J., CARRIER, L., MOROZ, K., POCHAMPALLY, R. & ROWAN, B. G. 2012. "A novel in vivo model for the study of human breast cancer metastasis using primary breast tumor-initiating cells from patient biopsies". *BMC Cancer*, 12, 10.
- MERCURIO, A. M. & RABINOVITZ, I. 2001. Towards a mechanistic understanding of tumor invasion—lessons from the $\alpha 6 \beta 4$ integrin. *Seminars in Cancer Biology*, 11, 129-141.
- MERENDINO, A. M., BUCCHIERI, F., CAMPANELLA, C., MARCIANO, V., RIBBENE, A., DAVID, S., ZUMMO, G., BURGIO, G., CORONA, D. F. V., DE MACARIO, E. C., MACARIO, A. J. L. & CAPPELLO, F. 2010. Hsp60 Is Actively Secreted by Human Tumor Cells. *PLOS ONE*, 5, e9247.
- MILES, F. L., PRUITT, F. L., VAN GOLEN, K. L. & COOPER, C. R. 2008. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 25, 305-324.
- MOHAMED, S. Y., KAF, R. M., AHMED, M. M., ELWAN, A., ASHOUR, H. R. & IBRAHIM, A. 2019. The Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers (Notch1, ALDH1, and CD44) in Primary Colorectal Carcinoma. *J Gastrointest Cancer*, 50, 824-837.
- MUNZ, M., BAEUERLE, P. A. & GIRES, O. 2009. The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. *Cancer Research*, 69, 5627-5629.
- MUTSAERS, S. E. 2002. Mesothelial cells: Their structure, function and role in serosal repair. *Respirology*, 7, 171-191.
- MUTSAERS, S. E., PRÊLE, C. M., PENGELLY, S. & HERRICK, S. E. 2016. Mesothelial cells and peritoneal homeostasis. *Fertil Steril*, 106, 1018-1024.

- MUTSARES, S. E. 2002. Mesothelial cells: Their structure, function and role in serosal repair. *Respirology*, 7, 171-191.
- NAKAJIMA, S., DOI, R., TOYODA, E., TSUJI, S., WADA, M., KOIZUMI, M., TULACHAN, S. S., ITO, D., KAMI, K., MORI, T., KAWAGUCHI, Y., FUJIMOTO, K., HOSOTANI, R. & IMAMURA, M. 2004. N-Cadherin Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10, 4125-4133.
- NAKASHIO, T., NARITA, T., AKIYAMA, S., KASAI, Y., FUJIWARA, M., ITO, K., TAKAGI, H. & KANNGI, R. 1997. Adhesion of human gastric and pancreatic cancer cells to peritoneal mesothelial cells is mediated by CD44 and beta(1) integrin. *Int J Oncol*, 10, 183-8.
- NAOR, D., NEDVETZKI, S., GOLAN, I., MELNIK, L. & FAITELSON, Y. 2002. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 39, 527-79.
- NATIONAL-CANCER-INSTITUTE. 2023. *An interactive website for SEER cancer statistics. Surveillance Research Program, National Cancer Institute* [Online]. Available: https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=40&data_type=1&graph_type=14&compareBy=sex&chk_sex_3=3&chk_sex_2=2&series=9&race=1&hdn_view=1#resultsRegion1 [Accessed 01.02.2024 2024].
- NEHMANN, N., WICKLEIN, D., SCHUMACHER, U. & MÜLLER, R. 2010. Comparison of two techniques for the screening of human tumor cells in mouse blood: quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) versus laser scanning cytometry (LSC). *Acta Histochem*, 112, 489-96.
- NEOPTOLEMOS, J. P., STOCKEN, D. D., FRIESS, H., BASSI, C., DUNN, J. A., HICKEY, H., BEGER, H., FERNANDEZ-CRUZ, L., DERVENIS, C., LACAIINE, F., FALCONI, M., PEDERZOLI, P., PAP, A., SPOONER, D., KERR, D. J. & BÜCHLER, M. W. 2004. A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*, 350, 1200-1210.
- NISHIMURA, S., CHUNG, Y.-S., YASHIRO, M., INOUE, T. & SOWA, M. 1996. CD44H Plays an Important Role in Peritoneal Dissemination of Scirrhous Gastric Cancer Cells. *Japanese Journal of Cancer Research*, 87, 1235-1244.
- PANNALA, R., LEIRNESS, J. B., BAMLET, W. R., BASU, A., PETERSEN, G. M. & CHARI, S. T. 2008. Prevalence and Clinical Profile of Pancreatic Cancer–Associated Diabetes Mellitus. *Gastroenterology*, 134, 981-987.
- PANSKY, B. 1990. Anatomy of the pancreas. *International journal of pancreatology*, 7, 101-108.
- PANTEL, K., BRAKENHOFF, R. H. & BRANDT, B. 2008. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, 8, 329-340.
- PARK, W., CHAWLA, A. & O'REILLY, E. M. 2021. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA*, 326, 851-862.
- PEKAREK, L., FRAILE-MARTINEZ, O., GARCIA-MONTERO, C., ALVAREZ-MON, M. A., ACERO, J., RUIZ-LLORENTE, L., GARCÍA-HONDUVILLA, N., ALBILLOS, A., BUJÁN, J. & ALVAREZ-MON, M. 2021. Towards an updated view on the clinical management of pancreatic adenocarcinoma: Current and future perspectives. *Oncology Letters*, 22, 1-11.
- PELAEZ-LUNA, M., TAKAHASHI, N., FLETCHER, J. G. & CHARI, S. T. 2007. Resectability of Presymptomatic Pancreatic Cancer and Its Relationship to Onset of Diabetes: A Retrospective Review of CT Scans and Fasting Glucose Values Prior to Diagnosis. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG*, 102, 2157-2163.

