

Aus dem Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Anatomie II - Experimentelle Morphologie
der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)

**Expression von prognostisch relevanten Glykostrukturen in
Primärtumoren und deren Hirnmetastasen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Katharina Schmitz
aus Hamburg
Hamburg 2007

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 30.11.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. Emre Yekebas

Prüfungsausschuss: 3. Gutachterin: PD Dr. Susanne Klutmann

Abkürzungsverzeichnis

AR	Androgenrezeptor
BGP	Biliäres Glykoprotein
bHPA-Methode	Methode mit biotinyliertem HPA
BRCA1/2	Brustkrebssuszeptilitätsgen 1/2
Ca	Karzinom
CAM	Cellular adhesion molecule
CEACAM1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
CHO-Zellen	Ovarialzellen chinesischer Hamster
DMF	Dimethylformamid
ECM	Extrazelluläre Matrix
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Azetylgalaktosamin
GlucNAc	N-Azetylglukosamin
HCl	Salzsäure
HPA	Helix pomatia Agglutinin
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
iHPA	Indirekte HPA-Methode
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
LP	Lektinpuffer
Mamma-Ca	Mammakarzinom
MgCl	Magnesiumchlorid
ML-1	Mistellektin 1 (Viscum album)
MM	Malignes Melanom
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
M1	Fernmetastasierung
NaCl	Natriumchlorid
NSCLC	Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom
NSE	Neuronenspezifische Enolase
N1	Regionaler Lymphknotenbefall
N2	Distaler Lymphknotenbefall
N-CAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
Siglec	Sialinsäurebindendes Lektin
sLe	Sialyl Lewis-Antigen
SCLC	Kleinzelliges Bronchialkarzinom
TBS	Trispuffer
UV	Ultraviolett
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.0. Fragestellung und Arbeitshypothese	5
1.0.1. Einleitung	6
1.1. Die Metastasierungskaskade	6
1.1.1. Organspezifische Metastasierung	7
1.2. Metastasierung und Zelladhäsionsmoleküle	8
1.2.1. Die Adhäsionskaskade	8
1.2.2. Zelladhäsionsmoleküle	9
1.2.2.1. Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1	9
1.2.2.2. Das Zelladhäsionsmolekül L1 (sialinsäurebindendes Siglec)	10
1.2.3. Lektine - Helix pomatia Agglutinin	11
1.3. Hirnmetastasierung	12
1.4. Melanom, Mammakarzinom und Bronchialkarzinom	14
2. Material und Methoden	17
2.1. Histologisches Untersuchungsgut	17
2.2. Patientencharakteristika und klinische Befunde	18
2.3. Die Anfertigung von Paraffinschnitten	19
2.4. Lektinhistochemie - Helix pomatia Agglutinin (HPA)	19
2.4.1. Direkte Methode	19
2.4.2. Indirekte Methode	20
2.5. Immunhistochemie	21
2.5.1. Darstellung des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1	21
2.5.2. Darstellung des Zelladhäsionsmoleküls L1	22
2.6. Hämatoxylin-Eosin Färbung	23
3. Ergebnisse	24
3.1. Übersichtstabelle für alle Tumorpaaere in den verschiedenen Färbungen	24
3.2. L1	27
3.2.1. UJ 127.11	27
3.2.1.1. Mammakarzinome	27
3.2.1.2. Bronchialkarzinome	28
3.2.1.3. Melanome	29
3.2.2. L1-11A	31
3.2.2.1. Mammakarzinome	31

	Seite
3.2.2.2. Bronchialkarzinome	32
3.2.2.3. Melanome	32
3.3. CEACAM1	33
3.3.1. Mammakarzinome	34
3.3.2. Bronchialkarzinome	34
3.3.3. Melanome	35
3.4. Analyse des Bindungsverhaltens vom Helix pomatia Agglutinin (HPA)	36
3.4.1. Biotinyliertes HPA (bHPA)	37
3.4.1.1. Mammakarzinome	37
3.4.1.2. Bronchialkarzinome	38
3.4.1.3. Melanome	39
3.4.2. Indirekte Methode (iHPA)	40
3.4.2.1. Mammakarzinome	41
3.4.2.2. Bronchialkarzinome	42
4. Diskussion	43
4.1. CEACAM1 und seine mögliche funktionelle Bedeutung für die Metastasierung	43
4.2. L1 und seine mögliche funktionelle Beteiligung an der Metastasierung	49
4.3. L1 UJ 127.11 vs. L1-11A	52
4.4. Detektion von Bindungsstellen für Helix pomatia Agglutinin (HPA)	53
4.4.1. Die Funktionalität der Bindungsstellen des Helix pomatia Agglutinins	53
4.4.2. Zwei verschiedene Methoden der HPA-Lektin histochemie im Vergleich	56
5. Zusammenfassung	60
6. Literaturverzeichnis	61
7. Danksagung	75
8. Lebenslauf	76
9. Erklärung	77

1.0. Fragestellung und Arbeitshypothese

Die Metastasierung von bösartigen soliden Tumoren stellt auch nach Jahrzehnten intensiver Forschung noch immer den limitierenden Faktor des Überlebens von Patienten dar, da die meisten Patienten mit einem solchen Tumorleiden an den Folgen der Metastasierung versterben. Die Hirnmetastasierung bedeutet dabei die prognostisch ungünstigste Lokalisation der Metastasen. Darüber hinaus stellen besonders Hirnmetastasen den größten Anteil aller Hirntumoren dar, so dass auf dem Gebiet der Erforschung der Mechanismen der Hirnmetastasierung noch dringend Forschungs- und Handlungsbedarf besteht.

Diese Studie möchte die Hirnmetastasierung der drei am häufigsten in das ZNS metastasierenden Tumoren, dem Mammakarzinom, dem kutanen malignen Melanom und dem Bronchialkarzinom untersuchen. Grundlage hierfür sollten zwei immun- und eine lektinhistochemische Untersuchung an den Primärtumoren und deren korrespondierenden Hirnmetastasen sein. Als Marker wurden CEACAM1, L1 und HPA verwendet, da sie in vorangegangenen Studien als prognostisch ungünstige und statistisch relevante Marker in den Primärtumoren bei diesen Tumorentitäten entdeckt wurden.

Diese Studie soll nun untersuchen, wie und ob sich das Expressionsmuster der drei Marker von den Zellen des Primärtumors von dem Muster der Hirnmetastasen unterscheidet oder nicht.

Da diese Marker auch funktionell von Bedeutung sein können, könnten die Ergebnisse dieser Studie auch Grundlage für therapeutische Ansätze sein, um darauf aufbauend Möglichkeiten für verbesserte Therapien zu eröffnen, bzw. zu erweitern.

1.0.1. Einleitung

1.1. Die Metastasierungskaskade

Die Prognose, des an einem malignen Tumor erkrankten Patienten, hängt im Wesentlichen von der Fähigkeit des Tumors ab, Metastasen bilden zu können, da diese nahezu immer die Todesursache darstellen.

Um eine Metastase bilden zu können, muss eine Tumorzelle jeden einzelnen Schritt der Metastasierungskaskade in der richtigen Reihenfolge durchlaufen und auch beenden, was nur einem geringen Prozentsatz der Tumorzellen gelingt (Engers und Gabbert, 2000). Lediglich 0,1 Prozent der sich im Blutstrom befindenden Tumorzellen sind später in der Lage, eine Metastase bilden zu können (Fidler, 1970).

Die Metastasierungskaskade beginnt mit der Lösung einer Tumorzelle aus dem Zellverband eines malignen Primärtumors. – Bei diesem Prozess sind die membranständigen Zelladhäsionsmoleküle von besonderer Bedeutung, da ihre Modulation einen wichtigen Teil der Ablösung einer Zelle aus dem Primärtumor bedingen kann.

Nachdem die Tumorzelle sich aus dem Gewebeverband gelöst hat, muss sie nun die Basalmembran durchbrechen, um in das Gefäßbett eindringen zu können. Hier muss sie sich an den in der Blutbahn herrschenden Strömungsdruck anpassen. Über den Blutstrom wird die Tumorzelle zu einem anderen, entfernt liegenden Organ getragen, wo sie sich an das Gefäßendothel anheftet. Durch Extravasation nistet sich die Tumorzelle in ihrem neuen Wirtsgewebe ein und kann so, durch Proliferation, eine Metastase bilden (Zöller und Wittig 2003). Sie hat jedoch auch die Möglichkeit, als „stille Tumorzelle“ viele Jahre inaktiv zu bleiben. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Tumorzelle vor Ort direkt vom Immunsystem eliminiert wird (Engers und Gabbert, 2000).

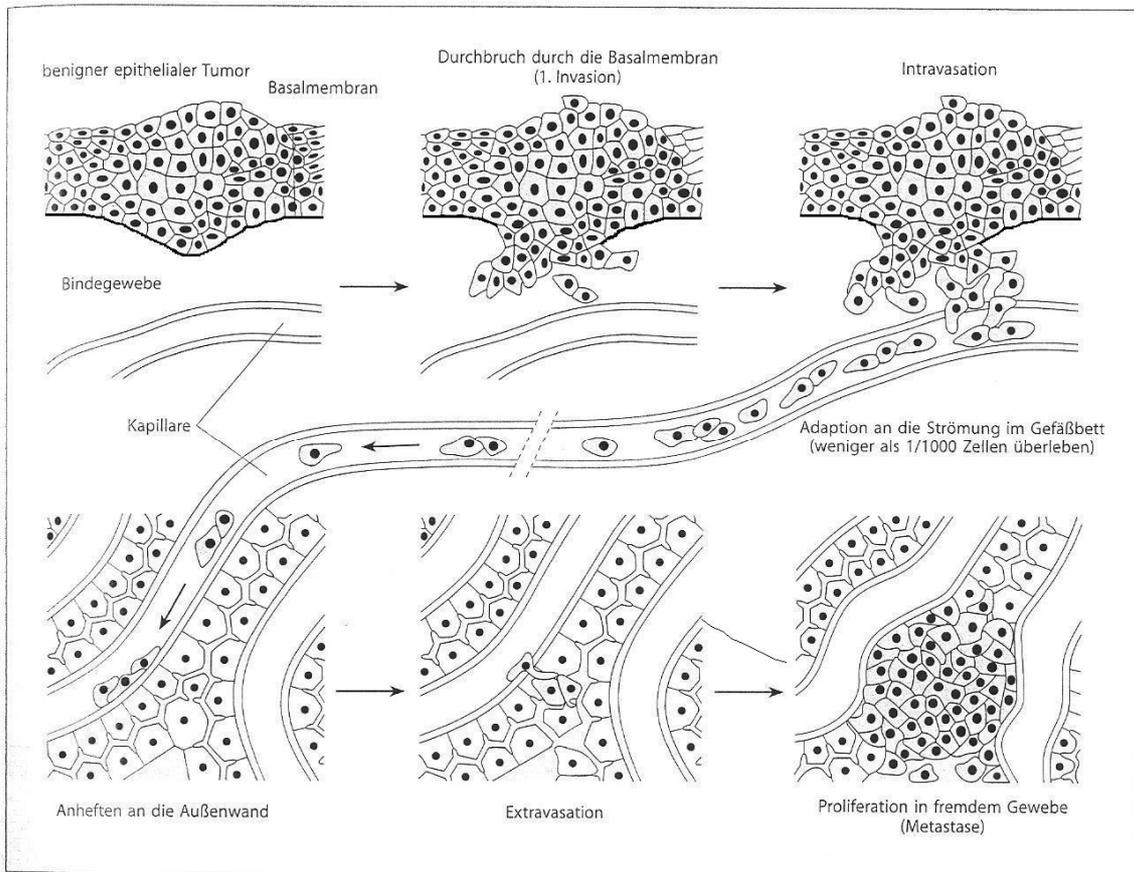


Abb.1: Die Abbildung zeigt die einzelnen Schritte der Metastasierungskaskade, beginnend mit der Ablösung von Tumorzellen aus ihrem Gewebeverband. Dieser Schritt wird gefolgt von der Invasion des umliegenden Gewebes und dem Eindringen in das Gefäßsystem bei der hämatogenen Metastasierung. Überleben die Tumorzellen im Gefäßbett, so folgen die Anheftung an die Kapillarendothelien und die Extravasation in das fremde Gewebe, wo so eine Metastase entstehen kann. Mod. nach Alberts et al. (2001) Zöller und Wittig (2004).

1.1.1. Organspezifische Metastasierung

Bereits im vergangenen Jahrtausend beschäftigten sich Pathologen mit der Frage, warum manche Tumoren mit steter Regelmäßigkeit in bestimmte Organe metastasieren. In einer Studie von 1889 untersuchte S. Paget an 735, an einem Mammakarzinom verstorbenen Frauen, ob er klären könne, warum Tumorzellen in einem Gewebe Metastasen bilden, nicht aber in einem anderen (Paget, 1889). Seine aus diesen Studien abgeleitete „The Seed and Soil Hypothesis“ besagt, dass Tumorzellen (the seed) eine spezielle Affinität zu einem Wirtsgewebe (the soil) haben müssen, um dort eine Metastase bilden zu können. Einen experimentellen Beweis dieser These zeigten Hart und Fidler (1980), wo Tumorzellen einer B16 Melanomzelllinie intravenös in den Kreislauf von Mäusen injiziert wurden, welche die Lunge als Ort der Metastasierung bevorzugten, nicht

aber in die Nieren metastasieren. Metastasen bildeten sich in der Lunge, in ekotpem Lungen- und Ovarialgewebe, nicht aber in ebenfalls ekotpem Nieren-Kontrollgewebe oder gar in den Nieren selbst.

Neben Paget erarbeitete Ewing seine „Mechanical-Hypothese“, nach welcher sich eine Metastase in jedem beliebigen Organ entwickeln könne, wenn die Tumorzellen durch den Blutstrom in dieses Organ gelangten und es als erste Filterstation benutzten (Ewing, 1928).

Heute ist anzunehmen, dass diese zwar gegensätzlichen Thesen einander ergänzen (Weiss, 1992). Untersuchungen zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen legen aber nahe, dass der „Seed and Soil Hypothesis“ größere Bedeutung zukommt als der „Mechanical- Hypothese“.

1.2. Metastasierung und Zelladhäsionsmoleküle

1.2.1. Die Adhäsionskaskade

Im Rahmen der hämatogenen Metastasierung sind Interaktionen zwischen Rezeptoren und Liganden für die Ablösung von Tumorzellen aus dem Primärtumor, und auch für die Adhäsion von Tumorzellen an Gefäßendothelien des Gewebes der Metastasenentstehung, von grundlegender Bedeutung (Rovensky, 1998; Tuszynski et al., 1997). Ähnlich den Entzündungsprozessen, wo Leukozyten an aktivierte Gefäßendothelien adhäreren, siehe Abb. 2, sind es bei der hämatogenen Metastasierung auch Adhäsionsmoleküle, die diese Zell-Zell- und Zell-extrazelluläre-Matrix- Interaktionen vermitteln.

Die Fähigkeit der Tumorzellen selektiv an Gefäßendothelien bestimmter Organe adhäreren zu können, mag ein Grund für immer wiederkehrende metastatische Muster bestimmter Tumoren in definierte Metastasenorgane sein (Biancone et al., 1996).

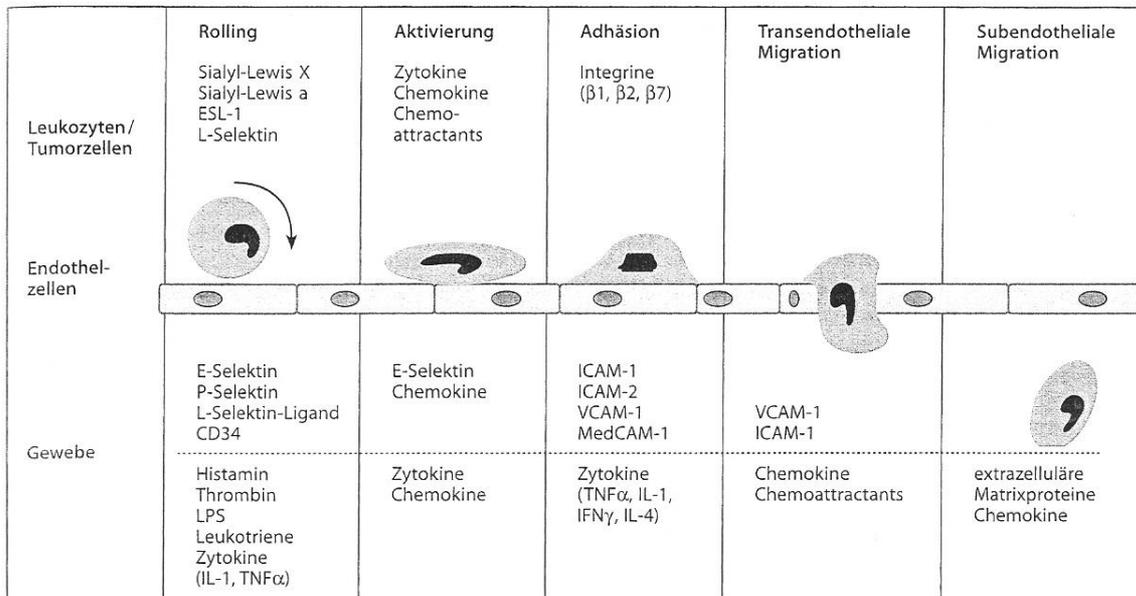


Abb.2: Die Adhäsionskaskade: Die zirkulierenden Leukozyten werden durch die Selektine verlangsamt, so dass sie auf den Gefäßendothelien zu rollen beginnen und nun mit Hilfe von zytokinvermittelter Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und deren Liganden sich an Gefäßendothelien binden können. Zöller und Wittig (2004)

Zu den Hauptgruppen der Zelladhäsionsmoleküle zählen die Selektine, die Cadherine, die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und die Integrine, welche von Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie auf der Zelloberfläche erkannt werden (Zöller und Wittig, 2004).

1.2.2. Zelladhäsionsmoleküle

1.2.2.1. Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1

CEACAM1, früher auch C-CAM, CD66a oder BGP genannt, ist ein Mitglied der CEA-Genfamilie des CD66 Clusters hochglykosylierter Adhäsionsmoleküle, welche der Immunglobulin-Superfamilie angehören. Es vermittelt homo- sowie heterotypische Bindungen zu anderen Mitgliedern der CEA-Genfamilie (Thompson et al., 1991).

Die mRNA von CEACAM1 besteht hauptsächlich aus vier möglichen Splicevarianten, deren Proteinprodukte aus drei oder vier immunglobulinähnlichen Ektodomänen und einer kurzen (12-14 Aminosäuren) oder einer langen (72-74 Aminosäuren) zytoplasmatischen Domäne bestehen (Schumann et al., 2001). CEACAM1 wird von vielen humanen Epithelien exprimiert; so auch von den Enterozyten der Kolonschleimhaut, dem

Gangepithel der Brustdrüse, den Gallengangsepithelien und dem Epithel der Gallenblase. Auch das Pankreasgangepithel, die proximalen Tubuluszellen der Niere, die Prostata, das Plattenepithel des Ösophagus und das Endometrium exprimieren CEACAM1. Daneben wird CEACAM1 von Zellen der myeloischen Reihe (Prall et al., 1996) und aktivierten Endothelzellen exprimiert. Eine hochregulierte Expression von CEACAM1 weist normalerweise der invasive Trophoblast auf (Bamberger et al., 1999).