- PIGNATELLI, M., ANSARI, T. W., GUNTER, P., LIU, D., HIRANO, S., TAKEICHI, M., KLÖPPEL, G. & LEMOINE, N. R. 1994. Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: Correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage. *The Journal of Pathology*, 174, 243-248.
- PLOW, E. F., HAAS, T. A., ZHANG, L., LOFTUS, J. & SMITH, J. W. 2000. Ligand Binding to Integrins *. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 21785-21788.
- PONTA, H., SHERMAN, L. & HERRLICH, P. A. 2003. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 33-45.
- PORTA, M., FABREGAT, X., MALATS, N., GUARNER, L., CARRATO, A., DE MIGUEL, A., RUIZ, L., JARIOD, M., COSTAFREDA, S., COLL, S., ALGUACIL, J., COROMINAS, J. M., SOLÀ, R., SALAS, A. & REAL, F. X. 2005. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol*, 7, 189-97.
- RAFTERY, A. T. 1979. Regeneration of peritoneum: a fibrinolytic study. *J Anat*, 129, 659-64.
- RAJ, D., NIKOLAIDI, M., GARCES, I., LORIZIO, D., CASTRO, N. M., CAIAFA, S. G., MOORE, K., BROWN, N. F., KOCHER, H. M., DUAN, X., NELSON, B. H., LEMOINE, N. R. & MARSHALL, J. F. 2021. CEACAM7 Is an Effective Target for CAR T-cell Therapy of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 27, 1538-1552.
- RALL, C. J. N. & RUSTGI, A. K. 1995. CD44 Isoform Expression in Primary and Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Research*, 55, 1831-1835.
- RAWLA, P., SUNKARA, T. & GADUPUTI, V. 2019. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol*, 10, 10-27.
- READER, C. S., VALLATH, S., STEELE, C. W., HAIDER, S., BRENTNALL, A., DESAI, A., MOORE, K. M., JAMIESON, N. B., CHANG, D., BAILEY, P., SCARPA, A., LAWLOR, R., CHELALA, C., KEYSE, S. M., BIANKIN, A., MORTON, J. P., EVANS, T. J., BARRY, S. T., SANSOM, O. J., KOCHER, H. M. & MARSHALL, J. F. 2019. The integrin $\alpha\beta 6$ drives pancreatic cancer through diverse mechanisms and represents an effective target for therapy. *J Pathol*, 249, 332-342.
- RECASENS, A. & MUNOZ, L. 2019. Targeting Cancer Cell Dormancy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40, 128-141.
- REYMOND, N., D'ÁGUA, B. B. & RIDLEY, A. J. 2013. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 13, 858-870.
- RHIM, ANDREW D., MIREK, EMILY T., AIELLO, NICOLE M., MAITRA, A., BAILEY, JENNIFER M., MCALLISTER, F., REICHERT, M., BEATTY, GREGORY L., RUSTGI, ANIL K., VONDERHEIDE, ROBERT H., LEACH, STEVEN D. & STANGER, BEN Z. 2012. EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation. *Cell*, 148, 349-361.
- RISSON, E., NOBRE, A. R., MAGUER-SATTA, V. & AGUIRRE-GHISO, J. A. 2020. The current paradigm and challenges ahead for the dormancy of disseminated tumor cells. *Nat Cancer*, 1, 672-680.
- RONCKERS, C., SPIX, C., TRÜBENBACH, C., KATALINIC, A., CHRIST, M., CICERO, A., FOLKERTS, J., HANSMANN, J., KRANZHÖFER, K. & KUNZ, B. 2023. Krebs in Deutschland für 2019/2020.
- ROSETTE, C., ROTH, R. B., OETH, P., BRAUN, A., KAMMERER, S., EKBLÖM, J. & DENISSENKO, M. F. 2005. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 26, 943-50.
- ROSSI, M. L., REHMAN, A. A. & GONDI, C. S. 2014. Therapeutic options for the management of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 20, 11142-59.

- SAHORA, K., KÜHRER, I., TRENKWITZ, D., FRIEDL, J., SAUTNER, T., GÖTZINGER, P. & GNANT, M. 2009. Pankreaskarzinom und periampulläres Karzinom. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen*, 7, 36-44.
- 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. *Seminars in Cancer Biology*, 45, 50-57.
- SCHAWKAT, K., MANNING, M. A., GLICKMAN, J. N. & MORTELE, K. J. 2020. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants: Pearls and Perils. *RadioGraphics*, 40, 1219-1239.
- SCHLAEPLI, M., RÜEGG, C., TRÂN-THANG, C., CHAPUIS, G., TEVAEARAI, H., LAHM, H. & SORDAT, B. 1997. Role of integrins and evidence for two distinct mechanisms mediating human colorectal carcinoma cell interaction with peritoneal mesothelial cells and extracellular matrix. *Cell Adhes Commun*, 4, 439-55.
- SCHLITTER, A. M., KONUKIEWITZ, B., KASAJIMA, A., REICHERT, M. & KLÖPPEL, G. 2021. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas: Subtypen und Molekularpathologie. *Der Pathologe*, 42, 464-471.
- SCHÖLZEL, S., ZIMMERMANN, W., SCHWARZKOPF, G., GRUNERT, F., ROGACZEWSKI, B. & THOMPSON, J. 2000. Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. *Am J Pathol*, 156, 595-605.
- SCREATON, G. R., BELL, M. V., JACKSON, D. G., CORNELIS, F. B., GERTH, U. & BELL, J. I. 1992. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 12160-4.
- SEUFFERLEIN, T., MAYERLE, J., BOECK, S., BRUNNER, T., ETTRICH, T. J., GRENACHER, L., GRESS, T. M., HACKERT, T., HEINEMANN, V. & KESTLER, A. 2024. S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom–Version 3.1. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 62, e874-e995.
- SHINKAI, Y., RATHBUN, G., LAM, K. P., OLTZ, E. M., STEWART, V., MENDELSON, M., CHARRON, J., DATTA, M., YOUNG, F., STALL, A. M. & ET AL. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, 68, 855-67.
- SHINTANI, Y., FUKUMOTO, Y., CHAIKA, N., GRANDGENETT, P. M., HOLLINGSWORTH, M. A., WHELOCK, M. J. & JOHNSON, K. R. 2008. ADH-1 suppresses N-cadherin-dependent pancreatic cancer progression. *Int J Cancer*, 122, 71-7.
- SHTIVELMAN, E. & BISHOP, J. M. 1991. Expression of CD44 is repressed in neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol*, 11, 5446-53.
- SIEGEL, R. L., GIAQUINTO, A. N. & JEMAL, A. 2024. Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74, 12-49.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., WAGLE, N. S. & JEMAL, A. 2023. Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73, 17-48.
- SIHOMBING, A. M., MURATA, S., SHIMOJI, M., MIYAKE, T., TAKEBAYASHI, K., KODAMA, H., TOKUDA, A., KOJIMA, M., UEKI, T., KITAMURA, N., KITAMURA, M., MEKATA, E. & TANI, M. 2023. CD44-positive Cancer Stem-like Cells as a Potential Source of Peritoneal Metastasis After Surgery. *Anticancer Research*, 43, 2491-2500.
- SIMÓN-GRACIA, L., HUNT, H. & TEESALU, T. 2018. Peritoneal Carcinomatosis Targeting with Tumor Homing Peptides. *Molecules*, 23.
- SIPOS, B., HAHN, D., CARCELLER, A., PIULATS, J., HEDDERICH, J., KALTHOFF, H., GOODMAN, S. L., KOSMAHL, M. & KLÖPPEL, G. 2004. Immunohistochemical

- screening for beta6-integrin subunit expression in adenocarcinomas using a novel monoclonal antibody reveals strong up-regulation in pancreatic ductal adenocarcinomas in vivo and in vitro. *Histopathology*, 45, 226-36.
- SKUBITZ, A. P. 2002. Adhesion molecules. *Cancer Treat Res*, 107, 305-29.
- SMEENK, H. G., TRAN, T. C., ERDMANN, J., VAN EIJCK, C. H. & JEEKEL, J. 2005. Survival after surgical management of pancreatic adenocarcinoma: does curative and radical surgery truly exist? *Langenbecks Arch Surg*, 390, 94-103.
- SPRINGER, T. A. & WANG, J.-H. 2004. The Three-Dimensional Structure of Integrins and their Ligands, and Conformational Regulation of Cell Adhesion. *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press.
- STAUNTON, D. E., MARLIN, S. D., STRATOWA, C., DUSTIN, M. L. & SPRINGER, T. A. 1988. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*, 52, 925-933.
- STORZ, P. & CRAWFORD, H. C. 2020. Carcinogenesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 158, 2072-2081.
- STRELL, C. & ENTSCHLADEN, F. 2008. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Communication and Signaling*, 6, 10.
- SU, Y., LI, J., WITKIEWICZ, A. K., BRENNAN, D., NEILL, T., TALARICO, J. & RADICE, G. L. 2012. N-cadherin haploinsufficiency increases survival in a mouse model of pancreatic cancer. *Oncogene*, 31, 4484-9.
- SUGARBAKER, E. V., COHEN, A. M. & KETCHAM, A. S. 1971. Do metastases metastasize? *Ann Surg*, 174, 161-6.
- SUGARBAKER, P. H. 1999. Management of peritoneal-surface malignancy: the surgeon's role. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 384, 576-587.
- SÖKELAND, G. & SCHUMACHER, U. 2019. The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Mol Cancer*, 18, 12.
- TAGLIABUE, E., GHIRELLI, C., SQUICCIARINI, P., AIELLO, P., COLNAGHI, M. I. & MÉNARD, S. 1998. Prognostic value of alpha 6 beta 4 integrin expression in breast carcinomas is affected by laminin production from tumor cells. *Clin Cancer Res*, 4, 407-10.
- TALATHI, S. S., ZIMMERMAN, R. & YOUNG, M. 2022. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Pancreas. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- TANAKA, M., MIHALJEVIC, A. L., PROBST, P., HECKLER, M., KLAIBER, U., HEGER, U., BÜCHLER, M. W. & HACKERT, T. 2019. Meta-analysis of recurrence pattern after resection for pancreatic cancer. *Br J Surg*, 106, 1590-1601.
- TEMPIA-CALIERA, A. A., HORVATH, L. Z., ZIMMERMANN, A., TIHANYI, T. T., KORC, M., FRIESS, H. & BÜCHLER, M. W. 2002. Adhesion molecules in human pancreatic cancer*. *Journal of Surgical Oncology*, 79, 93-100.
- TENTES, A. A., PALLAS, N., KARAMVERI, C., KYZIRIDIS, D. & HRISTAKIS, C. 2018. Cytoreduction and HIPEC for peritoneal carcinomatosis of pancreatic cancer. *J buon*, 23, 482-487.
- THIERY, J. P. & SLEEMAN, J. P. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 131-142.
- THOMASSEN, I., LEMMENS, V. E., NIENHUIJS, S. W., LUYER, M. D., KLAVER, Y. L. & DE HINGH, I. H. 2013. Incidence, prognosis, and possible treatment strategies of peritoneal carcinomatosis of pancreatic origin: a population-based study. *Pancreas*, 42, 72-5.
- TSUTSUMI, S., MOROHASHI, S., KUDO, Y., AKASAKA, H., OGASAWARA, H., ONO, M., TAKASUGI, K., ISHIDO, K., HAKAMADA, K. & KIJIMA, H. 2011. L1 Cell