Die pathologische Überexpression von CEACAM1 im Adenokarzinom der Lunge (Laack et al., 2002b; Siene et al. 2003) und im malignen Melanom (Thies et al., 2002a) gingen mit einer ungünstigeren Prognose für den Patienten einher. Im Gegensatz dazu wird in einigen epithelialen Tumoren CEACAM1 eine tumorsuppressive Funktion zugeschrieben (Izzy et al., 1999). Eine herabgesetzte Expression von CEACAM1 fand sich im Mammakarzinom (Riethdorf et al., 1997), dem kolorektalen Karzinom (Neumaier et al., 1993; Brümmer et al., 1995) und dem Prostatakarzinom (Kleinerman et al., 1995; Luo et al., 1999). Eine Dysregulation von CEACAM1 ist für das Endometriumkarzinom beschrieben worden (Bamberger et al., 1998). Ergün et al. (2000) beschreiben, dass CEACAM1 bei aktivierten Endothelzellen die Eigenschaft eines angiogenen Faktors aufweist.

CEACAM1 gilt als Träger von Lewis (LE) und Sialyl-Lewis (sLE) Säureestern (Stocks et al., 1990). Diese sLE^X-Reste sind wiederum in der Lage, an alle drei Selektine zu binden (Bendas, 1999).

All diese Beobachtungen lassen vermuten, dass das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 in Abhängigkeit von der Tumorentität seiner über- und unterexprimierten Form eine wichtige Rolle im Metastasierungsprozess spielen könnte.

1.2.2.2. Das Zelladhäsionsmolekül L1 (sialinsäurebindendes Siglec)

Das Zelladhäsionsmolekül L1, auch CD171 genannt, ist ein transmembranes Glykoprotein und gehört ebenfalls der Immunglobulin-Superfamilie an (Moos et al., 1988). Es hat ein Molekulargewicht von 200-220kD. Im extrazellulären Bereich besteht es aus sechs immunglobulinähnlichen Domänen, gefolgt von fünf fibronectinähnlichen Sequenzen. Es trägt, ähnlich wie P- und L-Selektine,

ein L2/HNK1 Kohlenhydratepitop, welches direkt Zell- Zell- und Zell - Substrat Interaktionen vermitteln kann (Chou et al., 1986). L1 spielt eine wichtige Rolle bei der axonalen Leitung, dem axonalen Wachstum und der Zellmigration des sich entwickelnden Nervensystems (Brümmendorf et al., 1998; Schachner, 1997). Es reguliert eine Reihe von Zellerkennungsmechanismen im zentralen und peripheren Nervensystem (Kowitz et al., 1993; Martini, 1994) und vermittelt homo- sowie heterotypische Zelladhäsionen. Neben dem Nervensystem wird L1 auch auf Lymphozyten, Granulozyten und einigen Epithelzellen des Intestinal- und Urogenitaltraktes exprimiert (Kowitz et al., 1992; Kujat et al., 1995; Thor et al., 1987). In überexprimierter Form befindet es sich auf Tumorzellen von Melanomen (Thies et al., 2002b; Fogel et al., 2003a), im Ovarial- und Endometriumkarzinom (Fogel et al., 2003b), in dem klarzelligem Nierenzellkarzinom (Allroy et al., 2005); bei allen diesen Tumorentitäten zeigt es eine schlechtere Prognose für den Patienten an. Auch auf Tumorzellen der Lunge findet sich L1 in überexprimierter Form (Katayama et al., 1997).

1.2.3. Lektine - Helix pomatia Agglutinin

Lektine sind kohlenhydratspezifische, zuckerbindende Proteine oder Glykoproteine nicht immunologischen Ursprungs, die ubiquitär in der Natur verbreitet sind (Uhlenbruck, 1979). Einige von ihnen, wie auch das Helix pomatia Agglutinin, das Lektin der Weinbergschnecke (HPA), besitzen die Eigenschaft, an Blutgruppen spezifische Zuckerreste auf den Erythrozyten (Glykokalyx) zu binden. Laut Uhlenbruck ist die Suche nach körpereigenen Lektinen mit Hilfe markierter Glykokonjugate für die Tumorummunologie sehr wichtig. Organspezifische Metastasierung kann ebenfalls durch organspezifische Lektine bedingt sein, indem die Tumorzelle mit ihren neuen, veränderten antigenen Zuckerstrukturen an einem zuckerspezifischen Lektin einer anderen Organzelle adhärert und so in der Lage ist, sich umsiedeln zu können. Die durch die maligne Transformation veränderten Zuckerreste auf der Zelloberfläche von Tumorzellen lassen sich gut durch Lektine darstellen.

Nicht nur gesunde Körperzellen, sondern auch Tumorzellen bilden auf ihrer Zelloberfläche Glykokonjugate, Glykoproteine, Ganglioside und Glykopeptide. Die endständigen Zuckerreste ragen in den Interzellularraum hinein, wo sie von

Lektinen über ihre Kohlenhydraterkennungsdomäne erkannt werden können. Auf diese Weise können Lektine die auf der Zelloberfläche vorkommenden und sehr bedeutsamen Kohlenhydrate durch ihre Bindung charakterisieren. Diese Lektinbindungsreaktion an einen spezifischen Zuckerrest kann auch an formalinfixierten histologischen Routinepräparaten durchgeführt werden.

Helix pomatia Agglutinin (HPA) bindet an die Zucker N-Azetylgalaktosamin und N-Azetylglukosamin. HPA-Bindungsstellen an terminalen Kohlenhydratresten von malignen Tumoren zeigten in verschiedenen klinischen Studien, dass ihre Expression mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einhergeht. Dies gilt für das kolorektale Karzinom (Ikeda et al., 1994; Schumacher et al., 1994), das Mamma- und Magenkarzinom (Brooks und Leathem, 1998; Kakeji et al., 1991), das Prostatakarzinom (Shirashi et al., 1992), das Adenokarzinom der Lunge (Laack et al., 2002a) und das kutane maligne Melanom (Thies et al., 2001a).

Neben dem HPA gelten auch andere Lektine als prognostische Marker. So zeigte Thies et al. (2001b), dass auch die positive Bindung des Mistlektins-I (Viscum album) im malignen Melanom mit einer schlechteren Prognose des Patienten einhergeht.

1.3. Hirnmetastasierung

Das Bronchialkarzinom, das Mammakarzinom und das maligne Melanom sind die drei Primärtumoren, welche am häufigsten in das Gehirn metastasieren (Boogerd et al., 1993). Der Altersgipfel der Hirnmetastasierung liegt um das 60. Lebensjahr. Patienten, deren Primärtumor eine Hirnmetastase gebildet hat, haben eine sehr schlechte Prognose (Nussbaum et al., 1996; Sampson et al. 1998), 70-90 Prozent versterben an den neurologischen Komplikationen ihrer Hirnmetastase (Amer et al., 1978). In den vergangenen Jahrzehnten ist die Zahl der Patienten mit Hirnmetastasen angestiegen, da sich die Therapiemöglichkeiten des Primärtumors und somit auch die Überlebenszeit mit der Erkrankung verlängert haben. Durch diese Entwicklung haben sich Hirnmetastasen zu den häufigsten soliden intrakraniellen Tumoren entwickelt und stehen in der Häufigkeit noch vor den hirneigenen Tumoren (Patchell, 1991). Die Mehrzahl der Hirnmetastasen (ca. 80 Prozent) ist supratentoriell gelegen.

Lediglich 15-17 Prozent befinden sich im Kleinhirn und nur 3-5 Prozent liegen im Hirnstamm (Mehta et al. 2002).

Tabelle 1: Organursprung von Hirnmetastasen bei 729 Patienten mit einem Primärtumor

Tumortyp	Anteil der Primärtumoren in %
NSCLC	24
SCLC	15
Mamma-Ca	17
Melanom	11
Nierenzell-Ca	6
Gastrointestinales-Ca	6
Zervix-Ca	5
CUP	5
Blasen-Ca	2

Tabelle modifiziert nach Nussbaum et al. (1996)

NSCLC: nichtkleinzellige Bronchialkarzinome, SCLC: kleinzellige Bronchialkarzinome, CUP: Carcinoma of unknown primary

Die Hirnmetastasen der verschiedenen Primärtumoren verhalten sich histologisch unterschiedlich. - Das maligne Melanom beispielsweise ist ein Tumor mit einem vielschichtigen Verhaltensmuster. Seine hochmalignen Tumorzellen können innerhalb kürzester Zeit metastasieren und so zum Tode des Patienten führen, andererseits kann eine Metastase viele Jahre nach Exzision des Primärtumors auftreten (McCarthy et al. 1978). Sogar von totaler Remission maligner Melanome mit Metastasen wurde berichtet (Avril et al. 1992).

Hirnmetastasen maligner Melanome haben die Eigenschaft, stärker zu bluten als Hirnmetastasen anderer Primärtumoren; so sind Hirnblutungen dort häufiger Todesursache. (Byrne et al, 1983). Anders als Mamma- und Bronchialkarzinome, die ihre Hirnmetastasen in der Rinden-Mark-Grenze entlang der Gefäße bilden, bilden Melanome ihre Hirnmetastasen häufiger in der grauen Substanz (Basalganglien und Kortex) aus (Russell und Rubinstein, 1971). Von den oben erwähnten am häufigsten zu Hirnmetastasen führenden Hirntumoren hat das Melanom die größte Neigung, ins Gehirn zu metastasieren (Sampson et al. 1998). In einer Studie mit 729 Patienten, welche an einer Hirnmetastase

litten, zeigten Nussbaum et al. (1996), dass die Überlebenszeiten mit Hirnmetastasen abhängig vom Primärtumortyp waren. So betrug die Zeit von der Diagnosestellung bis zur Präsentation einer Hirnmetastase aller Primärtumoren im Median zwölf Monate, die von Patienten mit einem Mammakarzinom 40 Monate, maligne Melanome metastasierten innerhalb von 31 Monaten, und die Tumoren eines nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms metastasierten in lediglich drei Monaten. Die Dauer vom Erscheinen der Hirnmetastase bis zum Eintritt des Todes zeigte sich homogener mit einer mittleren Dauer von fünf Monaten bei solitären Hirnmetastasen und drei Monaten bei multiplen Hirnmetastasen.

1.4. Melanom, Mammakarzinom und Bronchialkarzinom

Für diese Studie wurden die drei Tumorentitäten ausgewählt, welche am häufigsten über den Weg der hämatogenen Metastasierung in das Gehirn metastasieren (Nussbaum et al., 1996).

Das maligne Melanom ist ein von der Neuralleiste abstammender hochmaligner Tumor der Haut und Schleimhäute, welcher im Rahmen der Tumorprogression die Fähigkeit zum invasiven Wachstum erlangt (Schneeberger et al., 2004; Clark, 1991). Die Prognose der Patienten hängt von der Eindringtiefe des Tumors zum Zeitpunkt der Exzision ab (Breslow, 1970).

Immunhistochemische Marker erlauben bis heute keine exakte Unterscheidung zwischen malignen und benignen Tumoren. Antikörper gegen das S-100 Protein und HMB-45-Antikörper werden häufig eingesetzt, jedoch wird das S-100 beispielsweise nicht nur von Melanomen, sondern auch von anderen Zelltypen und Tumoren exprimiert (Cochran und Wen, 1986). Thies et al. (2001a, 2002a und 2002b) zeigten, dass die Expression aller für diese Studie ausgewählten Marker, nämlich CEACAM1, L1 und HPA, positiv mit der Metastasierung des malignen Melanoms korreliert ist.

Das Mammakarzinom stellt mit einem Anteil von 23 Prozent den häufigsten malignen Tumor der Frau dar (Zielinski et al., 2004). Trotz steigender Inzidenz, die auf eine höhere Lebenserwartung und die Früherkennung zurückzuführen ist, sinkt die Mortalität der an Brustkrebs erkrankten Frauen (Levi et al., 1995).

In 65-80 Prozent findet sich ein invasiv-duktales Karzinom, von den Milchgängen ausgehend, welches auch als NOS (not otherwise specified) bezeichnet wird.

Einen Anteil von 10 Prozent hat das lobulär-duktales Karzinom (Läppchenkarzinom), 3-5 Prozent machen das medulläre und das Kolloidkarzinom aus. Seltene Formen sind das tubuläre, das adenozytische und das papilläre Karzinom. Charakteristisch für das Mammakarzinom ist das multizentrische Auftreten des Tumors in der betroffenen Brust. Zumeist ist der Tumor im oberen äußeren Quadranten lokalisiert, gefolgt vom oberen inneren. Eine positive Korrelation bezüglich der Metastasierung des Mammakarzinoms zeigten Brooks und Leatham (1998) für das Lektin HPA. Für CEACAM1 hingegen wurde von Riethdorf et al. (1997) gezeigt, dass Mammakarzinome mit steigendem Malignitätsgrad immer weniger CEACAM1 auf den Tumorzellen exprimieren. Für L1 und seine Expression auf Mammakarzinomen liegen in dieser Form noch keine Daten vor.

Das Bronchialkarzinom ist weltweit die führende Todesursache der an Krebs erkrankten Patienten (Giovino, 2002). Man nimmt an, dass sich die verschiedenen histologischen Subtypen des Bronchialkarzinoms von einer pluripotenten Stammzelle ableiten (Carbone, 1997).

Man unterscheidet beim Bronchialkarzinom grob nichtkleinzellige von kleinzelligen Bronchialkarzinomen. Zu der Gruppe der nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen gehören die Plattenepithelkarzinome (30-35 Prozent) und das Adenokarzinom, welches in den letzten Jahren einen steten Anstieg zeigt (Auerbach und Garfinkel 1991), dessen Ursache noch nicht geklärt ist. 10 Prozent der nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome sind großzellig-anaplastische Karzinome. Das kleinzellige Bronchialkarzinom hat einen Anteil von 20-25 Prozent. Seine Aggressivität zeigt sich in der kurzen Tumorverdopplungszeit von durchschnittlich 50 Tagen und der Tendenz, früh zu metastasieren, oft schon zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Das gute anfängliche Ansprechen auf Zytostatika wird in den meisten Fällen durch die Entwicklung einer Zytostatikaresistenz gestoppt (Doyle, 1993). Diese Eigenschaften des kleinzelligen Bronchialkarzinoms erklären die infauste Prognose der Patienten. Eine positive Korrelation zwischen der Metastasierung von Adenokarzinomen der Lunge zeigten Laack et al. (2002a und 2002b) für die Expression von CEACAM1 und HPA-Bindungsstellen auf den Tumorzellen. Sienel et al. (2003) zeigten eine positive Korrelation für die Tumorprogression von nichtkleinzelligen

Bronchialkarzinomen, welche eine erhöhte Expression von CEACAM1 aufwiesen. Katayama et al. (1997) zeigten, dass humane Bronchialkarzinomzelllinien auch L1 exprimieren.

2. Material und Methoden

2.1. Histologisches Untersuchungsgut

Aus einer Liste von ursprünglich 305 Patienten, die an einem Bronchialkarzinom, einem Melanom oder einem Mammakarzinom erkrankt waren und eine Hirnmetastase gebildet hatten, welche operativ entfernt oder biopsiert wurde, wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Primärtumoren und Hirnmetastasen von 24 Patienten gefunden. Sie waren im Zeitraum zwischen 1992 und 2003 in Kliniken des Universitätskrankenhauses Eppendorf behandelt worden. Es fanden sich auch Hautmetastasen von malignen Melanomen und korrespondierende Hirnmetastasen von fünf Patienten, welche im Zeitraum von 1990 bis 2003 auch in Kliniken des Universitätskrankenhauses Eppendorf behandelt worden waren. Alle 29 Paare wurden aus den Archiven der Kliniken und Institute herausgesucht.

Dabei handelt es sich im Einzelnen um:

Fünf Melanome mit korrespondierenden Hirnmetastasen und fünf Hautmetastasen von Melanomen mit korrespondierenden Hirnmetastasen. Diese stammen aus der Hautklinik und dem Institut für Neuropathologie.

Sechs Bronchialkarzinome mit korrespondierenden Hirnmetastasen aus dem Institut für Pathologie und dem Institut für Neuropathologie.

13 Mammakarzinome mit korrespondierenden Hirnmetastasen aus dem Institut für Oral- und Gynäkopathologie und dem Institut für Neuropathologie.

In die Untersuchung eingeschlossen wurden auch vier Hirnmetastasen (jeweils zwei von einem Mammakarzinom und Melanom abstammend), deren Primärtumoren leider bei anderen histologischen Untersuchungen verbraucht worden waren, sowie jeweils ein Mammakarzinom und ein Bronchialkarzinom, deren korrespondierende Hirnmetastasen auch bei anderen histologischen Untersuchungen aufgebraucht worden waren.

Tabelle 2: Die in dieser Studie untersuchten Tumorentitäten und ihre Fallzahlen.

Tumorentität	Mammakarzinome	Bronchialkarzinome	Melanome
Primärtumoren/ Hirnmetastasen	13/15	7/6	5/7/5*

* Zusätzlich untersuchte Hautmetastasen

Aus den vollständigen Krankenblättern der nun insgesamt 35 von 305 Patienten, welche alle bei der Aufnahme in die Klinik ihr schriftliches Einverständnis zur wissenschaftlichen Auswertung des histologischen Materials und dessen Untersuchungsergebnisse gegeben hatten, wurden die histopathologischen Befunde nachvollzogen. Außerdem wurden lektin- sowie immunhistochemische Untersuchungen auf eine Bindung der Antikörper gegen die Zelladhäsionsmoleküle L1 und CEACAM1 sowie dem Lektin HPA durchgeführt. Es wurde einerseits die Immun- bzw. Lektinreaktivität beurteilt und andererseits die Ausbreitung dieser Immun- bzw. Lektinreaktivität über die Gesamtmasse der malignen Tumorzellen. Ein Präparat wurde als positiv bewertet, wenn mehr als fünf Prozent der malignen Zellen eine Immun- bzw. Lektinreaktivität zeigten. Die Einteilung der Immun- und Lektinreaktivität reichte von schwach (+) über mittel (++) bis zu intensiv (+++) positiv angefärbt. Die Einteilung der Ausbreitung der Immun- bzw. Lektinreaktivität wurde in Prozent, bezogen auf die Tumormasse, >20 Prozent, >50 Prozent oder 100 Prozent angegeben.

2.2. Patientencharakteristika und klinische Befunde

Die Mehrheit der Patienten war weiblich (25 weiblich; 10 männlich), das Überwiegen von Frauen im Untersuchungsgut ist darauf zurückzuführen, dass 50 Prozent der untersuchten Tumoraare Mammakarzinome waren.

Das Alter der Patienten wird zum Zeitpunkt der ersten Tumorexzision angegeben und liegt zwischen 36 und 68 Jahren, der Median beträgt 53 Jahre. Für die einzelnen Tumoren liegt der Altersdurchschnitt wie folgt:

Die Melanopatients waren zwischen 37 und 66 Jahre alt, was einen Median von 54,8 Jahren ergibt. Die Patienten mit einer Hautmetastase eines malignen Melanoms waren zwischen 37 und 68 Jahre, was in Median 52,6 Jahre ausmacht. Die Bronchialkarzinompatienten waren zwischen 40 und 67, die Patientinnen mit einem Mammakarzinom zwischen 36 und 66 Jahre alt, was jeweils einen Median von 52,7 und 52 Jahren ausmacht. Die durchschnittliche Zeit von der operativen Entfernung des Primärtumors, beziehungsweise der Hautmetastase, bis zur Operation der Hirnmetastase war beim Mammakarzinom 2,6 Jahre, beim Melanom 2,8 Jahre, und bei den Hautmetastasen des malignen Melanoms waren es 2,2 Jahre. Lediglich die Patienten des Bronchialkarzinoms

entwickelten alle noch im Jahr der Entfernung des Primärtumors eine Hirnmetastase.

Die histopathologischen Befunde der fünf Melanome ergaben nach Breslow und Clark Eindringtiefen von 1,1 mm bis 6,2 mm und Clarklevel von II bis IV. Als histologische Subtypen fanden sich zwei maligne Melanome, ein exophytisch exulzerierendes malignes Melanom, ein akrolentiginöses noduläres und ein superfiziell spreitendes Melanom.

Unter den sieben Bronchialkarzinomen befanden sich drei Adenokarzinome, zwei Plattenepithelkarzinome, ein großzelliges Karzinom und ein nichtkleinzelliges Karzinom, welches nicht genauer klassifiziert werden konnte.

Die 13 Mammakarzinome setzten sich zusammen aus: neun invasiv-duktalem Mammakarzinomen, zwei invasiven Adenokarzinomen, einem polymorphzelligen Mammakarzinom und einem nicht näher klassifizierten Mammakarzinom.

2.3. Die Anfertigung von Paraffinschnitten

Mit einem Mikrotom wurden fünf μm dicke Paraffinschnitte aus in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Primärtumoren und ihren Hirnmetastasen angefertigt. Aufgebracht auf silanbeschichtete Objektträger (Histo Bond®, Marienfeld, Deutschland) wurden diese über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C getrocknet. Die anschließende Entparaffinierung erfolgte in Xylol, und in einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte rehydriert.

2.4. Lektinhistochemie - Helix pomatia Agglutinin (HPA)

Alle Inkubationen wurden, soweit es nicht anders beschrieben ist, bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt.

2.4.1. Direkte Methode

Die rehydrierten Schnitte wurden 15 Minuten mit 0,1% Trypsin (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), gelöst in Lektinpuffer (LP bestehend aus: 50 mM Trizma Base, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ (alle Reagenzien: Sigma, Deisenhofen, Deutschland); pH 7,6), in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde unter fließendem Leitungswasser gestoppt, die Schnitte in LP äquilibriert (dreimal fünf Minuten) und anschließend mit 10 $\mu\text{g/ml}$ biotinyliertem HPA

(Kohlenhydratspezifität: N-Azetylgalaktosamin/N-Azetylglukosamin) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Spülen in Trispuffer (TBS: 50 mM Trizma Base (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 150 mM NaCl; pH 7,6), wurden die Schnitte mit einem Avidin-alkalische-Phosphatase-Komplex (Vectastain, ABC-Kit, Vektor, Burlingame, Kalifornien, USA) für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Präparate wiederum in TBS gespült und die Farbreaktion durchgeführt: 7,5 ml einer vierprozentigen Natriumnitritlösung wurden mit 300 µl Neufuchsin-Stammlösung (5 g Neufuchsin gelöst in 100 ml 2n HCl) vermischt. Anschließend wurden sofort 30 mg Naphthol-AS-Bisphosphat in 750 µl DMF gelöst und als Substrat für die alkalische Phosphatase hinzugegeben. Die Präparate wurden unter Lichtausschluss 20 Minuten in dieser Lösung entwickelt. Die Reaktion wurde unter fließendem Leitungswasser (10 Minuten) gestoppt. Danach wurden die Präparate in 50 %igem Mayers Hämalaun für 10 Sekunden gegengefärbt, 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Xylol inkubiert, um im Anschluss mit Eukitt (Kindler, Freiburg, Deutschland) eingedeckt zu werden. Mit Kontrollschnitten wurde auf die gleiche Weise verfahren, nur wurde statt des biotinyliertem HPA mit reinem Lektinpuffer inkubiert.

2.4.2. Indirekte Methode

Für das Lektin Helix pomatia Agglutinin (HPA) wurde noch eine zweite, im weiteren als indirekte Methode (iHPA) bezeichnete, Färbung durchgeführt, um eventuelle Unterschiede bezüglich des Färbeverhaltens der Hirnmetastasen/der Methoden untersuchen zu können. Die rehydrierten Schnitte wurden wieder 15 Minuten mit 0,1% Trypsin (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), gelöst in Lektinpuffer (LP bestehend aus: 50 mM Trizma Base, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl (alle Reagenzien: Sigma, Deisenhofen, Deutschland); pH 7,6), in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen (je fünf Minuten) in Aqua dest. gestoppt. Zur Hemmung der endogenen Peroxidase verblieben die Schnitte für 20 Minuten in mit 30 %igem H₂O₂ versetztem Methanol. Es folgte zweimaliges Waschen für je fünf Minuten in Aqua dest., danach zweimal fünf Minuten in LP. Anschließend erfolgte die einstündige

Inkubation mit 10 µg/ml nativem, nicht konjugiertem HPA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Nach erneut zweimaligem Waschen für je fünf Minuten wurden die Schnitte für 30 Minuten mit 100 µg/ml Schweine- Normalserum inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation über Nacht, bei 4°C, mit 10 µg/ml Kaninchen anti-HPA Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark). Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal je fünf Minuten in TBS gewaschen und danach für 30 Minuten mit einem biotinylierten Schweine-anti-Kaninchen Antikörper (5µg/ml; 1:200) inkubiert. Anschließend wurde zweimal fünf Minuten mit TBS gespült. Es folgte eine 30 minütige Inkubation mit dem Avidin-Peroxidase-Komplex (Vectastain, ABC-Kit, Vektor, Burlingame, Kalifornien, USA) mit sich anschließendem Spülen in TBS. Die Farbreaktion fand unter Ausschluss von Licht in folgender Lösung statt: 9 ml TBS mit 60 µl H₂O₂ versetzt, dann wurde 1 ml DAB hinzugefügt und die Lösung sofort auf die Schnitte für acht Minuten aufgetragen. Anschließend wurden die Schnitte mit 50% Mayers Hämalaun 10 Sekunden gegengefärbt, wie oben beschrieben dehydriert und eingedeckt.

2.5. Immunhistochemie

Die folgenden immunhistochemischen Reaktionen wurden, soweit es nicht anders beschrieben ist, in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.5.1. Darstellung des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1

Der monoklonale Antikörper 4D1/C2 gegen das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 wurde freundlicherweise von Herrn Professor Dr. C.Wagener, Institut für Klinische Chemie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, zur Verfügung gestellt.

Dieser Antikörper wurde in „Antibody Diluent with Background Reducing Components“ (Dako, Carpinteria, Kalifornien, USA) verdünnt (falls nicht anders vermerkt).

Die rehydrierten Schnitte wurden in 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle fünfmal für je zwei Minuten bei 500 Watt hitzebehandelt. Nach 20 minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde schrittweise kalter Zitratpuffer hinzugegeben, bis die Lösung Raumtemperatur erreicht hatte. Anschließend

wurden die Schnitte in TBS (pH 7,6) mit 0,1% Tween 20 dreimal fünf Minuten gespült und die unspezifischen Bindungen mit 100 µg/ml (1:10) Kaninchen-Normalserum (DAKO, Glostrup, Dänemark) blockiert. Es folgte eine Inkubation mit 8 µg/ml des 4D1/C2 Antikörper, über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen in TBS mit 0,1% Tween 20 (letzter Waschgang nur TBS) entfernt und die Schnitte mit einem biotinyliertem Kaninchen-anti-Maus Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung 1:200 für 20 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS und 0,1% Tween20 (letzter Waschgang nur in TBS) für jeweils fünf Minuten, wurden die Schnitte mit einem Avidin-alkalische-Phosphatase-Komplex 30 Minuten inkubiert und die Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase wie zuvor beschrieben entwickelt. Anschließend wurden die Schnitte gegengefärbt, gebläut, mit Crystal Mount (Biomedica, Foster City, Kalifornien, USA) eingedeckt und bei 70°C getrocknet. Mit Kontrollschnitten wurde auf die gleiche Weise verfahren, nur wurde die Inkubation mit dem monoklonalen 4D1/C2 Antikörper durch eine Inkubation mit reinem Puffer ersetzt.

2.5.2. Darstellung des Zelladhäsionsmoleküls L1

Die zwei monoklonalen Mausantikörper gegen L1 (L1-11A und UJ 127.11) wurden freundlicherweise von Herrn Professor Dr. P. Altevogt, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

Die rehydrierten Schnitte wurden zur Vorbehandlung in einen EDTA-Puffer (0,37 g EDTA/l), pH 8,0 verbracht und dreimal fünf Minuten bei 500 Watt in einer Mikrowelle wärmebehandelt. Nach 20 minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde schrittweise kalter EDTA-Puffer hinzugegeben, bis die Lösung Raumtemperatur erreicht hatte. Anschließend wurden die Schnitte zweimal fünf Minuten in TBS gewaschen und danach für 20 Minuten zur Blockierung der unspezifischen Bindungen mit einem Ziegen-Normalserum (DAKO, Glostrup, Dänemark), im Verhältnis 1:10, inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit dem unverdünnten L1-Antikörper (UJ 127.11 und L1-11A) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal fünf Minuten in TBS und 0,1% Tween 20 (letzter Waschgang nur TBS) gewaschen und danach für 30 Minuten mit

einem biotinylierten Ziege-anti-Maus Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark), Verdünnung 1:200, inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte je dreimal fünf Minuten in TBS mit 0,1% Tween20 (letzter Waschgang nur in TBS) gewaschen und mit einem Avidin-alkalische-Phosphatase Komplex für 30 Minuten inkubiert. Wie oben beschrieben, folgten die Enzymreaktion, das Gegenfärben, das Bläuen sowie das Eindecken (trocknen bei 70°C) mit Crystal Mount (Biomeda, Foster City, Kalifornien, USA). Mit Negativkontrollen wurde auf die gleiche Weise verfahren, nur wurde die Inkubation mit dem monoklonalen Kaninchenantikörper gegen L1 durch eine Inkubation durch reinen Puffer ersetzt. Als Positivkontrolle dienten histologische Schnitte von peripheren Nerven.

2.6. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Zur histologischen Beurteilung der Primärtumoren und den dazugehörigen Hirnmetastasen wurde von allen Paaren je ein Schnitt HE gefärbt.

Die HE-Färbung wurde in einem Färbeautomaten (Varistain, Shandon, Frankfurt, Deutschland) nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Anschließend folgten Inkubationen in destilliertem Wasser für zwei Minuten, Hämatoxylin für eine Minute, destilliertem Wasser für zwei Minuten, Leitungswasser für fünf Minuten, Eosin für drei Minuten und wiederum in destilliertem für 30 Sekunden. Abschließend wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, dreimal für je fünf Minuten in Xylol belassen und mit Eukitt (Kindler, Freiburg, Deutschland) eingedeckt.

3. Ergebnisse

3.1. Übersichtstabellen für alle Tumorpaare in den verschiedenen Färbungen

Die Übersichtstabellen zeigen alle Tumorpaare, a) für den Primärtumor und b) für die Hirnmetastase, geordnet nach Tumorentitäten, wie sie sich in den einzelnen Färbungen dargestellt haben.

Diese Tabellen erlauben einen Überblick, um eine Tendenz über das Färbeverhalten der Tumorentitäten in den einzelnen Färbungen zu erhalten, aber auch um ein einzelnes Tumorpaar in allen Färbungen überblicken zu können.

Tabelle 3: Mammakarzinome mit korrespondierenden Hirnmetastasen in den verschiedenen Färbungen

1a=Primärtumor, 1b=Hirnmetastase, M=männlich, W=weiblich, Alter zum Zeitpunkt der Entfernung des Primärtumors, m=membranbetont, z=zytoplasmatisch, Inva= Invasionszone, +=schwach, +=mittelgradig, +++=intensiv, -=negativ

Paare	L1 UJ 127.11	L1-11A	CEACAM1	bHPA	iHPA
1a	+ 100% z	-	+ 100% zm	++/+++ 100% zm	+/++ 90% z
1b	+ 100% z	-	+/++ 100% zm	++/+++ 100% zm	+ 100%
2a	+ 100% z	+ 50% z	+ 100% z	+/+++ 80% zm	++/+++ 100% zm
2b	+ 100% z	-	+/++ 100% z	+/++ 40% z	++ 100% z
3a	-	-	-	-	+/++ 100 zm
3b	-	-	-	++/+++ 100% mz	+ 100% z
4a	+ 100% z	-	+ 50% z	-	++/+++ 50% m
4b	+ 100% z	-	+ 50% z	-	+ 100% z
5a	+/++ 100% z	-	-	++/+++70%z	++/+++ 70% z
5b	-	-	-	-	+ 50% z
6a	+/++ 90% zm	-	+ 50% z	+/++ 50%z	++/+++ 100% z
6b	++ 100% z	+ 100% z	-	++/+++ 90%z	++ 100% z
7a	+ 100% z	-	-	+ 100% z	+/++ 100% z
7b	+ 100% z	-	+ 50%z	+ 30%z	+/++ 100%z
8a	+ 50% z	-	+ 100%z	+/+++ 40% m	+/+++ 40%
8b	+/++ 100% z	-	+ 50%z	+ 50% z	+ 50%z
9a	+ 100% z	-	+ 100%z	++/+++ 80%z	+/++ 80%z
9b	+/++ 100% z	+ 100% z	+ 100%z	++/+++ 80%z	+ 100%z
10a	+ 100% z	-	-	-	+ 20%z
10b	+ 100% z	-	-	+/+++ 20%z	+ 50%z
11a	+ 100% z	-	+ 50% z	+/+++ 50% m	+/++ 50%z
11b	+ 100% z	-	+ 100%z	+/++ 50%z	+ 50%z
12a	+ 100% z	-	+ 100%z	-	-
12b	+ 100% z	-	+ 100% z	+ 50% z	+ 50%z
13a	+ 100% z	-	+ 50%z	++/+++ 30%z	+/++ 100%z
13b	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor
14a	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor
14b	+ 100% z	-	+ 100% z	+/+++ 100% m	+ 100% z
15a	kein Tumor	kein Tumor	kein Tumor	kein Tumor	kein Tumor
15b	+ 100% z	-	-	++/+++ 80% zm	-
16a	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor
16b	+/ ++ 100% z m:++	+ 100% z	+ 100% z m:++	+ 50% z m:+++	+ 100% z

Tabelle 4: Bronchialkarzinome mit korrespondierenden Hirnmetastasen in den verschiedenen Färbungen

Paare	L1 UJ 127.11	L1-11A	CEACAM1	bHPA	iHPA
17a	+ /+++ 70% z	-	-	-	+ 80% m z
17b	+ 90% z	-	-	++ /+++ 20% m	++ 80% z
18a	-	-	-	-	+ /+++ 90% z
18b	+ 100% z	-	-	++ /+++ 50% z	+ /+++ 100% z
19a	+ 90% z	-	-	++ /+++ 100% m	+ /+++ 90% z
19b	+ 100% zm	-	-	++ /+++ 50% m	+ /+++ 90% z
20a	-	-	-	++ /+++ 60% mz	++ /+++ 100% z
20b	-	-	-	++ 50% m	++ 100% z
21a	+ 100% z	-	+ 20% z	++ /+++ 80% m	+ 100% z
21b	+ 100% z	-	-	++ /+++ 70% m	+ 100% z
22a	+ 50% z	-	-	-	+ 100% z
22b	+ 100% z	-	+ /+++ 100% z	++ /+++ 30% m	+ 90% z
23a	+ /+++ 100% z		-	-	-
23b	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor

Tabelle 5: Melanome mit korrespondierenden Hirnmetastasen in den verschiedenen Färbungen

Paare	L1 UJ 127.11	L1-11A	CEACAM1	bHPA
24a	+ 100% Inva:+++z	- Inva: ++100%z	+ 100% Inva: ++ z	-
24b	+ /+++ /+++ 100% z	+ 60% z	+ 100% z	-
25a	+ 70% m	-	+ 80% z	+ 80% z
25b	+ 100% z	-	+ 100% z	+ 30% z
26a	+ /+++ 100% m	+ 50% mz	++ /+++ 80% m	-
26b	+ 100% z	-	+ 80% z	-
27a	-	-	+100% m	-
27b	+ 100% z	-	++ /+++ 100% m	-
28a	+ 100% z	-	+ 50% z	-
28b	++ /+++ 90% z	++ /+++ 50% z	++ /+++ 50% z	-
29a	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor
29b	+ /+++ 100% zm	-	+ 100% z	-
30a	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor	Kein Tumor
30b	+ 100% z	-	+ 50% z	-

Tabelle 6: Melanommetastasen mit korrespondierenden Hirnmetastasen in den verschiedenen Färbungen

Paare	L1 UJ 127.111	L1-11A	CEACAM1	bHPA
31a	+ /+++ 50% z	Inva: + /+++ 30% z	++ 90% m	-
31b	-	-	+ /+++ 100% mz	-
32a	+ /+++ 70% z	-	+ 90% z	-
32b	+ /+++ 100% z	-	+ /+++ 90% z	-
33a	+90% z	-	-	-
33b	+ /+++ 90% z	-	+ 100% z	-
34a	+ 100% z	-	++ 100% z	-
34b	++ 90% z	-	+ 20% z	-
35a	+ 100% z	+ 100% z	+ /+++ 30% m	-
35b	++ 100% z	+ 100% z	++ 100% z	-

3.2. L1

Für die immunhistochemischen Untersuchungen am Zelladhäsionsmolekül L1 standen zwei monoklonale Antikörper zur Verfügung, UJ127.11 und dessen Subklon L1-11A, deren Ergebnisse im Folgenden einzeln aufgeführt werden.

3.2.1. UJ 127.11

Als Positivkontrolle diente der histologische Schnitt eines peripheren Nervs. Er zeigte eine mittlere (++) bis starke (+++) L1-Immunreaktivität. Die Ausbreitung Immunreaktivität bezogen auf die Tumormasse lag mehrheitlich bei über 80 Prozent.

3.2.1.1. Mammakarzinome

Die sieben Mammakarzinome mit den korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten eine schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität, sowohl in den Zellen des Primärtumors, als auch in denen der Hirnmetastase, wie die Übersichtstabelle 3 zeigt. Zwei Paare zeigten eine Verstärkung der Immunreaktivität in den Zellen der Hirnmetastase von schwach (+) in den Zellen des Primärtumors auf mittelgradig (++) in den Zellen der Hirnmetastase. Ein Paar zeigte im Primärtumor, wie in der Hirnmetastase, eine mittelgradige (++) zytoplasmatische Immunreaktivität der Tumorzellen, welche im Primärtumor zusätzlich membranbetont war. Ein Paar zeigte eine schwache (+) bis mittelgradige (++) Immunreaktivität in den Zellen des Primärtumors, die Zellen

der korrespondierenden Hirnmetastase waren negativ (-). Von den drei Hirnmetastasen ohne korrespondierenden Primärtumor zeigten jeweils zwei eine schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität und die dritte eine schwache (+) bis mittelgradige (++) membranbetonte Immunreaktivität der Tumorzellen. Ein Primärtumor ohne korrespondierende Hirnmetastase zeigte eine schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität, lediglich ein Paar zeigte einheitlich keine Immunreaktivität.