- adhesion molecule (L1CAM) expression at the cancer invasive front is a novel prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Surg Oncol*, 103, 669-73.
- VALASTYAN, S. & WEINBERG, R. A. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147, 275-92.
- VAN AARSEN, L. A., LEONE, D. R., HO, S., DOLINSKI, B. M., MCCOON, P. E., LEPAGE, D. J., KELLY, R., HEANEY, G., RAYHORN, P., REID, C., SIMON, K. J., HORAN, G. S., TAO, N., GARDNER, H. A., SKELLY, M. M., GOWN, A. M., THOMAS, G. J., WEINREB, P. H., FAWELL, S. E. & VIOLETTE, S. M. 2008. Antibody-mediated blockade of integrin alpha v beta 6 inhibits tumor progression in vivo by a transforming growth factor-beta-regulated mechanism. *Cancer Res*, 68, 561-70.
- VAN BAAL, J. O., VAN DE VIJVER, K. K., NIEUWLAND, R., VAN NOORDEN, C. J., VAN DRIEL, W. J., STURK, A., KENTER, G. G., RIKKERT, L. G. & LOK, C. A. 2017. The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum. *Tissue Cell*, 49, 95-105.
- VAN DEN TOL, P. M., VAN ROSSEN, E. E., VAN EIJCK, C. H., BONTHUIS, F., MARQUET, R. L. & JEEKEL, H. 1998. Reduction of peritoneal trauma by using nonsurgical gauze leads to less implantation metastasis of spilled tumor cells. *Ann Surg*, 227, 242-8.
- VAN DER FLIER, A. & SONNENBERG, A. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell and Tissue Research*, 305, 285-298.
- VAN HECK, N. T., MEEKER, A. K., KERN, S. E., YEO, C. J., LILLEMOR, K. D., CAMERON, J. L., OFFERHAUS, G. J., HICKS, J. L., WILENTZ, R. E., GOGGINS, M. G., DE MARZO, A. M., HRUBAN, R. H. & MAITRA, A. 2002. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol*, 161, 1541-7.
- VAN ROY, F. & BERX, G. 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 3756-3788.
- VOGELMANN, R., KREUSER, E. D., ADLER, G. & LUTZ, M. P. 1999. Integrin alpha6beta1 role in metastatic behavior of human pancreatic carcinoma cells. *Int J Cancer*, 80, 791-5.
- VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 2015. The Path to Cancer --Three Strikes and You're Out. *N Engl J Med*, 373, 1895-8.
- WAI WONG, C., DYE, D. E. & COOMBE, D. R. 2012. The Role of Immunoglobulin Superfamily Cell Adhesion Molecules in Cancer Metastasis. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 340296.
- WALSH, C. M., MATLOUBIAN, M., LIU, C. C., UEDA, R., KURAHARA, C. G., CHRISTENSEN, J. L., HUANG, M. T., YOUNG, J. D., AHMED, R. & CLARK, W. R. 1994. Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 10854-10858.
- WANG, P. & ZHU, Z. 2021. Prognostic and clinicopathological significance of E-cadherin in pancreatic cancer patients: a meta-analysis. *Frontiers in oncology*, 11, 627116.
- WANG, W., DONG, L., ZHAO, B., LU, J. & ZHAO, Y. 2018. E-cadherin is downregulated by microenvironmental changes in pancreatic cancer and induces EMT. *Oncol Rep*, 40, 1641-1649.
- WEINEL, R. J., NEUMANN, K., KISKER, O. & ROSENDAHL, A. 1996. Expression and potential role of E-cadherin in pancreatic carcinoma. *International journal of pancreatology*, 19, 25-30.
- WEINSPACH, D., SEUBERT, B., SCHATEN, S., HONERT, K., SEBENS, S., ALTEVOGT, P. & KRÜGER, A. 2014. Role of L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in the metastatic cascade: promotion of dissemination, colonization, and metastatic growth. *Clinical & Experimental Metastasis*, 31, 87-100.

- WELLS, A., YATES, C. & SHEPARD, C. R. 2008. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clinical & Experimental Metastasis*, 25, 621-628.
- WENT, P. T., LUGLI, A., MEIER, S., BUNDI, M., MIRLACHER, M., SAUTER, G. & DIRNHOFER, S. 2004. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*, 35, 122-8.
- WHILDING, L. M., PARENTE-PEREIRA, A. C., ZABINSKI, T., DAVIES, D. M., PETROVIC, R. M. G., KAO, Y. V., SAXENA, S. A., ROMAIN, A., COSTA-GUERRA, J. A., VIOLETTE, S., ITAMACHI, H., GHAEM-MAGHAMI, S., VALLATH, S., MARSHALL, J. F. & MAHER, J. 2017. Targeting of Aberrant $\alpha\beta 6$ Integrin Expression in Solid Tumors Using Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells. *Mol Ther*, 25, 259-273.
- WINTER, J. M., TING, A. H., VILARDELL, F., GALLMEIER, E., BAYLIN, S. B., HRUBAN, R. H., KERN, S. E. & IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. 2008. Absence of E-Cadherin Expression Distinguishes Noncohesive from Cohesive Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14, 412-418.
- WOLFGANG, C. L., HERMAN, J. M., LAHERU, D. A., KLEIN, A. P., ERDEK, M. A., FISHMAN, E. K. & HRUBAN, R. H. 2013. Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin*, 63, 318-48.
- WONG, N. C., MUELLER, B. M., BARBAS, C. F., RUMINSKI, P., QUARANTA, V., LIN, E. C. K. & SMITH, J. W. 1998. αv Integrins mediate adhesion and migration of breast carcinoma cell lines. *Clinical & Experimental Metastasis*, 16, 50-61.
- WORLDHEALTHORGANIZATION. 2020. *POPULATION FACT SHEETS, World*
Source: Globocan 2020
[Online]. Cancer Today. Available: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf> [Accessed 03.08.2021. 14:00].
- YACHIDA, S. & IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. 2013. Evolution and dynamics of pancreatic cancer progression. *Oncogene*, 32, 5253-60.
- YACHIDA, S., JONES, S., BOZIC, I., ANTAL, T., LEARY, R., FU, B., KAMIYAMA, M., HRUBAN, R. H., ESHLEMAN, J. R., NOWAK, M. A., VELCULESCU, V. E., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. & IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. 2010. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*, 467, 1114-7.
- YAGI, T. & TAKEICHI, M. 2000. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev*, 14, 1169-80.
- YATES, C. C., SHEPARD, C. R., STOLZ, D. B. & WELLS, A. 2007. Co-culturing human prostate carcinoma cells with hepatocytes leads to increased expression of E-cadherin. *Br J Cancer*, 96, 1246-52.
- YOSHIDA, K., UENO, S., IWAO, T., YAMASAKI, S., TSUCHIDA, A., OHMINE, K., OHKI, R., CHOI, Y. L., KOINUMA, K., WADA, T., OTA, J., YAMASHITA, Y., CHAYAMA, K., SATO, K. & MANO, H. 2003. Screening of genes specifically activated in the pancreatic juice ductal cells from the patients with pancreatic ductal carcinoma. *Cancer Science*, 94, 263-270.
- ZHOU, Q., LIU, Y., MENG, M., ZHENG, N., ZHANG, M., CHEN, Y., LIU, J., LI, X., SONG, X. & XU, P. 2024. Oncogenic CD44 is required for pancreatic cancer cell tumorigenesis and CD44 gene knockout is a new strategy for targeted pancreatic cancer therapy.
- ZIPRIN, P., RIDGWAY, P. F., PFISTERMÜLLER, K. L. M., PECK, D. H. & DARZI, A. W. 2003. ICAM-1 Mediated Tumor-Mesothelial Cell Adhesion is Modulated by IL-6 and TNF- α : A Potential Mechanism by Which Surgical Trauma Increases Peritoneal Metastases. *Cell Communication & Adhesion*, 10, 141-154.

ZITVOGEL, L., PITT, J. M., DAILLÈRE, R., SMYTH, M. J. & KROEMER, G. 2016. Mouse models in oncoimmunology. *Nature Reviews Cancer*, 16, 759-773.