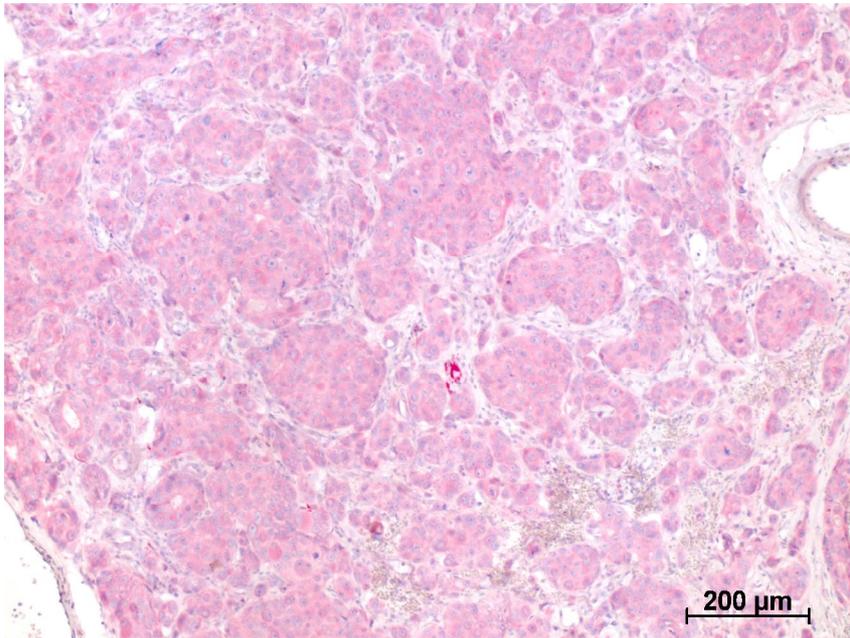


Abb. 3: L1 UJ 127.11-Färbung an einer Hirnmetastase eines Mammakarzinoms. Zu erkennen ist die einheitlich schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität der Tumorzellen in der Hirnmetastase.

3.2.1.2. Bronchialkarzinome

Vier Bronchialkarzinome mit korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten eine schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität der Zellen des Primärtumors und der Zellen der Hirnmetastasen. Die Zellen einer Hirnmetastase zeigten zusätzlich eine membranbetonte Immunreaktivität, was die Übersichtstabelle 4 zeigt. Ein Paar zeigte einen nicht angefärbten Primärtumor, während die Zellen der Hirnmetastase schwach (+) positiv gefärbt waren. Der Primärtumor ohne korrespondierende Hirnmetastase zeigte eine schwach (+) bis mittelgradige (++) zytoplasmatische Immunreaktivität seiner Tumorzellen. Ein Paar zeigte weder in den Zellen des Primärtumors noch in den Zellen der Hirnmetastase eine Immunreaktivität.

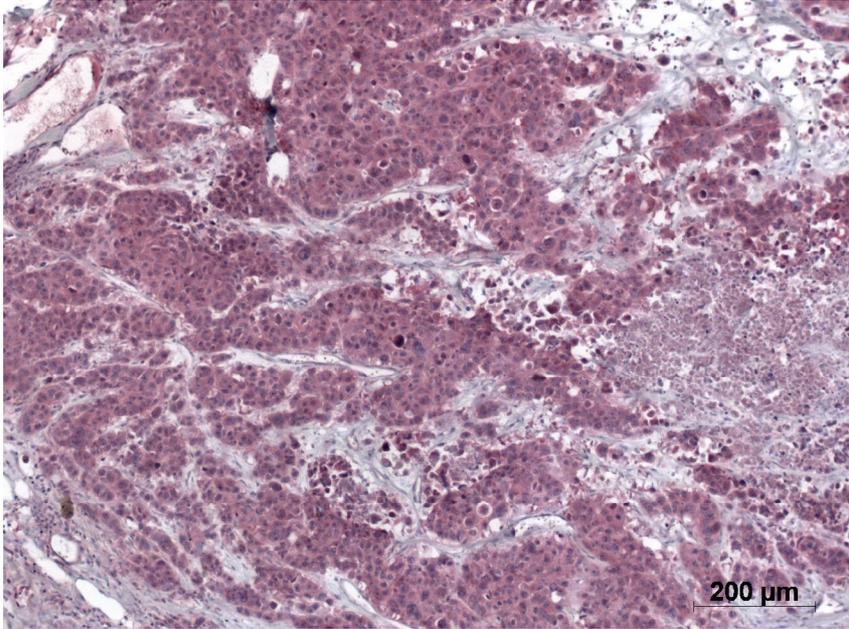


Abb. 4a: L1 UJ127.11-Färbung eines Bronchialkarzinoms vom Typ eines niedrig differenzierten Plattenepithelkarzinoms und dessen korrespondierender Hirnmetastase (**Abb. 4b**). Der Primärtumor zeigt eine schwache (+) Immunreaktivität.

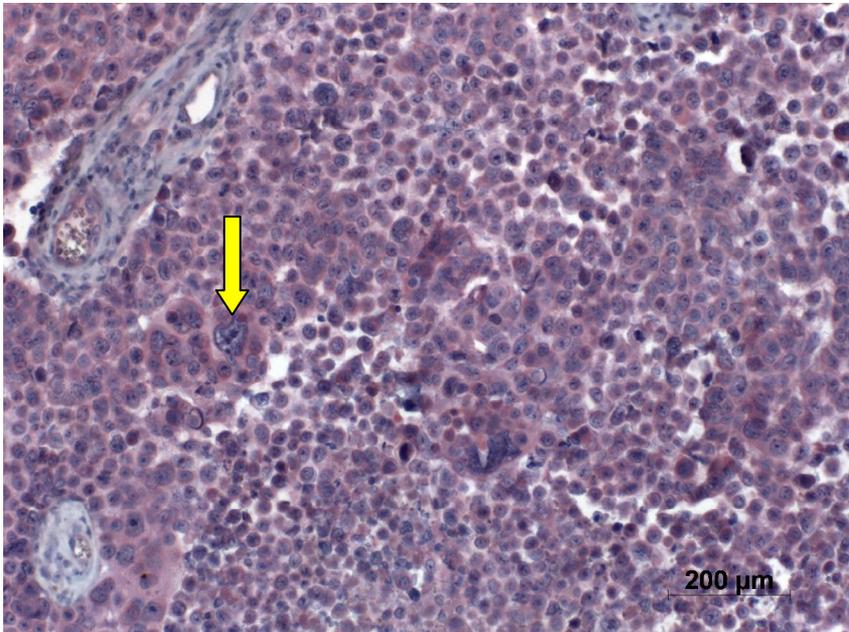


Abb. 4b: In der Hirnmetastase zeigt sich beeindruckend die zunehmende Entartung der Tumorzellen zu Riesenzellen. (gelber Pfeil). Eine schwache (+) Immunreaktivität ist nur in einzelnen Tumorzellen zu finden.

3.2.1.3. Melanome

Die Melanome mit korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten insgesamt ein inhomogenes Muster (siehe Übersichtstabelle 5). Ein Paar färbte sich einheitlich in den Zellen des Primärtumors und in denen der Hirnmetastase schwach (+) für L1 an, und ein weiteres Paar zeigte im Primärtumor eine mittelgradige (++) zytoplasmatische L1 Immunreaktivität der Tumorzellen, bis hin zu einer starken (+++) L1 Immunreaktivität der Invasionszone und eine mittelgradige (++) L1 Immunreaktivität der Zellen der Hirnmetastase, welche membranbetont verstärkt

war. Ein Paar zeigte eine schwache (+) bis mittelgradige (++) membranbetonte Immunreaktivität der Zellen im Primärtumor, in der Hirnmetastase hingegen fand sich eine schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität der Tumorzellen. Ein weiteres Paar zeigte im Primärtumor eine schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität, welche sich in der Hirnmetastase bis zu einer intensiven (+++) zytoplasmatischen Immunreaktivität der Tumorzellen verstärkte. Ein Paar zeigte keine Immunreaktivität in den Zellen des Primärtumors, dafür jedoch eine schwache (+) in den Zellen der Hirnmetastase. Eine Hirnmetastase ohne korrespondierenden Primärtumor zeigte eine mittelgradige (++) membranbetonte Immunreaktivität ihrer Tumorzellen, eine weitere zeigte eine schwache (+) Immunreaktivität.

Bei den Hautmetastasen von Melanomen und den korrespondierenden Hirnmetastasen zeigte sich folgendes immunhistochemisches Färbungsmuster: Drei Paare zeigten eine Verstärkung der Immunreaktivität der Melanomzellen in der Hirnmetastase von schwach (+) in den Melanomzellen der Hautmetastase bis mittelgradig (++) in den Zellen der Hirnmetastase. Ein Paar zeigte einheitlich eine schwache (+) bis mittelgradige zytoplasmatische Immunreaktivität der Tumorzellen und ein weiteres zeigte eine schwach (+) bis mittelgradige (++) Immunreaktivität in den Melanomzellen der Hautmetastase, jedoch keine (-) in den Melanomzellen der korrespondierenden Hirnmetastase.

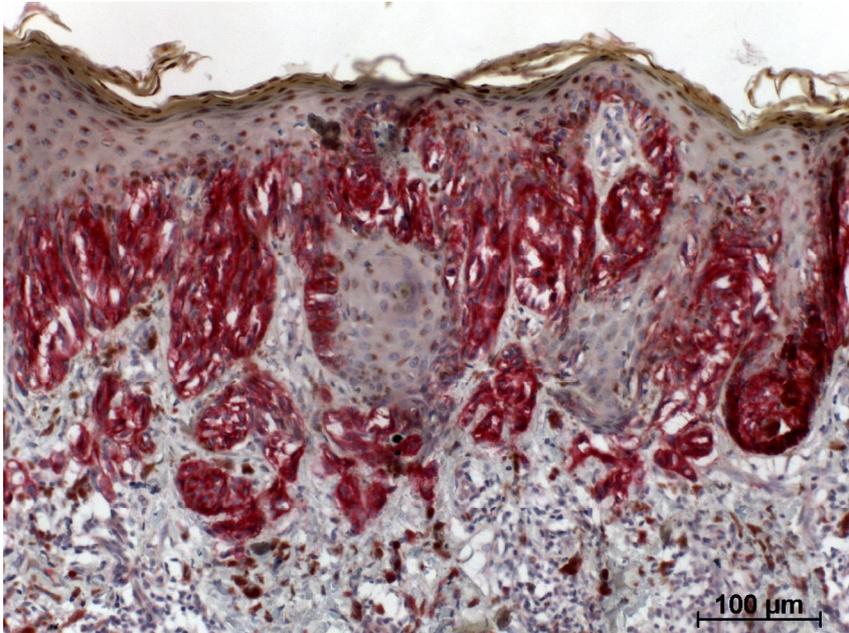


Abb.5a

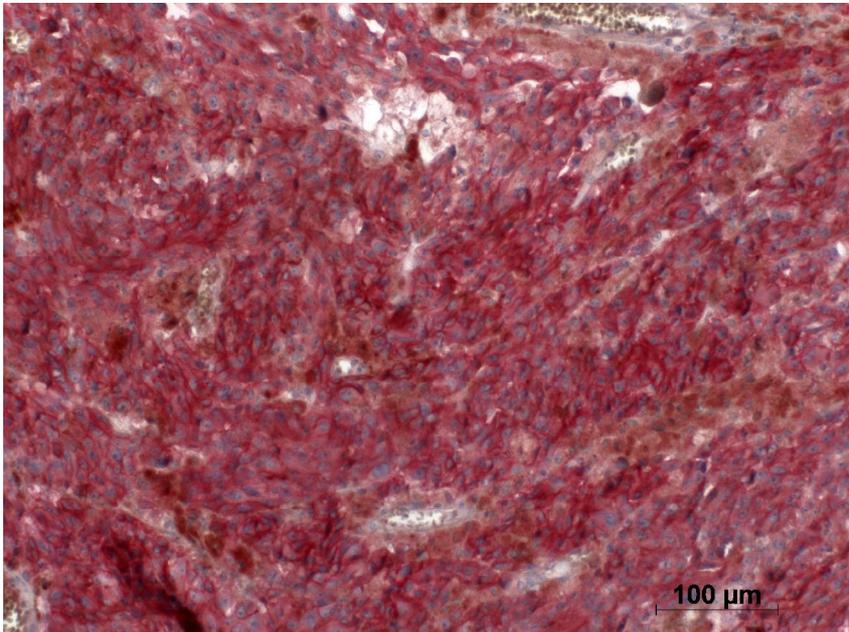


Abb. 5b

Abb. 5a/5b: L1 UJ 127.11-Färbung eines malignen Melanoms (**Abb. 5a**) und seiner korrespondierenden Hirnmetastase (**Abb. 5b**).

In beiden Abbildungen kann man eine mittelgradige (++) bis intensive (+++) Immunreaktivität erkennen.

3.2.2. L1-11A

3.2.2.1. Mammakarzinome

Neun Mammakarzinome und ihre korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten keine Immunreaktivität der Tumorzellen gegenüber dem L1-11A Antikörper (siehe Übersichtstabelle 3). Ein Paar zeigte in den Zellen des Primärtumors eine schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität und keine (-) in der Hirnmetastase. Zwei Paare zeigten keine (-) Immunreaktivität in den Zellen des Primärtumors und eine schwache (+) zytoplasmatische in denen der

korrespondierenden Hirnmetastasen. Von den drei Hirnmetastasen ohne korrespondierenden Primärtumor zeigten zwei keine (-) und die dritte eine schwache (+) Immunreaktivität der Tumorzellen. Die Melanomzellen des Primärtumors ohne korrespondierende Hirnmetastase zeigten ebenfalls keine Immunreaktivität.

3.2.2.2. Bronchialkarzinome

Alle sechs Bronchialkarzinome und ihre korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten keine Immunreaktivität der Tumorzellen gegenüber dem L1-11A-Antikörper, wie die Übersichtstabelle 4 zeigt. Lediglich die Zellen des Primärtumors ohne korrespondierende Hirnmetastase zeigten eine schwache (+) bis mittelgradige (++) zytoplasmatische Immunreaktivität gegenüber dem L1-11A-Antikörper.

3.2.2.3. Melanome

Ein Paar von ihnen zeigte eine schwache (+) Immunreaktivität, welche sich an der Invasionszone in den Melanomzellen des Primärtumors zu einer mittelgradigen (++) Immunreaktivität hin verstärkte und die eine schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität in der Hirnmetastase zeigte. Zwei Paare waren einheitlich negativ (-). Ein Paar zeigte im Primärtumor eine schwache (+) membranbetonte Immunreaktivität der Tumorzellen und in der Hirnmetastase keine. Ein weiteres Paar zeigte keine (-) Immunreaktivität in den Melanomzellen des Primärtumors, hingegen in den Melanomzellen der Hirnmetastase eine mittelgradige (++) bis intensive (+++) zytoplasmatische Immunreaktivität. Keine (-) Immunreaktivität ihrer Tumorzellen zeigten die zwei Hirnmetastasen ohne korrespondierenden Primärtumor.

Von den Hautmetastasen mit ihren korrespondierenden Hirnmetastasen zeigte ein Paar eine einheitlich schwache (+) Immunreaktivität der Tumorzellen (siehe Übersichtstabelle 6). Ein anderes Paar zeigte eine schwache (+) bis mittelgradige (++) Immunreaktivität in der Hautmetastase und keine (-) in den Zellen der Hirnmetastase. Drei Paare zeigten einheitlich keine (-) Immunreaktivität der Tumorzellen.

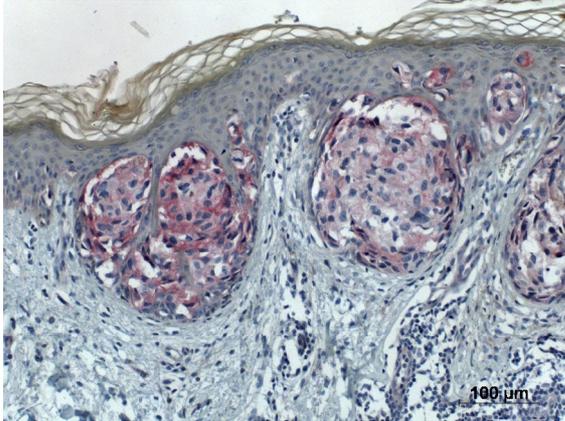


Abb. 6a

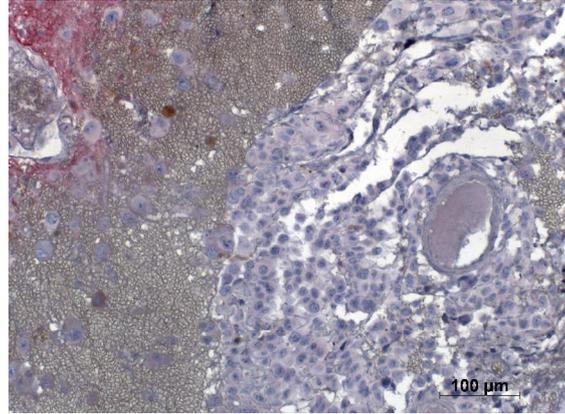


Abb. 6b

Abb. 6a/b: L1-11A- Färbung eines Melanoms (**Abb. 6a**) und seiner korrespondierenden Hirnmetastase (**Abb. 6b**). Der Primärtumor zeigt Tumorzellnester, welche eine schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität zeigen. Lediglich membranbetont stellt sich eine mittelgradige (++) Immunreaktivität dar. Die Hirnmetastase (**Abb. 6b**) zeigt keine Immunreaktivität.



Abb. 7a

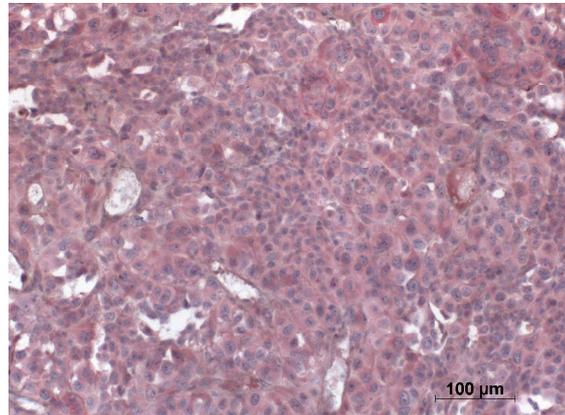


Abb. 7b

Abb. 7a/b: L1 UJ 127.11-Färbung des in **Abb. 6a/b** gezeigten Melanoms und seiner korrespondierenden Hirnmetastase. Die L1 UJ 127.11-Färbung zeigt im Melanom (**Abb. 7a**) und korrespondierender Hirnmetastase (**Abb. 7b**) eine deutlich stärkere Immunreaktivität als in der L1-11A-Färbung, welche in **Abb. 7a** membranbetont ist.

3.3. CEACAM1

Für die immunhistochemischen Untersuchungen stand zur Darstellung des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 der monoklonale Antikörper 4D1/C2 zur Verfügung.

Das Ausmaß der Anfärbung der Tumorzellen bezogen auf die Gesamttumorzellen lag bei der Hälfte der Paare bei bis zu 100 Prozent. Die andere Hälfte lässt sich wiederum in zwei Hälften unterteilen, wovon die eine Hälfte ein Ausmaß von bis zu 50 Prozent zeigte, die andere zeigte ein Ausmaß von mehr als 20 Prozent.

3.3.1. Mammakarzinome

Fünf Mammakarzinome und ihre korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten eine einheitlich schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität der Tumorzellen (siehe Übersichtstabelle 3). Zwei weitere Paare zeigten ein sehr ähnliches Färbeverhalten ihrer Tumorzellen, lediglich die Hirnmetastase zeigte neben einer schwachen (+) auch eine mittelgradige (++) Immunreaktivität des Zytoplasmas an, das zweite Paar zeigte eine von der Intensität her gleiche Immunreaktivität der Tumorzellen, jedoch waren Zytoplasma und die Zellmembran angefärbt. Zwei Paare zeigten komplementäres Verhalten. Das eine zeigte eine schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität in den Primärtumorzellen und keine Immunreaktivität in den Zellen der Hirnmetastase, das andere eine schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität in der Hirnmetastase und keine Immunreaktivität in den Zellen des Primärtumors. Drei Paare zeigten einheitlich keine (-) Immunreaktivität der Tumorzellen. Die Zellen der drei Hirnmetastasen ohne den korrespondierenden Primärtumor waren zweimal schwach (+) positiv angefärbt, davon einmal membranbetont, einmal zytoplasmatisch und einmal negativ (-). Der Primärtumor ohne korrespondierende Hirnmetastase zeigte eine schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität der Tumorzellen. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Immunreaktivität der Mammakarzinome, sofern sie eine Immunreaktivität zeigten, schwach (+) positiv waren, wobei die Immunreaktivität der Zellen der Hirnmetastasen weitestgehend der der Primärtumorzellen entsprach.

3.3.2. Bronchialkarzinome

Die NSCLC und ihre korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten in den Zellen von vier Paaren keine (-) CEACAM1- Immunreaktivität, wie die Übersichtstabelle 4 zeigt. Ein Paar zeigte eine schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität in vereinzelt Arealen des Primärtumors, jedoch keine in denen der Hirnmetastase. Ein anderes Paar zeigte keine Immunreaktivität im Primärtumor, hingegen eine schwache (+) bis mittelgradige (++) zytoplasmatische in den Zellen der Hirnmetastase. Der Primärtumor ohne korrespondierende Hirnmetastase zeigte keine Immunreaktivität.

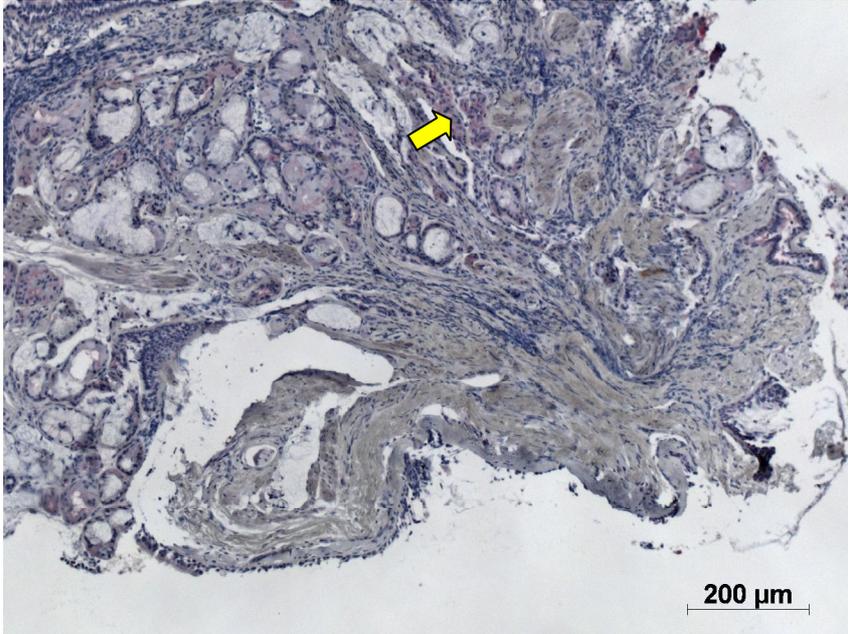


Abb. 8: CEACAM1-Färbung eines Bronchialkarzinoms. Die größten Anteile dieses Primärtumors (Hirnmastase nicht abgebildet) zeigten keine CEACAM1 Immunreaktivität. Nur vereinzelt fanden sich sehr schwach (+) positive Areale (gelber Pfeil).

3.3.3. Melanome

Zwei Melanompaare mit korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten eine einheitlich schwache (+) Immunreaktivität, welche sich bei den Zellen des einen Primärtumors membranbetont verstärkt mittelgradig (++) anfärbte (siehe Übersichtstabelle 5). Der andere Primärtumor zeigte eine eher zytoplasmatische Immunreaktivität. Bei zwei anderen Paaren verstärkte sich die membranbetonte Immunreaktivität von schwach (+) in den Zellen des Primärtumors auf intensiv (+++) in den Zellen der Hirnmetastase. Ein Paar zeigte eine intensive (+++) membranbetonte Immunreaktivität der Tumorzellen im Primärtumor, jedoch eine schwache (+) zytoplasmatische in der Hirnmetastase. Eine Hirnmetastase ohne korrespondierenden Hirntumor zeigte eine schwache (+) Immunreaktivität der Melanomzellen, eine andere keine.

Die Zellen der Hautmetastasen von Melanomen und deren korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten sehr unterschiedliche membranbetonte Immunreaktivitäten. Drei Paare verstärkten die Immunreaktivität in den Zellen der Hirnmetastase von schwach (+) und mittelgradig (++) in der Hautmetastase, auf intensiv (+++) und einmal auf mittelgradig (++)). Ein Paar zeigte keine Immunreaktivität in der Hautmetastase und eine schwache (+) zytoplasmatische in den Zellen der Hirnmetastase. Ein anderes Paar zeigte eine mittelgradige (++) Immunreaktivität in der Hautmetastase, jedoch keine in der Hirnmetastase.

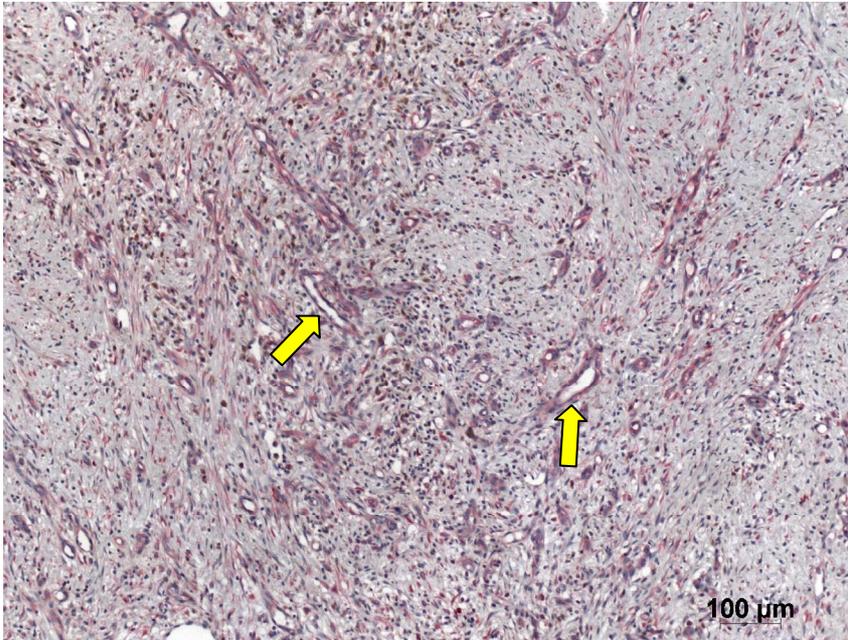


Abb. 9a: CEACAM1-Färbung eines malignen Melanoms (**Abb. 9a**) und seiner Hirnmetastase (**Abb. 9b**). Die vereinzelt, diffus verteilten Melanomzellen zeigen eine sehr schwache (+) Immunreaktivität. Die gelben Pfeile zeigen auf Gefäßanschnitte.

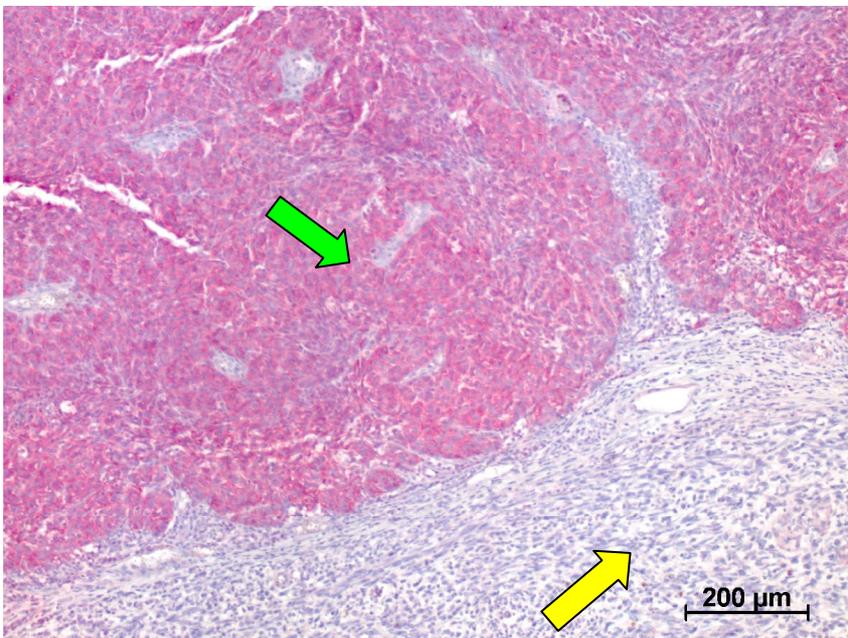


Abb. 9b: Die Hirnmetastase zeigt ein inhomogenes Muster der Immunreaktivität. Der untere Teil dieser Hirnmetastase zeigt keine Immunreaktivität (gelber Pfeil). Der obere Teil (grüner Pfeil) zeigt mittelgradig (++) bis intensiv (+++) angefärbte Tumorareale.

3.4. Analyse des Bindungsverhaltens vom *Helix pomatia* Agglutinin (HPA)

Insgesamt waren die beiden Lektinfärbungen eindeutig auszuwerten, da mehrheitlich die Paare eine Anfärbung der Tumorzellen bis zu über 80 Prozent zeigten oder keine Färbung der malignen Zellen vorhanden war. Hintergrundfärbungen waren, wenn überhaupt, nur schwach vorhanden. Die Negativkontrollen zeigten keine Lektinreaktivität.

3.4.1. Biotinyliertes HPA (bHPA)

3.4.1.1. Mammakarzinome

Vier Mammakarzinome mit korrespondierender Hirnmetastase zeigten sowohl in den Zellen des Primärtumors als auch in den Zellen der Hirnmetastasen eine mittelgradige (++) bis intensive zytoplasmatische (+++) bHPA-Reaktivität, welche bei drei Primärtumoren auch membranbetont war. Ein Paar zeigte in beiden eine intensive (+++) bHPA-Reaktivität, siehe auch Übersichtstabelle 3. Ein weiteres Paar zeigte eine gleichermaßen schwache (+) zytoplasmatische bHPA-Reaktivität in den Zellen des Primärtumors und in den Zellen der Hirnmetastase, ein anderes Paar zeigte eine einheitlich negative (-) bHPA-Reaktivität in den Tumorzellen. In den Primärtumorzellen eine bis intensive membranbetonte (+++) bHPA-Reaktivität und in den Zellen der Hirnmetastase lediglich eine schwache (+) zytoplasmatische bHPA-Reaktivität zeigte ein Paar. Drei Primärtumoren zeigten keine bHPA-Reaktivität ihrer Tumorzellen, ihre Zellen der Hirnmetastasen zeigten jedoch eine schwache (+) und eine mittelgradige (++) zytoplasmatische, in einem Fall eine membranbetonte, bHPA-Reaktivität. Eine mittelgradige (++) bis intensive (+++) bHPA-Reaktivität fand sich in den Zellen eines Primärtumors, die korrespondierende Hirnmetastase hingegen zeigte keine bHPA-Reaktivität ihrer Tumorzellen. Die drei Hirnmetastasen ohne korrespondierenden Primärtumor zeigten eine mittelgradige (++) bis intensive (+++) membranbetonte bHPA-Reaktivität der Tumorzellen. Der Primärtumor ohne Hirnmetastase zeigte eine mittelgradige (++) bis intensive (+++) zytoplasmatische bHPA-Reaktivität seiner Tumorzellen.

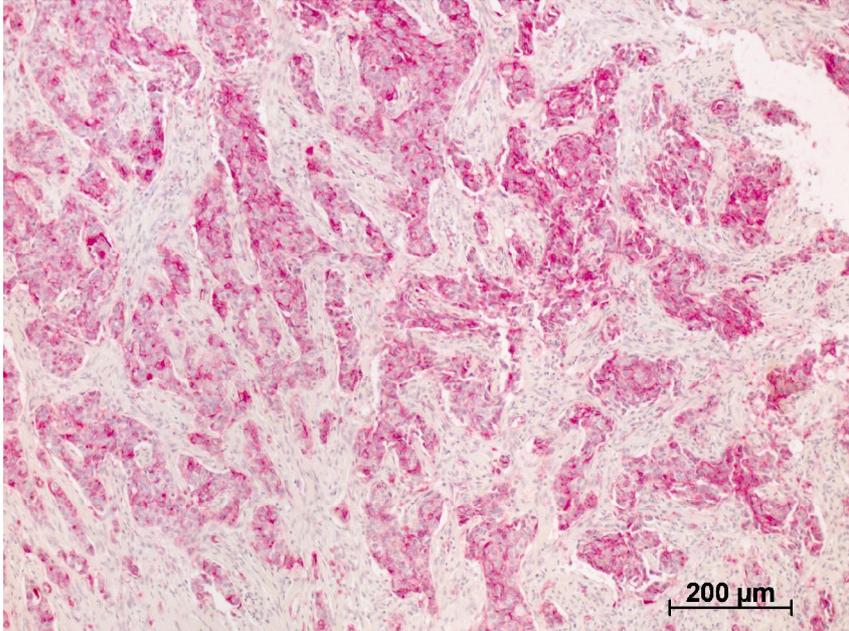


Abb. 10a

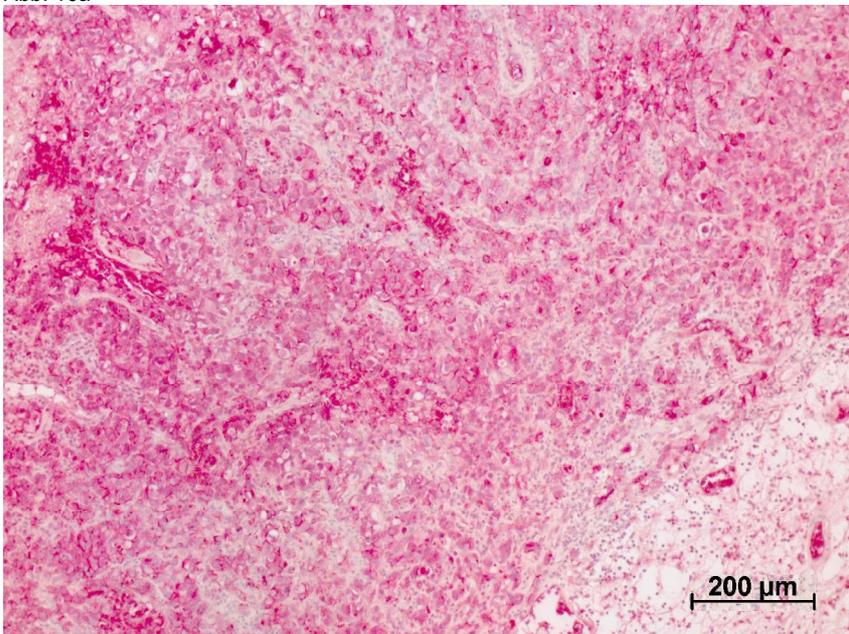


Abb. 10b

Abb. 10a/10b: bHPA-Färbung eines Mammakarzinoms (**Abb. 10a**) mit der korrespondierenden Hirnmetastase (**Abb. 10b**). Primärtumor und Hirnmetastase zeigen beide eine sich über die gesamte Tumorzellmasse erstreckende mittelgradige (++) und intensive (+++) bHPA-Reaktivität.

3.4.1.2. Bronchialkarzinome

Drei Bronchialkarzinome mit korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten einheitlich eine mittelgradige (++) bis intensive (+++), sich zur Zellmembran hin verstärkende, bHPA-Reaktivität in den Tumorzellen des Primärtumors und der Hirnmetastase (siehe Übersichtstabelle 4). Drei Paare zeigten keine bHPA-Reaktivität in den Primärtumorzellen und eine mittelgradige (++) bis intensive membranbetonte (+++) in den Zellen der Hirnmetastasen. Der Primärtumor ohne Hirnmetastase zeigte keine (-) bHPA-Reaktivität seiner Tumorzellen.

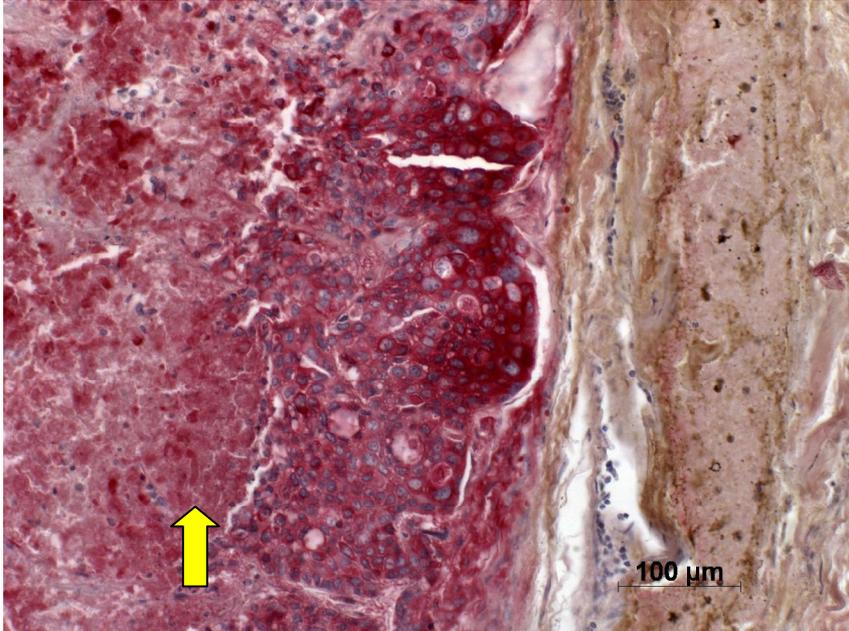


Abb. 11a: bHPA-Färbung eines Bronchialkarzinoms und der korrespondierenden Hirnmetastase (**Abb. 11b**). Der Primärtumor zeigt eine intensive (+++) bHPA-Reaktivität. Deutlich sind im umliegenden Gewebe bereits Tumornekrosen zu erkennen (gelber Pfeil)

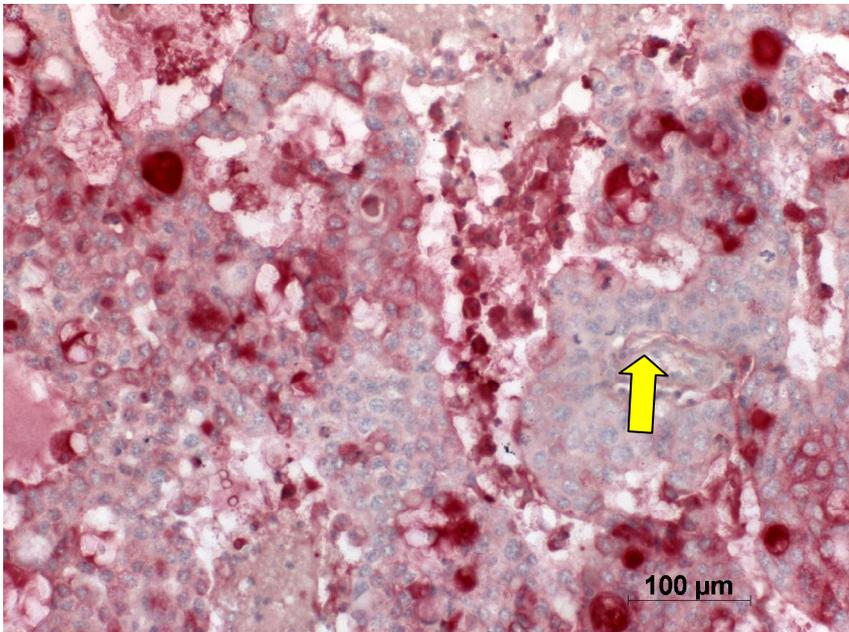


Abb. 11b: Die Hirnmetastase zeigt eine schwache (+) bis intensive (+++) bHPA-Reaktivität. Vereinzelt zeigen Areale hingegen keine Lektinreaktivität (gelber Pfeil)

3.4.1.3. Melanome

Vier Melanome mit korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten keine bHPA-Reaktivität (-) der Tumorzellen, ein anderes Paar zeigte eine einheitlich schwache (+) bHPA-Reaktivität seiner Tumorzellen, wie auch die Übersichtstabelle 5 zeigt. Die zwei Hirnmetastasen ohne korrespondierenden Primärtumor zeigten keine (-) bHPA-Reaktivität ihrer Tumorzellen.