Abkürzungsverzeichnis

ABC-AP	Avidin Biotin Komplex, Alkaline Phosphatase
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
CAM	cellular adhesion molecule
CD44	Cluster of Differentiation 44
CEA	carcioembryonic Antigenrelated
CEACAM	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule
dest.	destilliert
dNTPs	Desoxynukleotide
ECM	Extrazelluläre Matrix, Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epithelial - Mesenchymalen Transition
EpCam	Epithelial cell adhesion molecule
EpCAM	Epitheliale Zelladhäsionsmolekül
E-Selektin	Endothel-Selektin
Fc	Fragment crystallisable
h	Stunde
HCL	Chlorwasserstoff
HR	Hormon Rezeptor
HT-29	humane Kolonadenokarzinom-Zelllinie-29
I CAM 1	intercellular adhesion molecule 1
ICAM	intercellular adhesion molecule
ICAM 1	intercellular adhesion molecule-1
IgG	Immunglobulin G
IgSF	Immunglobulin Superfamilie
IHC	Immunhistochemie
Integrin β 3	Integrin beta 3
IPMN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
ITG	Integrin
Integrin β 6	Integrin beta 6
Kat.	Katalognummer
KRAS2	Kirsten Rat Sarcoma 2
L1- CAM	L1 Cell Adhesion Molecule
LFA-1	Lymphozyten-Funktions-assoziiertes Antigen 1

MAC-1	Makrophagen-1-Antigen
MCN	muzinöse Zyst Neoplasie
mFOLFIRINOX	modifizierte FOLFIRINOX Schema - FOL: Folinsäure; F: 5-Fluoruracil; IRI: Irinotecan; OX: Oxaliplatin
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
N-Cadherin	Neuronales Cadherin
ng	Nanogramm
PanIN	pankreatisch intraepitheliale Neoplasie
PCI	Peritoneal Carcinomatosis Index
PCR	Polymerase chain reaction
Pfp	Pore forming perforin
pH	Pondus Hydrogenii
P-Selektin	platelet (thrombozyten)-Selektin
Rag 2	Recombination Activation Gene 2
RGD	Arginin, Glycin, Asparginsäure
SD	Standard Deviation, Standard Deviation, Standard Deviation
ß	beta
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris Buffered Saline - Tween
TEM	Transendotheliale Migration
UICC	Union internationale contre le cancer
V(D)J	Variable (V), Diversity (D) und Joining (J)
VCAM	vascular cellular adhesion molecule-
µm	Micrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exemplarisches Modell zu den Etappen bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms nach (Yachida and Iacobuzio-Donahue, 2013).....	12
Abbildung 2: Abfolge der Schritte der Metastasierungskaskade nach Valastyan and Weinberg, 2011.	15
Abbildung 3: Darstellung der Schritte bei der Extravasation von Tumorzellen.)	19
Abbildung 4: Einteilung der 24 Integrin-Heterodimere in Rezeptorklassen	24
Abbildung 5: Darstellung der Aufteilung des intraperitonealen Raumes und des Punktesystems anhand der Tumorgröße modifiziert nach (Sugarbaker, 1999)	41
Abbildung 6: Säulendiagramm des durchschnittlichen PCI (y-Achse)	58
Abbildung 7: Säulendiagramm des durchschnittlichen Anteils mikroskopisch detektierbarer TZV mit Standardabweichung (y-Achse) nach dem Überleben in Tagen (x-Achse).	59
Abbildung 8: Vergleich der Mittelwerte der Tumorfläche für die Mauskohorten mit einem Überleben von 4, 7, 11 und 14 Tagen mittels Boxplot.	61
Abbildung 9: Vergleich der Mittelwerte der Tumorfläche für die Mauskohorten mit einem Überleben von 4, 7, 11, 14 und 41 Tagen mittels Boxplot.	62
Abbildung 10: Anteil an Präparaten pro Mauskohorte mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose und positiver Expression der jeweiligen Integrine.....	63
Abbildung 11: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose (y-Achse) pro Mauskohorte, die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(++/2) oder starke (+++/3) Expression (x-Achse) für Integrin α V aufweisen.	64
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung mit Integrin α V	66
Abbildung 13: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose, (y-Achse) pro Mauskohorte die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(++/2) oder starke (+++/3) Expression (x-Achse) für Integrin β 4 aufweisen.	67
Abbildung 15: Anteil an Präparaten mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealer Karzinose (y-Achse) pro Mauskohorte, die eine nicht vorhandene (-/0), schwache (+/1), mittelgradige(++/2) oder starke (+++/3) Expression (x-Achse) für Integrin β 6 aufweisen.	69

Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung mit Integrin $\beta 6$	69
--	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	33
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 3: Primärantikörper	35
Tabelle 4: Primärantikörper Isotypkontrolle	36
Tabelle 5: Sekundärantikörper	37
Tabelle 6: Lösungen, Enzyme, Färbemittel, Chemikalien	37
Tabelle 7: ALU-PCR Chemikalien	39
Tabelle 8: Mastermix Komponenten ALU-PCR	55
Tabelle 9: Protokoll des Light Cycler Programms für die Alu-PCR	56
Tabelle 10: Anteil an Mäusen mit derselben Überlebenszeit, deren PCI>0 beträgt und Angabe des Anteils in Prozent	58
Tabelle 11: Anteil an Mäuse mit derselben Überlebenszeit mit mikroskopisch nachweisbarer peritonealen Karzinose und Angabe des Anteils in Prozent.	59
Tabelle 12: Mittelwert und Median der Tumorfläche berechnet für Mauskohorten mit derselben Überlebenszeit und Mittelwert der Anzahl der Tumorzellverbände.	60
Tabelle 13: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen Integrin α V Expression.....	63
Tabelle 14: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen Integrin β 4 Expression.....	66
Tabelle 15: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen Integrin β 6 Expression.....	68
Tabelle 16: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen Integrin β 1 Expression.....	70
Tabelle 17: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen Integrin β 3 Expression.....	71
Tabelle 18: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen CEACAM7 Expression.....	73
Tabelle 19: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen EpCAM Expression.....	75
Tabelle 20: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen L1CAM Expression.....	77
Tabelle 21: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen ICAM Expression	79