Die Hautmetastasen mit korrespondierenden Hirnmetastasen verhielten sich sehr einheitlich. Alle fünf Paare zeigten keine (-) bHPA-Reaktivität ihrer Tumorzellen.



Abb. 12a: bHPA-Färbung eines malignen Melanoms (**Abb. 12a**) mit korrespondierender Hirnmetastase (**Abb. 12b**). Die Melanomzellen des Primärtumors zeigen keine bHPA-Reaktivität. Deutlich zu sehen sind die Melanineinlagerungen in den Melanomzellen (gelber Pfeil).

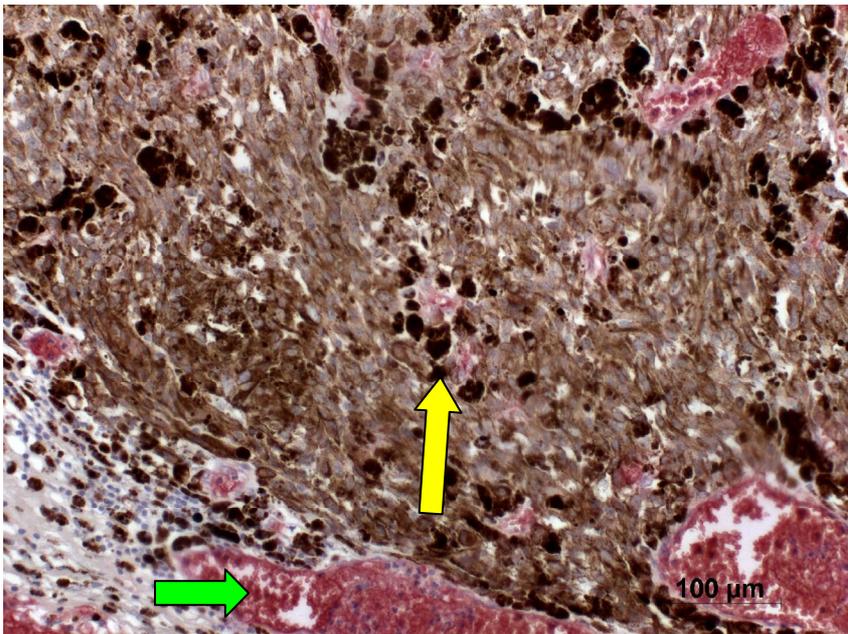


Abb.12b: Die korrespondierende Hirnmetastase zeigt ebenfalls keine bHPA-Reaktivität. In den Melanomzellen kann man eine Zunahme des Melaninpigmentes sehen (gelber Pfeil). Erythrozyten in Gefäßanschnitten zeigen ihre gewohnte Lektinreaktivität bei Patientin mit der Blutgruppe A (grüner Pfeil).

3.4.2. Indirekte Methode (iHPA)

Auch die indirekte Methode zeigte eine homogene iHPA-Reaktivität an, jedoch färbten sich die Tumoren nicht so intensiv an wie bei der direkten Methode. Da bei der indirekten Methode die Farbentwicklung durch einen Avidin-Peroxidase-Komplex und DAB als Chromogen, welches eine braune Färbung ergibt,

herbeigeführt wurde, wurde darauf verzichtet, diese Methode für die Melanome und Hautmetastasen inklusive deren korrespondierenden Hirnmetastasen anzuwenden, da dies schnell zu falsch positiven Ergebnissen durch Verwechslungen mit dem braunen Melaninpigment der Melanome führen könnte.

3.4.2.1. Mammakarzinome

Sieben Mammakarzinome zeigten eine schwache (+) bis mittelgradige (++) iHPA-Reaktivität der Tumorzellen, zwei von ihnen sogar eine bis intensiv (++) reichende (siehe Übersichtstabelle 3). Die sieben korrespondierenden Hirnmetastasen sanken in ihrer iHPA-Reaktivität der Tumorzellen einheitlich auf eine schwache (+) Anfärbung ab. Zwei Paare zeigten eine mittelgradige (++) bis intensive (+++) iHPA-Reaktivität ihrer Tumorzellen im Primärtumor und in den Zellen der korrespondierenden Hirnmetastasen eine mittelgradige (++) Einheitlich schwach (+) bis mittelgradig (++) zeigten sich die Zellen zweier Paare. Ein Paar zeigte keine (-) iHPA-Reaktivität in den Zellen des Primärtumors, hingegen eine schwache (+) in den Tumorzellen der korrespondierenden Hirnmetastase. Die drei Hirnmetastasen ohne korrespondierenden Primärtumor zeigten zweimal eine schwache (+) und einmal keine iHPA-Reaktivität ihrer Tumorzellen. Der Primärtumor ohne korrespondierende Hirnmetastase zeigte eine schwache (+) bis mittelgradige (++) iHPA-Reaktivität der Tumorzellen.

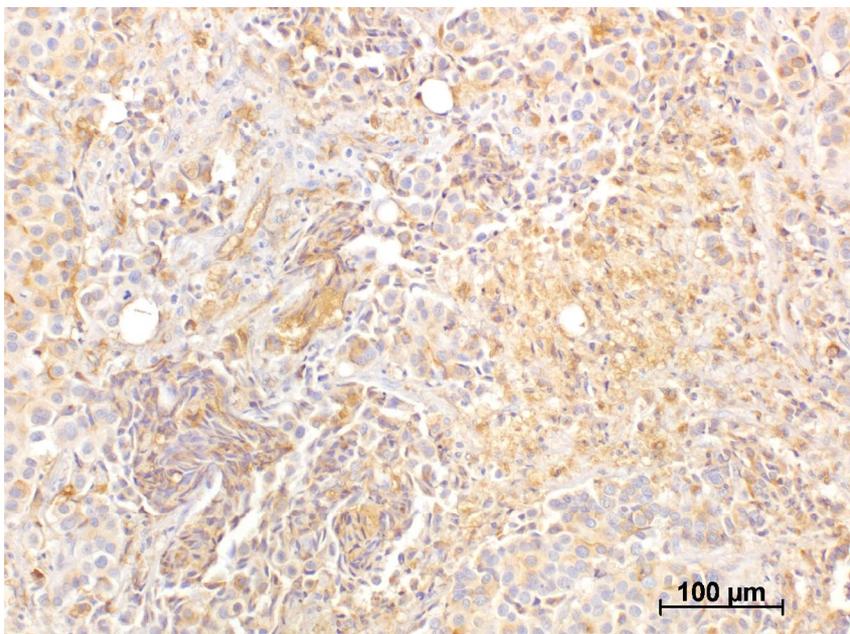


Abb. 13: iHPA-Färbung eines Mammakarzinoms. Die Tumorzellen zeigen eine schwache (+) zytoplasmatische und in einigen Abschnitten auch mittelgradige (++) iHPA-Reaktivität.

3.4.2.2. Bronchialkarzinome

Die sechs Bronchialkarzinome und ihre korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten alle eine iHPA-Reaktion der Tumorzellen, wie Übersichtstabelle 4 zeigt. Fünf Paare zeigten eine einheitlich schwache (+) bis mittelgradige (++) iHPA-Reaktivität ihrer Tumorzellen. Mittelgradig (++) bis intensiv (+++) stellte sich die iHPA-Reaktivität der Zellen eines Primärtumors dar, seine korrespondierende Hirnmetastase zeigte eine mittelgradige (++) iHPA-Reaktivität ihrer Tumorzellen. Der Primärtumor ohne korrespondierende Hirnmetastase zeigte keine (-) iHPA-Reaktivität der Tumorzellen.

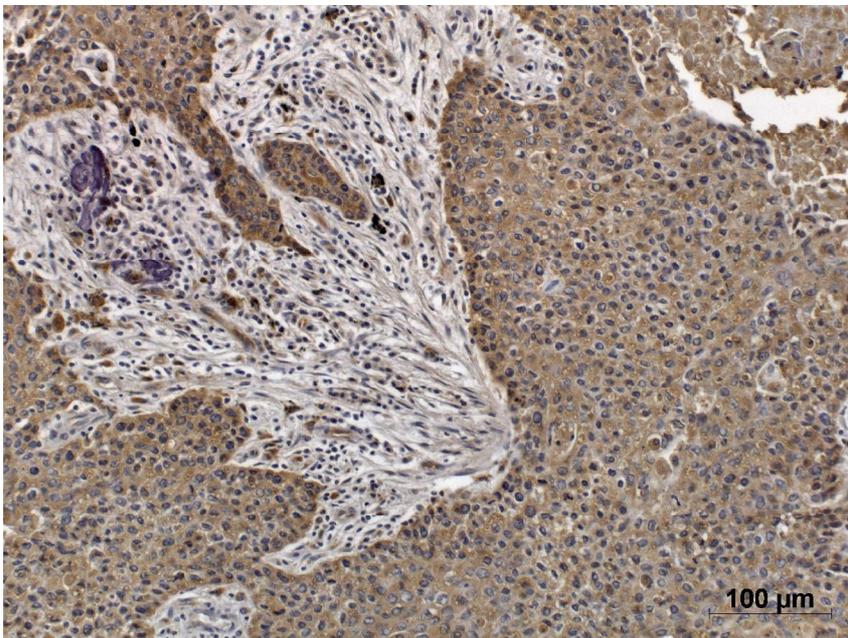


Abb. 14a: iHPA-Färbung eines Bronchialkarzinoms (mittelgradig differenziertes Plattenepithelkarzinom) mit korrespondierender Hirnmetastase. Die Zellen des Primärtumors zeigen ein einheitlich zytoplasmatisches Färbemuster von mittlerer (++) Intensität.

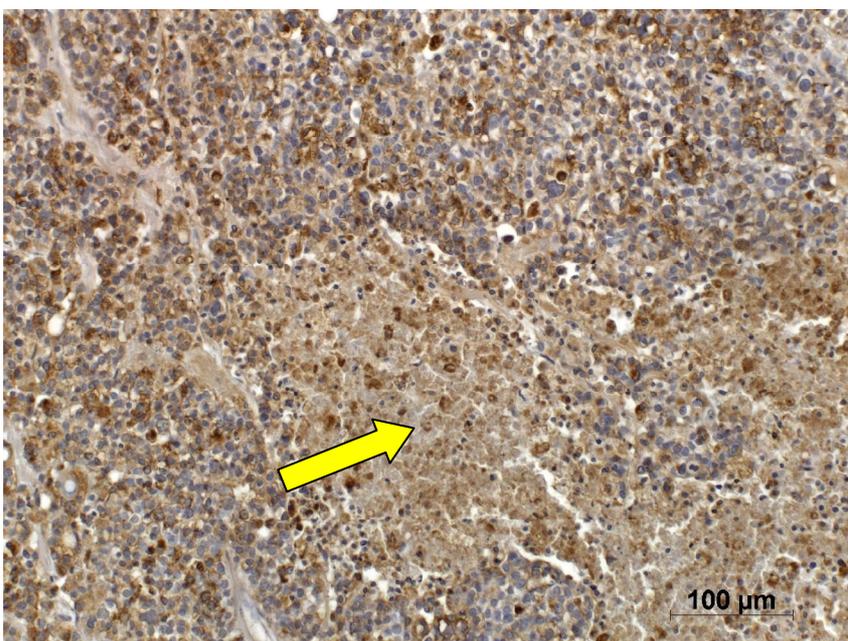


Abb. 14b: Die Hirnmetastase zeigt eine iHPA-Reaktivität der Tumorzellen von mittlerer (++) bis intensiver (+++) Ausprägung. In der Mitte des Bildes ist eine Nekrose abgebildet (gelber Pfeil).

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, festzustellen, ob die Markerexpression in Primärtumoren und Hirnmetastasen gleich ist oder nicht. Als Marker wurden Glykostrukturen ausgewählt, die in vorangegangenen Studien positiv mit der Metastasierung korreliert waren. Problematisch stellte sich grundsätzlich die Suche nach korrespondierenden Tumorkomplexen dar, da aufgrund der infausten Prognose die Patienten häufig nicht mehr operiert werden konnten, und somit auch kein histologisches Material zur Verfügung steht. Als ein weiteres prinzipielles Problem zeigte sich, dass sich die Patienten oft in einem auswärtigen, meist nicht bekannten Krankenhaus operieren ließen, was dazu führte, dass nur 35 Paare von Primärtumoren und deren korrespondierenden Hirnmetastasen untersucht werden konnten

Die drei Marker CEACAM1, L1 und HPA-Bindungsstellen sollen nun im Einzelnen diskutiert werden.

4.1. CEACAM1 und seine mögliche funktionelle Bedeutung für die Metastasierung

Die immunhistochemischen Untersuchungen mit dem Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 wurden durchgeführt, da CEACAM1, wie in verschiedenen Studien gezeigt, eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung spielt. Eine Immunreaktivität in den Tumorzellen der Hirnmetastasen könnte auf die verschiedenen Rollen des CEACAM1 in den drei untersuchten Malignomentitäten hinweisen. Da CEACAM1 im Mammakarzinom eine andere Rolle zu spielen scheint als im malignen Melanom und im Bronchialkarzinom, müssen hier die einzelnen Tumorentitäten für CEACAM1 getrennt voneinander betrachtet werden.

Eine herabgesetzte Expression von CEACAM1 wurde im Mammakarzinom (Riethorf et al., 1997), im Kolonkarzinom (Neumaier et al., 1993; Brümmer et al., 1995), im Prostatakarzinom (Kleinerman et al., 1995; Luo et al., 1999) und eine dysregulierte Expression im Endometriumkarzinom (Bamberger et al., 1998) beschrieben.

Diese Studie bestätigte im Mammakarzinom die Ergebnisse von Riethdorf et al. (1997). Dort wurde gezeigt, dass die CEACAM1-Expression mit steigendem

Malignitätsgrad sank. Es fand sich in den Primärtumoren keine oder allenfalls schwache (+) zytoplasmatische Immunreaktivität. Dieses Muster der Immunreaktivität setzte sich im Verlauf der hämatogenen Metastasierung in den Hirnmetastasen fort, bzw. veränderte sich nur marginal. Lediglich zwei Hirnmetastasen zeigten zu einem geringen Prozentsatz eine mittelgradige (++) Immunreaktivität. Tendenziell scheint also der Verlust oder die herabgesetzte Expression von CEACAM1 im Mammakarzinom bestehen zu bleiben, was die Rolle des CEACAM1 im Mammakarzinom, nämlich an einer frühen Phase der Tumorentstehung beteiligt zu sein, stützt.

Huang et al. (1999) zeigten die unterschiedlichen Wirkungsweisen von CEACAM1 in einer normalen Epithelzelllinie der Brustdrüse (MCF10F) und in einer Karzinomzelllinie der Brustdrüse (MCF7). In der benignen Zelllinie ist CEACAM1 ein wichtiges Element der Morphogenese. Während des Wachstums der epithelialen benignen Zellen in Matrigel (eine künstliche EZM) formten diese sphärische Azini mit einem zentralen Lumen, via Apoptose der zentral gelegenen Zellen, und exprimierten CEACAM1 auf der luminalen Oberfläche. Wurde nun die CEACAM1-Expression geblockt, so stoppte auch die Lumenentwicklung. Die Karzinomzelllinie MCF7 hingegen exprimierte kein CEACAM1 und formte auch keine Lumina. Induzierte man die CEACAM1-Expression, so bildeten die malignen Zellen wieder Lumina, wie in einem normalen morphologischen Programm der Brustdrüsenentwicklung. Kirshner et al. (2003) zeigten, dass es das CEACAM1-4S (die kurze zytoplasmatische Isoform des CEACAM1) ist, welches nicht nur die vorherrschende Form von CEACAM1 im Brustepithel ist, sondern auch für die Formung der Lumina verantwortlich ist.

In den Mammakarzinomen dieser Studie und auch in den korrespondierenden Hirnmetastasen war CEACAM1 deutlich herabreguliert, ähnlich wie in der MCF7 Linie und in der CEACAM1 geblockten MCF10 Linie. Dieses Ergebnis und auch die Beobachtungen von Huang et al. (1999) stützen die These, dass Mammakarzinome mit verminderter CEACAM1-Expression von besonders hoher Malignität sind.

Über ein Fusionsprotein, CEACAM1-4S-ectoGFP, machten Kirshner et al. (2003) sichtbar, dass CEACAM1-4S in den ersten Tagen als Zelladhäsionsmoleküle zwischen den Zellen agiert und sich später ein apikales Expressionsmuster von

CEACAM1-4S in den reiferen Brustdrüsenzellen zeigt. Denkbar wäre hier auch, dass CEACAM1 als Zell-zu Zell- Kontakt bestehen bleibt, jedoch in der reifen und gesunden Brustdrüse maskiert und somit nicht darstellbar ist.

Die Studien von Kirshner et al. (2003) und Singer et al. (2000) zeigen, dass die beiden verschiedenen zytoplasmatischen Domänen des CEACAM1, CEACAM1-4S und CEACAM1-4L, unterschiedliche Wirkungsweisen haben. So ist CEACAM1-4L beispielsweise in der Lage, in vivo das Wachstum von verschiedenen Tumorzellen zu unterdrücken (Kunath et al, 1995; Luo et al, 1997). Seine tumorsuppressive Eigenschaft wird von der L-Isoform bestimmt, und wird dort von den phosphorylierbaren Tyrosinresten bestimmt. In diesem Fall kann CEACAM1 auch als intrazellulärer Rezeptor wirken. Die S-Isoform hingegen ist nur mit der L-Form gemeinsam in der Lage, tumorsuppressiv zu wirken.