Tabelle 22: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen N-Cadherin Expression	81
Tabelle 23: Anzahl an Präparaten mit einer positiven und negativen E-Cadherin Expression	83
Tabelle 24: Vimentin Expressionsmuster zusammengefasst für die Mauskohorten nach dem Überleben in Tagen	84
Tabelle 25: CD44 Expressionsmuster zusammengefasst für die Mauskohorten nach dem Überleben in Tagen	86
Tabelle 26: Anteil der Präparate mit einer positiven Expression der jeweiligen Antigene bei den Tumorzellverbänden der Zellen in Agar.	90
Tabelle 27: Ausschnitt noch nicht publizierter Daten der Durchflusszytometrie aus der Forschungsgruppe von Daniel Wicklein	98
Tabelle 28: Mittelwert der Tumorfläche in μm^2 und Mittelwert der Anzahl der Tumorzellverbände	144
Tabelle 29: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Integrin αV Färbung	144
Tabelle 30: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Integrin $\beta 4$ Färbung	145
Tabelle 31: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Integrin $\beta 6$ Färbung	146
Tabelle 32: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Integrin $\beta 1$ Färbung	146
Tabelle 33: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Integrin $\beta 3$ Färbung	147
Tabelle 34: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen CEACAM 7 Färbung	148
Tabelle 35: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen L1CAM Färbung	149
Tabelle 36: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen EpCAM Färbung	149
Tabelle 37: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen ICAM-1 Färbung ...	150
Tabelle 38: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen L1CAM Färbung ...	151
Tabelle 39: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen ICAM Färbung	151
Tabelle 40: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen E-Cadherin Färbung	152
Tabelle 41: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen N-Cadherin Färbung.	153

Tabelle 42: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Vimentin Färbung.	154
Tabelle 43: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen CD44 Färbung	154
Tabelle 44: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Mesothelin Färbung	155

Anhang

Tabelle 28: Mittelwert der Tumorfläche in μm^2 und Mittelwert der Anzahl der Tumorzellverbände für jedes einzelne Präparat aufsteigend sortiert nach der Überlebenszeit in Tagen und nach der Präparatnummer.

Überleben in Tagen	Tiernummer	Mittelwert der Tumorfläche in μm^2	Mittelwert der Anzahl der Tumorzellverbände
4	212-1-20	231,334	1
4	212-2-20	19,338	9
4	212-3-20	7,626	7
4	212-4-20	0	0
4	212-5-20	13,172	39
4	212-6-20	0	0
7	216-1-20	208,255	3,5
7	216-2-20	8,726	7
7	216-3-20	11,835	3
7	216-4-20	5,031	1,5
7	216-5-20	24,806	2
7	216-6-20	28,789	9
11	224-1-20	0	0
11	224-2-20	111,851	12
11	224-3-20	45,315	4
11	224-4-20	98,314	12,5
11	224-5-20	19,740	23,5
11	224-6-20	0	0
14	233-1-20	24,176	2
14	233-2-20	113,271	8
14	233-3-20	28,297	3,5
14	233-4-20	0	0
14	233-5-20	56,639	18,5
14	233-6-20	7,655	11
41	270-1-20	4,832,816	4,5
41	270-2-20	1,208,547	19,5
41	270-3-20	5,591,646	10
41	270-4-20	1,028,031	22
41	270-5-20	1,599,580	18,5
41	270-6-20	21,385,117	1

Tabelle 29: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Integrin αV Färbung, bei grau hinterlegten Tieren/Präparaten wurden keine TZV gefunden

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von Integrin αV
4	212-1-20	2
4	212-2-20	0
4	212-3-20	3
4	212-4-20	0
4	212-5-20	3
4	212-6-20	0

7	216-1-20	3
7	216-2-20	3
7	216-3-20	3
7	216-4-20	3
7	216-5-20	3
7	216-6-20	3
11	224-1-20	0
11	224-2-20	2
11	224-3-20	1
11	224-4-20	2
11	224-5-20	1
11	224-6-20	0
14	233-1-20	3
14	233-2-20	2
14	233-3-20	2
14	233-4-20	0
14	233-5-20	3
14	233-6-20	1
41	270-1-20	3
41	270-2-20	3
41	270-3-20	3
41	270-4-20	3
41	270-5-20	3
41	270-6-20	3

Tabelle 30: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Integrin $\beta 4$ Färbung, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von Integrin $\beta 4$
4	212-1-20	0
4	212-2-20	0
4	212-3-20	0
4	212-4-20	0
4	212-5-20	3
4	212-6-20	0
7	216-1-20	3
7	216-2-20	3
7	216-3-20	3
7	216-4-20	3
7	216-5-20	3
7	216-6-20	3
11	224-1-20	0
11	224-2-20	3
11	224-3-20	3
11	224-4-20	3
11	224-5-20	3
11	224-6-20	0
14	233-1-20	3
14	233-2-20	3
14	233-3-20	3

14	233-4-20	0
14	233-5-20	3
14	233-6-20	3
41	270-1-20	3
41	270-2-20	3
41	270-3-20	3
41	270-4-20	3
41	270-5-20	3
41	270-6-20	3

Tabelle 31: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Integrin $\beta 6$ Färbung, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von Integrin $\beta 6$
4	212-1-20	2
4	212-2-20	2
4	212-3-20	3
4	212-4-20	0
4	212-5-20	3
4	212-6-20	0
7	216-1-20	3
7	216-2-20	3
7	216-3-20	3
7	216-4-20	3
7	216-5-20	3
7	216-6-20	3
11	224-1-20	0
11	224-2-20	2
11	224-3-20	3
11	224-4-20	2
11	224-5-20	3
11	224-6-20	0
14	233-1-20	2
14	233-2-20	2
14	233-3-20	2
14	233-4-20	0
14	233-5-20	3
14	233-6-20	3
41	270-1-20	1
41	270-2-20	2
41	270-3-20	2
41	270-4-20	2
41	270-5-20	2
41	270-6-20	1

Tabelle 32: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Integrin $\beta 1$ Färbung, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von Integrin $\beta 1$
--------------------	------------	---

4	212-1-20	0
4	212-2-20	0
4	212-3-20	0
4	212-4-20	0
4	212-5-20	3
4	212-6-20	0
7	216-1-20	2
7	216-2-20	1
7	216-3-20	1
7	216-4-20	1
7	216-5-20	2
7	216-6-20	2
11	224-1-20	0
11	224-2-20	2
11	224-3-20	3
11	224-4-20	2
11	224-5-20	2
11	224-6-20	0
14	233-1-20	1
14	233-2-20	2
14	233-3-20	1
14	233-4-20	0
14	233-5-20	2
14	233-6-20	2
41	270-1-20	2
41	270-2-20	2
41	270-3-20	2
41	270-4-20	2
41	270-6-20	2