Diese Studien zeigen die tumorsuppressive und morphogenetische Wirkungsweise des CEACAM1, beziehungsweise die wichtige Rolle von CEACAM1-4S in der Morphogenese normalen Brustdrüsengewebes, vermittelt über Zell-Zell- und Zell-extrazelluläre Matrix-Kontakte. Huang et al. (1999) formulieren weiterhin, dass die herabregulierte Expression von CEACAM1 in den MCF7 Zelllinien einen Wachstumsvorteil dieser Zellen in ihrer ECM (hier Matrigel), gegenüber den nichtmalignen Zellen, bedeuten könnte. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für die Metastasierung von Mammakarzinomen in das Gehirn möglich.

Welche Mechanismen für die Metastasierung des Mammakarzinoms verantwortlich sind, ist bis heute nur in Ansätzen erforscht. So mag die herabregulierte Expression von CEACAM1 und E-Cadherin (Siitonen et al., 1996) die Herauslösung der malignen Zellen aus dem festen Epithelverband initiieren, dann mit Hilfe von E-Selektin und dem sLe^x die Adhäsion der Tumorzellen am Gefäßendothel erleichtert wird, und somit der Anfang der hämatogenen Metastasierung geschaffen sein kann. In einigen Fällen sind Tumorzellen in der Lage, Liganden für E-Selektine, wie sLe^x, zu produzieren und so befähigt, an einem anderen Ort im menschlichen Körper adhären zu können, um eine Metastase zu bilden (Zetter, 1993). Für das Mammakarzinom

jedoch wird die Rolle der Selektine, besonders die des E-Selektin sehr kontrovers diskutiert (Krause und Turner, 1999).

Wie unterschiedlich die Wirkungsweise von CEACAM1 sein kann, zeigen die Ergebnisse dieser Studie an den verschiedenen Tumorentitäten. So könnte es sein, dass der Verlust des Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 die Tumorentstehung in der Brustdrüse durch den Verlust von Zell-zu-Zell-Kontakten begünstigt. In den Hirnmetastasen dieser Mammakarzinome scheint der Verlust des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 bestehen zu bleiben, CEACAM1 nahm seine Funktion als Zelladhäsionsmolekül hier nicht mehr auf.

Gegensätzlich scheint es sich im malignen Melanom zu verhalten. Hier bedeutet die Expression von CEACAM1 ein höheres Maß an Malignität (Thies et al, 2002a). Thies et al. (2002a) konnten zeigen, dass sich die intensivste Immunreaktivität in den Tumorzellen an der Invasionsfront des Tumors befand. Diese Studie bestätigt diese Beobachtungen und zeigt auch, dass die CEACAM1-Expression auch verstärkt in den Hirnmetastasen zu finden ist. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass CEACAM1 im malignen Melanom nicht als Zell-zu Zell-Kontakt der Melanomzellen untereinander dient, sondern verstärkend bezüglich der Malignität wirkt.

Die Melanome und ihre korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten alle eine Immunreaktion auf den monoklonalen Antikörper gegen CEACAM1, die sich von schwach (+) bis intensiv (+++) erstreckte. Tendenziell zeigte sich an der Invasionsfront des Primärtumors eine stärkere Immunreaktivität als im restlichen Tumorgewebe. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch in den Studien von Thies et al. (2002a und 2006), wonach eine hochregulierte CEACAM1-Expression im malignen Melanom hochsignifikant mit einer Metastasierung verknüpft ist. In normalen Melanozyten findet sich nur sehr selten eine Immunreaktivität gegenüber dem 4D1/C2 Antikörper (Thies et al., 2002a). Für Fernmetastasen und den Sentinel Lymphknoten fanden Thies et al. (2006) ebenfalls eine hochregulierte Expression von CEACAM1. Das rezidivfreie Intervall und die Gesamtüberlebenszeit sind bei CEACAM1- positiven Primärtumoren signifikant schlechter als bei CEACAM1- negativen Primärtumoren und das Risiko der Metastasierung fünffach erhöht (Thies et a., 2002a)

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen ebenfalls die Tendenz, dass CEACAM1, wie in den Sentinel Lymphknoten, auch in den Hirnmetastasen von malignen Melanomen hochreguliert ist. Auch die untersuchten Hautmetastasen zeigten, wie bei Thies et al. (2006) eine Hochregulation des CEACAM1. Diese Tendenz und die Ergebnisse von Thies et al. (2002a und 2006) sowie die Ergebnisse von Ebrahimnejad (2004), die eine deutliche Überexpression von CEACAM1 an der Invasionsfront von malignen Melanomen beschreiben, stützen die Theorie einer funktionellen Beteiligung des CEACAM1 an der Metastasierung.

Brümmer et al. (2001) zeigten, dass sich an der Invasionsfront maligner Melanome eine erhebliche Konzentration von CEACAM1-4L und dem β 3-Integrin fand, was sie vermuten ließ, dass die beiden Zelladhäsionsmoleküle dort kolokalisiert und koexprimiert sind.

Wie gegensätzlich CEACAM1 in den verschiedenen Tumorentitäten wirken kann, sei an dieser Stelle erwähnt. Im Mammakarzinom ist es lange zytoplasmatische Domäne, CEACAM1-4L, welche für die tumorsuppressive Wirkungsweise verantwortlich ist. Im malignen Melanom hingegen ist das CEACAM1-4L, welches das invasive Wachstum, die Tumorphprogression vorantreibt (Ebrahimnejad et al., 2004). In Epithelzellen der Brustdrüse übertragenes CEACAM1-4L führte dort zur Apoptose der Zellen (Kirshner et al., 2003). Ebrahimnejad et al. (2004) spekulierten, dass der tumorsuppressive Effekt des CEACAM1-4L in manchen Tumoren eventuell auf die so herangeführte gesteigerte Apoptoserate zurückzuführen sein könnte. Dies ist jedoch beispielsweise beim Mammakarzinom fraglich, da dort das CEACAM1-4S die vorherrschende Form ist, welche im Laufe der Tumorgenese herunterreguliert wird. Möglicherweise sind es das β 3-Integrin und bis heute zum Teil unentdeckte Interaktionspartner des CEACAM1, welche die vielseitigen, und zum Teil gegensätzlich erscheinenden, Eigenschaften des CEACAM1-Moleküls ausmachen.

Die mögliche funktionelle Beteiligung des CEACAM1 an der Metastasierung von malignen Melanomen findet auch Unterstützung durch eine Studie von Lucka et al. (2004). Dort wurde gezeigt, dass das CEACAM1 auf menschlichen Granulozyten Träger des sLe^x ist. Dies wiederum ist Bindungspartner für E-Selektin, welches von aktivierten Endothelzellen, zum Beispiel während einer

Entzündungsreaktion, exprimiert wird. In diesem Fall vermittelt es das „Rolling“, die Verlangsamung der Zellen auf dem Endothel (siehe Abb.2), damit diese später durch einen Endothelspalt an den Ort der Entzündung gelangen können. Da auch das CEACAM1 mancher Tumorzellen das sLe^x trägt und manche Tumorzellen über die Ausschüttung von beispielsweise dem Tumornekrosefaktor- α das Endothel zur Expression von E-Selektinen bringen können, könnte man vermuten, dass Tumorzellen einen sehr ähnlichen Weg wie die Granulozyten während einer Entzündungsreaktion einschlagen könnten. Eine Festigung dieser Adhäsion könnte eventuell über eine gesteigerte Ko-Expression von CEACAM1 und β 3-Integrin (Brümmer et al., 2001) mit Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie auf den Endothelzellen erreicht werden. Hier sei jedoch auch erwähnt, dass die Expression von Selektinbindungsstellen im malignen Melanom in der Vergangenheit strittig diskutiert wurde (Krause und Turner, 1999) und diese Frage noch nicht endgültig geklärt werden konnte.

Die Ergebnisse der Bronchialkarzinome mit den korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten überraschenderweise bis auf eine Hirnmetastase keine Immunreaktivität auf den 4D1/C2 Antikörper. Dies ist genau gegensätzlich zu verschiedenen anderen Studien, die alle zeigten, dass CEACAM1 im NSCLC in hochregulierter Form exprimiert wird und mit einer schlechten Prognose für den Patienten bezüglich einer früher eintretenden Metastasierung korreliert ist (Laack et al., 2002b; Sienel et al., 2003; Luo et al., 2000). Zwei Drittel der von Laack et al. (2002b) untersuchten Adenokarzinome der Lunge zeigten eine Immunreaktivität gegenüber dem 4D1/C2 Antikörper, wobei keine Unterschiede zwischen lymphogener und hämatogener Metastasierung festzustellen waren. Gesundes Lungengewebe hingegen zeigt keine Immunreaktivität (Prall et al., 1996).

Das Ergebnis dieser Studie lässt so nicht ableiten, dass CEACAM1 im NSCLC herunterreguliert ist, da die untersuchte Fallzahl zu gering ist, um die Ergebnisse anderer, deren Fallzahl größer war, anzweifeln zu dürfen.

4.2. L1 und seine mögliche funktionelle Beteiligung an der Metastasierung

Die immunhistochemischen Darstellungen des Zelladhäsionsmoleküls L1 (CD171) wurden an allen drei Tumorentitäten vorgenommen, da L1 eine wichtige Rolle bei der Metastasierung und der Tumorprogression zugeschrieben wird. Da L1 verschiedene Funktionen und aktive Formen hat, wurden zur Darstellung zwei verschiedene monoklonale Antikörper verwendet: UJ 127.11, gegen die Ektodomäne des humanen hämatopoetischen L1 und L1-11A (Subklon des UJ 127.11), welcher gegen die neuronale Form des humanen L1 bindet.

Die zwei Antikörper färbten in der Tendenz ähnliche Strukturen im Gewebe an, jedoch waren die Intensitäten der Immunreaktivität sehr unterschiedlich. UJ 127.11 zeigte mehrheitlich eine Immunreaktivität, die sich von schwach (+) bis intensiv (+++) erstreckte. An der Invasionsfront einiger Tumoren war eine starke Zunahme der Immunreaktivität zu beobachten. Die Hirnmetastasen zeigten zumeist eine mittelgradige (++) Immunreaktivität, die Hautmetastasen meist eine schwache (+). Der L1-11A-Antikörper gegen die neuronale Form des L1 zeigte eine sehr schwache Immunreaktivität. Lediglich die Tumoren, welche eine intensive (+++) Immunreaktivität beim UJ 127.11 gezeigt hatten, zeigten hier eine mittelgradige (++) oder schwache (+) Immunreaktivität und die, die zuvor eine schwache (+) Immunreaktivität gezeigt hatten, zeigten hier keine Immunreaktivität mehr.

Thies et al. (2002b) zeigten, dass Patienten, deren Melanome eine Immunreaktivität gegenüber einem polyklonalen L1-Antikörper zeigten, eine statistisch signifikant schlechtere Prognose bezüglich des Metastasierungsrisikos hatten, als Patienten, deren Melanome L1 negativ waren. Desweiteren zeigten sie auch, dass normale Melanozyten kein L1 exprimieren, was vermuten lässt, dass die Neoexpression von L1 an der Metastasierung beteiligt ist. Meier et al. (2006) zeigten, dass die Überexpression von L1 in Melanomzellen die Tumorprogression in frühen Stadien, der radialen Wachstumsphase, vorantreibt und die L1-Expression mit einer β 3-Integrin-Expression korreliert ist. Desweiteren zeigten sie, dass die Inaktivierung des L1 das Tumorstadium drosseln konnte. Die Ergebnisse von Meier et al. (2006) und die von Thies et al. (2002b und 2006) lassen mit den Ergebnissen dieser Studie die Vermutung zu, dass L1 funktionell an der Metastasierung beteiligt ist, da eine Expression von L1

tendenziell in den Hirnmetastasen wiederzufinden ist. Funktionell könnte eine Beteiligung von L1 bei der Adhäsion an Gefäßendothelien bei der Metastasierung eine Rolle spielen, wie Untersuchungen an der Maus zeigen.

Auf Mäuseleukozyten detektiertes L1 scheint eine Rolle bei der Adhäsion an Gefäßendothelzellen zu spielen (Hubbe et al., 1993). Die Gefäßanheftung stellt, wie zuvor beim CEACAM1 diskutiert, einen entscheidenden Schritt der Metastasierungskaskade dar, da auf diese Weise die Extravasation ins Interstitium des Zielorgans der Metastasierung ermöglicht wird. So könnten auch die Melanomzellen über eine Hochregulation des Zelladhäsionsmoleküls L1 in das Gehirn der Patienten gelangen und dort eine Metastase setzen. Beer et al. (1998) konnten zeigen, dass B16F10 Melanomzellen dazu befähigt sind, L1 von ihrer Oberfläche zu sezernieren, welches in der ECM funktionsfähig bleibt, wenngleich das L1 kleiner geworden ist, und dort als Substrat für integrinabhängige Bindungen zur Adhäsion und Migration dient. Experimentell zeigten dies Linnemann et al. (1989), indem sie eine L1-positive Melanomzelllinie in Nacktmäuse intravenös injizierten, und diese Mäuse danach Lungenmetastasen bildeten. Nach Injektion einer L1-negativen Melanomzelllinie waren sie nicht befähigt, Lungenmetastasen zu setzen.

Funktionell bedeutsam für die Metastasierung des malignen Melanoms scheint auch die Beobachtung zu sein, dass das Zelladhäsionsmolekül L1 die Migration von menschlichen Tumorzellen durch das RGD-bindende $\alpha v \beta 3$ -Integrin unterstützt (Duczmal et al., 1997). $\alpha v \beta 3$ -Integrin gilt bereits als Promotor für Zellbeweglichkeit und Migration (Leavesley et al., 1992). Als Bindungsstelle hierfür gilt die sechste immunoglobulinähnliche Domäne des L1. Duczmal et al. (1997) zeigten weiterhin, dass die Migration der Zellen durch die Anwesenheit von Antikörpern gegen das $\alpha v \beta 3$ -Integrin unterbunden werden konnte.

Weitaus weniger Untersuchungen bezüglich einer L1-Expression gibt es für das Mammakarzinom. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen ein recht homogenes Muster der L1-Expression dahingehend, dass L1 im Mammakarzinom und den korrespondierenden Hirnmetastasen tendenziell schwach (+) bis maximal mittelgradig (++) , welches sich dann in der Hirnmetastase zeigte, exprimiert wird (UJ127.11). Der L1-11A-Antikörper zeigte lediglich in vier Fällen eine schwache (+) Immunreaktivität.

L1 übt seine Funktionen nicht nur als Zelladhäsionsmolekül auf Zelloberflächen aus, es kann auch von der Zelloberfläche sezerniert und in der ECM deponiert werden (Martini und Schachner, 1988; Montgomery et al., 1996). Als heterotypische Interaktionspartner zwischen L1 und anderen RGD-bindenden Integrinen wurden wie bereits oben genannt das $\alpha v \beta 3$ -Integrin und $\alpha v \beta 1$ - sowie $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin beschrieben (Blaess et al., 1998; Montgomery et al., 1996; Ruppert et al., 1995)

Gutwein et al. (2000) zeigten, dass die Spaltung des extrazellulären Teils des L1 vom membrangebundenen Teil durch eine Disintegrin Metalloproteinase (ADAM10) ausgeübt werden kann. Mechtersheimer et al. (2001) postulierten, dass die durch ADAM10 abgespaltene Ektodomäne die Zellmigration auf Fibronectin und Laminin unterstützt. Dies zeigten sie anhand der AR positiven (Androgenrezeptor positiven) Mammakarzinomzelllinie, in welcher die Migration der Tumorzellen durch autokrine/parakrine Stimulation von löslichem L1 und $\alpha v \beta 5$ -Integrin gefördert wurde. Sie zeigten, dass das L1-32 Fragment, welches dem zytoplasmatischen Teil des L1 entspricht, mit der Zellmembran verbunden bleibt, während sich die Ektodomäne löst. Blockierten sie die Loslösung der Ektodomäne des L1 durch einen Inhibitor der Metalloproteinase, so reduzierte sich die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen. Ebenso konnte die durch L1 erworbene Migrationsfähigkeit von L1-CHO Zellen durch einen monoklonalen Antikörper gegen $\alpha v \beta 5$ -Integrin geblockt werden.

Da in der Studie unter anderem ein L1 Antikörper gegen die Ektodomäne (UJ 127.11) des L1 verwendet wurde und diese, wie in der AR Brustkrebszelllinie gezeigt, dort in die ECM sezerniert wurde, muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die schwache (+) Immunreaktivität gegen den UJ 127.11-Antikörper damit zusammenhängen könnte, dass die Ektodomäne bereits sezerniert wurde und sich in der ECM nicht mehr anfärbt. Dies bliebe jedoch durch weitere Studien zu untersuchen.

Die Bronchialkarzinome und ihre korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten ähnlich wie die Mammakarzinome einheitlich eine schwache (+) Immunreaktivität, die sich maximal bis zu einer mittelgradigen (++) Immunreaktivität steigerte. Die Tatsache, dass L1 tendenziell im Bronchialkarzinom und seinen korrespondierenden Hirnmetastasen zu finden ist,

wird durch eine Studie von Katayama et al. (1997) gestützt, die zeigten, dass L1 auf menschlichen Bronchialkarzinomzellen exprimiert wird. Dale und Brandtzaeg (1989) zeigten, dass sich in 97 Prozent der von ihnen untersuchten Plattenepithelkarzinomen L1 exprimierten. Diese und die eigenen Ergebnisse können vermuten lassen, dass L1 auch bei dieser Tumorentität eine funktionelle Rolle spielen könnte. Vielleicht sind es hier auch die Integrine, welche über heterotypische Bindungen die Metastasierung unterstützen, funktionell von Bedeutung. Hierüber liegen jedoch für das Bronchialkarzinom noch keine Daten vor.

4.3. L1 UJ 127.11 vs. L1-11A

Vergleicht man die Ergebnisse der zwei verschiedenen, in dieser Studie verwendeten, L1-Antikörper, L1 UJ 127.11, welcher dem humanen L1 entspricht und L1-11A, welcher der humanen neuronalen Form entspricht, so zeigt sich ein gravierender Unterschied zwischen den Färbeergebnissen. Die meisten Tumoren, die L1 UJ 127.11 positiv waren, zeigten keine Immunreaktivität gegenüber dem L1-11A Antikörper.

Die malignen Melanome und ihre korrespondierenden Hirnmetastasen zeigen hier jedoch einige Ausnahmen. Tumoraare, die L1 UJ 127.11 mittelgradig (++) bis intensiv (+++) positiv waren, zeigten eine schwache (+) bis mittelgradige (++) Immunreaktivität gegenüber dem L1-11A Antikörper. Der Antikörper L1 UJ 127.11 bindet L1, welches sich auf menschlichen Tumorzellen befindet, was auch zu der Vermutung führte, dass L1 eine funktionelle Rolle bei der Metastasierung spielen könnte. Da Melanozyten von der Neuralleiste abstammen und maligne Melanome häufig in das Gehirn metastasieren, ist es wichtig, den Vergleich zwischen der neuronalen Form des L1 und der hämatopoetischen Form des L1 anzustellen. Diese Ergebnisse zeigen die Tendenz, dass der L1 UJ 127.11 Antikörper der sensitivere Antikörper ist, um maligne Melanomzellen zu detektieren und eine Aussage über die Malignität zu treffen.