Tabelle 33: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Integrin $\beta 3$ Färbung, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von Integrin $\beta 3$
4	212-1-20	0
4	212-2-20	0
4	212-3-20	0
4	212-4-20	0
4	212-5-20	0
4	212-6-20	0
7	216-1-20	0
7	216-2-20	0
7	216-3-20	0
7	216-4-20	0
7	216-5-20	0
7	216-6-20	0
11	224-1-20	0
11	224-2-20	0
11	224-3-20	0

11	224-4-20	0
11	224-5-20	0
11	224-6-20	0
14	233-1-20	0
14	233-2-20	0
14	233-3-20	0
14	233-4-20	0
14	233-5-20	0
14	233-6-20	0
41	270-1-20	0
41	270-2-20	0
41	270-3-20	0
41	270-4-20	0
41	270-5-20	0
41	270-6-20	0

Tabelle 34: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen CEACAM 7 Färbung, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von CEACAM 7
4	212-1-20	3
4	212-2-20	1
4	212-3-20	3
4	212-4-20	0
4	212-5-20	3
4	212-6-20	0
7	216-1-20	3
7	216-2-20	2
7	216-3-20	2
7	216-4-20	3
7	216-5-20	2
7	216-6-20	2
11	224-1-20	0
11	224-2-20	3
11	224-3-20	3
11	224-4-20	3
11	224-5-20	3
11	224-6-20	0
14	233-1-20	2
14	233-2-20	3
14	233-3-20	3
14	233-4-20	0
14	233-5-20	3
14	233-6-20	3
41	270-1-20	3
41	270-2-20	3
41	270-3-20	3
41	270-4-20	3
41	270-5-20	3

41	270-6-20	3
----	----------	---

Tabelle 35: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen L1CAM Färbung, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden.

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von L1CAM
4	212-1-20	2
4	212-2-20	2
4	212-3-20	2
4	212-4-20	0
4	212-5-20	2
4	212-6-20	0
7	216-1-20	1
7	216-2-20	1
7	216-3-20	0
7	216-4-20	2
7	216-5-20	1
7	216-6-20	0
11	224-1-20	0
11	224-2-20	1
11	224-3-20	1
11	224-4-20	1
11	224-5-20	1
11	224-6-20	0
14	233-1-20	0
14	233-2-20	0
14	233-3-20	1
14	233-4-20	0
14	233-5-20	1
14	233-6-20	0
41	270-1-20	2
41	270-2-20	2
41	270-3-20	1
41	270-4-20	1
41	270-5-20	1
41	270-6-20	0

Tabelle 36: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen EpCAM Färbung, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von EpCAM
4	212-1-20	0
4	212-2-20	0
4	212-3-20	0
4	212-4-20	0
4	212-5-20	3
4	212-6-20	0
7	216-1-20	2
7	216-2-20	2
7	216-3-20	2

7	216-4-20	3
7	216-5-20	3
7	216-6-20	3
11	224-1-20	0
11	224-2-20	2
11	224-3-20	2
11	224-4-20	3
11	224-5-20	3
11	224-6-20	0
14	233-1-20	2
14	233-2-20	3
14	233-3-20	3
14	233-4-20	0
14	233-5-20	3
14	233-6-20	3
41	270-1-20	2
41	270-2-20	2
41	270-3-20	2
41	270-4-20	2
41	270-5-20	2
41	270-6-20	2

Tabelle 37: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen ICAM-1 Färbung, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden.

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von ICAM
4	212-1-20	0
4	212-2-20	0
4	212-3-20	1
4	212-4-20	0
4	212-5-20	2
4	212-6-20	0
7	216-1-20	3
7	216-2-20	3
7	216-3-20	2
7	216-4-20	3
7	216-5-20	0
7	216-6-20	1
11	224-1-20	0
11	224-2-20	3
11	224-3-20	2
11	224-4-20	2
11	224-5-20	2
11	224-6-20	0
14	233-1-20	2
14	233-2-20	2
14	233-3-20	3
14	233-4-20	0
14	233-5-20	2

14	233-6-20	0
41	270-1-20	2
41	270-2-20	2
41	270-3-20	2
41	270-4-20	2
41	270-5-20	2
41	270-6-20	1

Tabelle 38: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen L1CAM Färbung, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden.

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von L1CAM
4	212-1-20	2
4	212-2-20	2
4	212-3-20	2
4	212-4-20	0
4	212-5-20	2
4	212-6-20	0
7	216-1-20	1
7	216-2-20	1
7	216-3-20	0
7	216-4-20	2
7	216-5-20	1
7	216-6-20	0
11	224-1-20	0
11	224-2-20	1
11	224-3-20	1
11	224-4-20	1
11	224-5-20	1
11	224-6-20	0
14	233-1-20	0
14	233-2-20	0
14	233-3-20	1
14	233-4-20	0
14	233-5-20	1
14	233-6-20	0
41	270-1-20	2
41	270-2-20	2
41	270-3-20	1
41	270-4-20	1
41	270-5-20	1
41	270-6-20	0

Tabelle 39: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen ICAM Färbung, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden.

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von ICAM
4	212-1-20	0
4	212-2-20	0
4	212-3-20	1

4	212-4-20	0
4	212-5-20	2
4	212-6-20	0
7	216-1-20	3
7	216-2-20	3
7	216-3-20	2
7	216-4-20	3
7	216-5-20	0
7	216-6-20	1
11	224-1-20	0
11	224-2-20	3
11	224-3-20	2
11	224-4-20	2
11	224-5-20	2
11	224-6-20	0
14	233-1-20	2
14	233-2-20	2
14	233-3-20	3
14	233-4-20	0
14	233-5-20	2
14	233-6-20	0
41	270-1-20	2
41	270-2-20	2
41	270-3-20	2
41	270-4-20	2
41	270-5-20	2
41	270-6-20	1

Tabelle 40: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen E-Cadherin Färbung, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden.

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von E-Cadherin
4	212-1-20	3
4	212-2-20	2
4	212-3-20	1
4	212-4-20	0
4	212-5-20	3
4	212-6-20	0
7	216-1-20	3
7	216-2-20	3
7	216-3-20	3
7	216-4-20	3
7	216-5-20	3
7	216-6-20	3
11	224-1-20	0
11	224-2-20	3
11	224-3-20	3
11	224-4-20	3
11	224-5-20	3

11	224-6-20	0
14	233-1-20	1
14	233-2-20	3
14	233-3-20	3
14	233-4-20	0
14	233-5-20	3
14	233-6-20	0
41	270-1-20	3
41	270-2-20	3
41	270-3-20	3
41	270-4-20	3
41	270-5-20	3
41	270-6-20	3

Tabelle 41: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen N-Cadherin Färbung, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden.

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von N-Cadherin
4	212-1-20	0
4	212-2-20	0
4	212-3-20	3
4	212-4-20	0
4	212-5-20	0
4	212-6-20	0
7	216-1-20	0
7	216-2-20	0
7	216-3-20	0
7	216-4-20	0
7	216-5-20	0
7	216-6-20	0
11	224-1-20	0
11	224-2-20	0
11	224-3-20	0
11	224-4-20	0
11	224-5-20	0
11	224-6-20	0
14	233-1-20	0
14	233-2-20	0
14	233-3-20	0
14	233-4-20	0
14	233-5-20	0
14	233-6-20	0
41	270-1-20	0
41	270-2-20	0
41	270-3-20	0
41	270-4-20	0
41	270-5-20	0
41	270-6-20	0

Tabelle 42: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Vimentin Färbung, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden.

Überleben in Tagen	Tiernummer	Intensität der IHC Färbung von Vimentin
4	212-1-20	0
4	212-2-20	0
4	212-3-20	0
4	212-4-20	0
4	212-5-20	0
4	212-6-20	0
7	216-1-20	0
7	216-2-20	0
7	216-3-20	0
7	216-4-20	0
7	216-5-20	0
7	216-6-20	0
11	224-1-20	0
11	224-2-20	0
11	224-3-20	0
11	224-4-20	0
11	224-5-20	0
11	224-6-20	0
14	233-1-20	0
14	233-2-20	0
14	233-3-20	0
14	233-4-20	0
14	233-5-20	0
14	233-6-20	0
41	270-1-20	0
41	270-2-20	0
41	270-3-20	0
41	270-4-20	0
41	270-5-20	0
41	270-6-20	0

Tabelle 43: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen CD44 Färbung für alle untersuchten Gewebeschnitte, bei grau hinterlegten Tieren / Präparaten wurden keine TZV gefunden.

Überleben in Tagen	Präparatnummer	Intensität der IHC Färbung von CD44
4	212-1-20	0
4	212-2-20	0
4	212-3-20	3
4	212-4-20	0
4	212-5-20	3
4	212-6-20	0
7	216-1-20	3
7	216-2-20	3
7	216-3-20	0
7	216-4-20	3

7	216-5-20	2
7	216-6-20	3
11	224-1-20	0
11	224-2-20	3
11	224-3-20	2
11	224-4-20	2
11	224-5-20	2
11	224-6-20	0
14	233-1-20	2
14	233-2-20	2
14	233-3-20	3
14	233-4-20	0
14	233-5-20	3
14	233-6-20	3
41	270-1-20	3
41	270-2-20	3
41	270-3-20	3
41	270-4-20	2
41	270-5-20	3
41	270-6-20	3

Tabelle 44: Übersicht Ergebnisse der Immunhistochemischen Mesothelin Färbung für alle untersuchten Gewebeschnitte. (0 = Mesothel komplett intakt an Anheftungsstelle des TZV, 1= Mesothel an Invasionsstelle des TZV unterbrochen, 2 = kein Mesothel in der Umgebung des TZV detektierbar)

Überleben in Tagen	Präparatnummer	Intensität der IHC Färbung von Mesothelin	Unterbrechung des Mesothels an der Anheftungsstelle des TZV
4	212-1-20	0	2
4	212-2-20	0	2
4	212-3-20	3	2
4	212-4-20	3	-
4	212-5-20	3	1
4	212-6-20	3	-
7	216-1-20	3	0
7	216-2-20	3	1
7	216-3-20	3	2
7	216-4-20	3	2
7	216-5-20	3	1
7	216-6-20	3	1
11	224-1-20	3	-
11	224-2-20	3	1
11	224-3-20	3	2
11	224-4-20	3	1
11	224-5-20	3	1
11	224-6-20	3	-
14	233-1-20	3	1
14	233-2-20	0	0

14	233-3-20	3	1
14	233-4-20	3	-
14	233-5-20	3	1
14	233-6-20	3	1
41	270-1-20	3	1
41	270-2-20	3	1
41	270-3-20	3	1
41	270-4-20	3	1
41	270-5-20	3	1
41	270-6-20	3	1

Erklärung des Eigenanteils

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Daniel Wicklein und Dr. Marius Kemper durchgeführt.

Die Entwicklung der Projektskizze erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Daniel Wicklein, Dr. Marius Kemper und Prof. Dr. Udo Schumacher. Die für diese Arbeit verwendeten Gewebeproben wurden von Dr. Marius Kemper sowie technischen Mitarbeiter:innen des Instituts für Anatomie und Experimentelle Morphologie vorbereitet.

Die Anfertigung der Gewebeschnitte, die Durchführung der Immunhistochemie sowie der Alu-PCR wurden eigenständig von mir vorgenommen. Auch die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch mich. Dabei wurde ich von Prof. Dr. Daniel Wicklein hinsichtlich der Interpretation der Ergebnisse unterstützt. Die statistische Analyse wurde ebenfalls selbstständig von mir durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript eigenständig verfasst und ausschließlich die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.



Hamburg, 30.06.2025

Unterschrift

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, 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. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

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

30.06.2025

Datum



Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Daniel Wicklein für seine wertvollen fachlichen Anregungen sowie Herrn Dr. med Marius Kemper für die Betreuung dieser Arbeit und seinen ebenfalls wertvollen fachlichen Rat. Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern am Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie für ihre Unterstützung und die kollegiale Zusammenarbeit bedanken – insbesondere Tobias Gosau, dem ich sehr dankbar bin, dass er sich so häufig die Zeit genommen hat, zusätzliche Schnitte einzuscannen. Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden für ihre beständige Unterstützung und Motivation.