Für das Mammakarzinom, das Bronchialkarzinom und deren korrespondierenden Hirnmetastasen gilt die Tendenz, dass keine dieser Tumorentitäten eine Immunreaktivität gegenüber der neuronalen Form zeigte,

wobei zu erwähnen sei, dass es sich bei den Bronchialkarzinomen um NSCLC handelte, welche keine NSE exprimieren. Der L1 UJ 127.11 hingegen zeigte in den Zellen des Primärtumors und denen der Hirnmetastasen eine schwache (+) bis mittelgradige (++) Immunreaktivität. Dies ließe sich einerseits durch die Tatsache erklären, dass die hämatopoetische Form auf diesen Tumorzellen exprimiert wird, andererseits erklärt dies nicht, warum andere Tumorzellen, wie zum Beispiel die des malignen Melanoms, L1 UJ 127.11 stärker exprimieren als das Mammakarzinom, das Bronchialkarzinom und deren korrespondierenden Hirnmetastasen.

Ein Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen mit dem Zelladhäsionsmolekül L1 wäre das Anfärben des zytoplasmatischen Teils des L1, da L1 auch sezerniert und in der ECM deponiert werden kann. Denn es wäre denkbar, dass ein Tumor sein L1 in die ECM sezerniert hat, was aufgrund seiner Löslichkeit nicht nachweisbar wäre. Auf der Zelloberfläche bliebe dann der zytoplasmatische Teil des L1 zurück (Beer et al., 1999). Ob und wie das sezernierte L1 in der ECM an der Metastasierung beteiligt ist, bliebe dann mit anderen Methoden zu untersuchen.

4.4. Detektion von Bindungsstellen für Helix pomatia Agglutinin (HPA)

4.4.1. Die Funktionalität der Bindungsstellen des Helix pomatia Agglutinins

Die vorliegenden Untersuchungen für Bindungsstellen des Helix pomatia Agglutinins, dem Lektin der Weinbergschnecke, wurden aus zweierlei Gründen durchgeführt. Die Überexpression für Bindungsstellen dieses Lektins wurde in allen drei Tumorentitäten mit einer schlechten Prognose und einem damit zusammenhängenden höheren Risiko einer Metastasierung in Verbindung gebracht (Brooks und Leathem, 1998; Thies et al., 2001a; Laack et al., 2002a). Dies ließ die Vermutung einer funktionellen Beteiligung des HPA an der Metastasierung zu. Ob sich diese Überexpression in den korrespondierenden Hirnmetastasen wiederfindet, soll in dieser Studie untersucht werden.

Desweiteren wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass bei der Detektion der Zuckerreste die Methode der HPA-Färbung eine wichtige Rolle spielt (Brooks et al., 1996). Daher soll in dieser Studie die direkte, biotinyliertes HPA mit einem alkalische Phosphatase-System entwickelt, Methode mit der indirekten Methode,

natives HPA entwickelt mit einem Avidin-Peroxidase-System, miteinander verglichen werden.

Dass eine Überexpression von Bindungsstellen des Helix pomatia Agglutinins, Zuckerspezifität N-Azetylgalaktosamin und N-Azetylglucosamin, ein zuverlässiger Marker für eine schlechte Prognose ist, wurde in der Vergangenheit für verschiedene Tumorentitäten belegt. Für das Helix pomatia Agglutinin gibt es erste Studien, die sich mit dem Metastasierungsmuster HPA-positiver Tumoren beschäftigen (Brooks und Leatham, 1998; Konno et al., 2002).

Die Ergebnisse für das Mammakarzinom, das Bronchialkarzinom und deren korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten größtenteils homogen eine mittelgradige (++) bis intensive (+++) Lektinreaktivität. Es fiel auf, dass ungefähr die Hälfte der Paare eine membranbetonte Lektinreaktivität zeigte. Die Tendenz dieser Ergebnisse bestätigt die von Leatham und Brooks (1987) im primären Mammakarzinom. Dort zeigten sie, dass HPA-positive Mammakarzinome eine schlechtere Prognose für den Patienten bedeuten, da diese schneller Metastasen setzten als HPA-negative Tumoren. Da die Hirnmetastasen sich tendenziell sehr ähnlich wie die Primärtumoren anfärbten, liegt die Vermutung nahe, dass die veränderten Zuckerreste auf den Tumorzellen funktionell zur Metastasierung beitragen könnten.

Die malignen Melanome, die Hautmetastasen und ihre korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten erstaunlicherweise bis auf ein Paar, welches eine schwache (+) Lektinreaktivität zeigte, keine Lektinreaktivität. Dies verwundert, da Thies et al. (2001a) zeigten, dass HPA-positive Melanome ein 2,6-fach erhöhtes Metastasierungsrisiko für den Patienten bedeuten. 2006 zeigten Thies et al., dass sich in 77 Prozent der Fernmetastasen und in 25 Prozent der lymphogenen Metastasen von malignen Melanomen eine Überexpression von Bindungsstellen für HPA fanden. Diese Beobachtung ließ sie vermuten, dass HPA-bindende Kohlenhydrate eine Rolle bei der hämatogenen Metastasierung spielen könnten. Die Tendenz dieser Studie kann diese Vermutung aufgrund der nicht vorhandenen Expression von HPA-Bindungsstellen nicht bestätigen.

Dennoch besteht der Verdacht, dass HPA-Bindungsstellen eine funktionelle Bedeutung für die Metastasierung haben könnten. Die im Folgenden beschriebenen Beobachtungen von Valentiner et al. (2005) betreffen sechs

metastasierende Mammakarzinomzelllinien, die Scid-Mäusen subkutan injiziert wurden. Vier der sechs untersuchten Zelllinien entwickelten Lungenmetastasen, und drei dieser vier Zelllinien waren HPA-positiv. Dieses Ergebnis zeigt, dass HPA-positive Zelllinien eine größere Fähigkeit zur Metastasierung besitzen. Jedoch zeigt es auch, dass HPA-negative Zelllinien des Mammakarzinoms in der Lage sind, Metastasen zu bilden. So könnte es sich auch mit Zelllinien des malignen Melanoms verhalten, dies würde im Ansatz erklären, warum die HPA-negativen Melanome Hirnmetastasen gebildet haben. Desweiteren zeigten Valentiner et al. (2005) *in vitro*, dass HPA-positive Mammakarzinomzelllinien eine funktionelle Rolle bei der Kontaktaufnahme mit dem Gefäßendothel ausüben. Dies stützt die zu beobachtende Tendenz dieser Studie, deren Ergebnisse zeigen, dass fast alle Mammakarzinome und Bronchialkarzinome mit ihren korrespondierenden Hirnmetastasen eine vermehrte Expression von HPA-Bindungsstellen zeigten.

Normale Melanozyten zeigen keine Expression von HPA-Bindungsstellen (Thies et al. 2001a), normales Brustdrüsengewebe hingegen zeigt in den apikalen Anteilen des Gangepithels HPA-Bindungsstellen.

HPA-Bindungsstellen scheinen in Adhäsivprozessen eine wichtige Rolle zu spielen, auch scheint ein wichtiger funktioneller Zusammenhang bei der Ansiedlung der Tumorzellen im neuen Wirtsgewebe denkbar zu sein, was die HPA-positiven Hirnmetastasen des Mamma- und Bronchialkarzinoms zeigen. Dies zeigte auch eine Studie von Konno et al. (2002), in welcher sich zeigte, dass Patienten, deren kolorektales Karzinom Bindungsstellen für HPA und auch für anti-sLe^x bildeten, die statistisch signifikant schlechteste Prognose von allen getesteten Glykokonjugaten besaßen. Sie zeigten auch, dass eine positive Korrelation zwischen der Expression von HPA Bindungsstellen und einer Metastasierung in die Lymphknoten besteht.

Im Gegensatz zu der Tendenz der Ergebnisse dieser Studie, wo jede Hirnmetastase, deren primäres Mammakarzinom HPA-positiv ist, auch HPA-positiv ist, stehen Beobachtungen von Schumacher et al. (1992). Sie beobachteten in einer Studie, dass 20 Prozent der Hirnmetastasen von primären Mammakarzinomen HPA-negativ waren.

Auch Brooks und Leathem (1998) führten Untersuchungen über Metastasierungsmuster HPA-positiver Mammakarzinome durch. Sie konnten zeigen, dass alle von ihnen untersuchten primären Mammakarzinome HPA-positiv waren und dass sich 79 Prozent der von ihnen untersuchten Metastasen, unabhängig ihrer Lokalisation, intensiv (+++) durch HPA gefärbt wurden. Auch die zwei von ihnen untersuchten Hirnmetastasen zeigten eine Immunreaktivität auf HPA. Sie beschrieben jedoch auch Tumoren, welche HPA- positiv und - negativ waren. Diese Beobachtungen konnten auch in dieser Studie gemacht werden. Diese Tatsache wäre eine mögliche Erklärung für das Phänomen, dass Hirnmetastasen trotz eines HPA-positiven Primärtumors HPA-negativ sein können. Dazu schreiben Brooks und Leathem (1998), dass es denkbar sei, dass HPA-negative Tumorzellen aus einem HPA-positiven Tumor metastasieren und so eine HPA-negative Metastase setzen. Gestützt wird diese These durch die Beobachtungen von Valentiner et al. (2005), da auch sie beobachten konnten, dass HPA-negative Zellen zur Metastasierung befähigt sein können.

4.4.2. Zwei verschiedene Methoden der HPA-Lektin histochemie im Vergleich

Die zwei unterschiedlichen Methoden der HPA-Lektin histochemie wurden durchgeführt, da sich in der Vergangenheit zeigte, dass die Methode der HPA-Darstellung einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis hat (Brooks et al., 1996). In der Vergangenheit wurde kontrovers diskutiert, ob eine Lektinreaktivität auf das Helix pomatia Agglutinin tatsächlich im Zusammenhang mit einer Metastasierung besteht (Walker, 1993). Für die positive Korrelation einer HPA-Expression in Verbindung mit einer schlechteren Prognose aufgrund einer Metastasierung sprachen die Ergebnisse von Leathem und Brooks (1987), welche zeigten, dass Patienten, welche an einem HPA-positiven Mammakarzinom erkrankt waren, eine schlechtere Langzeitprognose betreffend ihrer Überlebenszeiten hatten und dass diese Tumoren auch schneller Metastasen setzten als HPA-negative Tumoren. Bestätigende Ergebnisse lieferten für das Mammakarzinom Noguchi et al. (1993), Thomas et al. (1993), Alam et al. (1990) und Fenlon et al. (1987), für das Magenkarzinom Kakeji et al. (1991), für das kolorektale Karzinom Ikeda et al. (1994) und Schumacher (1994),

für das Ösophaguskarzinom Yoshida et al. (1993) und für das Prostatakarzinom Shiraishi et al. (1992). Später zeigten auch Laack et al. (2002a) und Thies et al. (2001a) für das Adenokarzinom der Lunge und für das maligne Melanom, dass HPA als ein unabhängiger prognostischer Faktor für eine schlechtere Prognose auch für diese beiden Tumorentitäten angesehen werden kann. Angezweifelt hatten diese Befunde beim Mammakarzinom Galea et al. (1991) und Gusterson (1993), da sie die positive Korrelation zwischen HPA-färbenden Tumoren und einer schlechteren Prognose nicht zeigen konnten. Brooks et al. (1996) zeigten, dass dies an den verschiedenen Färbetechniken liegen könnte, da Gusterson (1993) und Galea et al. (1991) beide eine direkte Darstellungsweise des HPA, kovalent an eine Meerrettichperoxidase gebunden, genutzt hatten. Brooks et al. (1996) zeigten an 373 Primärtumoren des Mammakarzinoms, dass die Ergebnisse durchaus von der Methode der HPA-Lektin histochemie abhängig waren. Sie zeigten, dass verlässliche prognostische Ergebnisse für die oben genannten Tumorentitäten nur zu erzielen waren, wenn man sich der indirekten Methode, natives HPA und einen anti-HPA-Antikörper verwendend, bediente und die Farbreaktion durch einen Avidin-Peroxidase-Komplex herbeiführte. Mit der Methode von Galea et al. (1991) und Gusterson (1993) waren diese Ergebnisse nicht befriedigend zu erzielen. Brooks et al. (1996) schreiben in ihrer Studie, dass die verschiedenen Ergebnisse der zwei angewandten Methoden darauf zurückzuführen sein könnten, dass das für die direkte Methode verwendete HPA an eine im Vergleich größere Meerrettichperoxidase gekoppelt war, welches sterische Interaktionen an den Lektinbindungsstellen, an GalNAc- bzw. GalNAc-Resten verursachen könnte.

Später zeigten dann Thies et al. (2001a) und Laack et al (2002a), dass sie in ihren Studien sowohl mit der direkten, als auch mit der indirekten Methode, vergleichbare Ergebnisse erzielen konnten. Dies zeigt, dass das biotinylierte HPA deutlich weniger Einfluss auf die Ergebnisse, also auf die Lektinbindung, hat als an eine Meerrettichperoxidase gekoppeltes. Thies et al. (2001a) berichten, dass ihre Untersuchungen an malignen Melanomen zeigten, dass die direkte Methode, unter Verwendung von biotinyliertem HPA, eine etwas höhere Spezifität besaß als die klassische, indirekte Methode. Laack et al. (2002a) und Thies et al. (2001a) verwendeten jedoch für die direkte Methode ein biotinyliertes

HPA, welches kleiner ist als durch eine Meerrettichperoxidase konjugiertes HPA, welches Gusterson (1993) und Galea et al. (1991) verwendeten. Für die indirekte Methode verwendeten sie natives, durch einen Avidin-Biotin-alkalische-Phosphatase-Komplex dargestellten, HPA. Da jedoch eine große Prozentzahl der Adenokarzinome der Lunge HPA positiv waren, sowohl in der direkten, als auch bei der indirekten Methode, geben die Autoren zu bedenken, dass die Methodik der HPA-Färbung noch weiter und an größeren Fallzahlen erforscht werden sollte, um genauere Ergebnisse erzielen zu können.

Daher wurden in dieser Studie auch beide Methoden angewandt; für die direkte Methode das biotinyliertes HPA, dargestellt durch einen Avidin-Biotin-alkalische Phosphatase-Komplex, und die indirekte Methode, mit nativem HPA und einem anti-HPA-Antikörper, dargestellt durch einen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex sich braun anfärbende Meerrettichperoxidase. Da es bei der indirekten Methode, so wie sie in dieser Studie angewandt wurde, zu Verwechslungen zwischen dem normalen Melaninpigment und den HPA-positiven Tumorzellen kommen könnte, wurde bei den malignen Melanomen, ihren Haut- und Hirnmetastasen auf diese Färbemethode verzichtet und nur die direkte Methode angewandt. Bei den Mammakarzinomen zeigten acht von zwölf Paaren ein gleichartiges Färbeverhalten. Bei den Bronchialkarzinomen waren es drei von fünf Paaren. Den drastischen Unterschied von einem komplett bHPA-negativen Mammakarzinompaar zu einer schwach (+) bis intensiv (+++) angefärbten iHPA Anfärbung konnte man in lediglich einem Paar zeigen. Um jedoch statistisch aussagekräftigere Ergebnisse erzielen zu können, müssten auch bei diesen Tumorentitäten und diesen Methoden der HPA Darstellung größere Fallzahlen zur Verfügung stehen. Da die verwendeten Tumoren zwar alle aus dem Universitätskrankenhaus Eppendorf stammten, jedoch jedes Institut verschiedenartige Fixierungs- und Einbettungsmethoden verwenden könnte, sind Unterschiede im Färbeverhalten durch Einflüsse auf Lektinbindungsstellen, wie sie von Schumacher et al. (1995) beschrieben wurden, nicht auszuschließen. Dies ist besonders zu beachten, da alle Hirnmetastasen aus einem Institut stammen, die Primärtumoren jedoch aus verschiedenen, den jeweiligen Kliniken des Universitätskrankenhauses Eppendorf (siehe Kapitel 2.1.) stammen. Ein weiterer Grund für die nicht an eine hundertprozentige Gleichheit reichenden

Ergebnisse könnte darin zu suchen sein, dass die Detektionssysteme in dieser Studie verschieden war. Dabei scheint die von Thies et al. (2001a) und Laack et al. (2002a) alkalische Phosphatase, wie sie auch in dieser Studie verwendet wurde, der Meerrettichperoxidase als Detektionssystem überlegen zu sein (Thies et al., 2001a).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Muster der Markerexpression eines Primärtumors, die durch Immunhistochemie bzw. Lektinhistochemie erfasst wurde, tendenziell auch in der korrespondierenden Hirnmetastase wiederzufinden ist.

Dies untermauert die These, dass die Marker CEACAM1, HPA und L1 bei den untersuchten Tumorentitäten funktionell an der Hirnmetastasierung beteiligt sein könnten.

5. Zusammenfassung

Die Metastasierung von Tumoren, wobei insbesondere die Hirnmetastasierung zu berücksichtigen ist, stellt oft den limitierenden Faktor für das Überleben der meisten Patienten mit bösartigen Tumorerkrankungen dar. Deshalb ist es besonders wichtig, die Metastasierung bei Tumoren vorhersagen zu können. Als Metastasierungsmarker wurden in klinischen Studien die Zelladhäsionsmoleküle CEACAM1 und L1 sowie Glykotope, welche von dem zuckerbindenden Lektin Helix pomatia Agglutinin (HPA) erkannt wurden, identifiziert.

In dieser Studie wurde die Expression dieser Marker an Primärtumoren der Mamma, des Bronchus und des malignen Melanoms mit ihren korrespondierenden Hirnmetastasen, verglichen an 35 Fällen, untersucht.

Die Primärtumorzellen färbten sich prinzipiell sehr ähnlich wie die Zellen der Hirnmetastasen. Dies zeigte sich insbesondere bei allen Tumorentitäten in der L1-Färbung und in der HPA-Färbung, jedoch in unterschiedlichen Intensitäten zwischen den einzelnen Tumorentitäten. Beim Mammakarzinom und seinen korrespondierenden Hirnmetastasen zeigte sich fast durchgehend eine einheitlich schwache (+) Immunreaktivität gegenüber dem L1-UJ 127.11-Antikörper. Die malignen Melanome und ihre korrespondierenden Hirnmetastasen zeigten mit Ausnahme eines Paares keine Lektinreaktivität gegenüber dem HPA. Am wenigsten einheitlich zeigte sie die CEACAM1-Färbung. Hier variierte das Färbeverhalten zwischen den einzelnen Tumorentitäten von negativ bis zur intensiven Immunreaktivität. Auch das Färbeverhalten zwischen Primärtumor und Hirnmetastase zeigte sich unterschiedlicher zwischen Primärtumorzellen und Zellen der Hirnmetastasen als in den anderen Färbungen.

Da es sich bei den Hirnmetastasen um Fernmetastasen handelt, deutet der Befund, dass Primärtumoren und Hirnmetastasen gleichartig gefärbt sind, darauf hin, dass die Expression der untersuchten Antigene auch an dem Ort der Hirnmetastase für die Etablierung derselben von funktioneller Bedeutung sein könnten.

6. Literaturverzeichnis

Alam SM, Whitford P, Cushley W, George WD, Campell AM (1990) Flow cytometric analysis of cell surface carbohydrates in metastatic human breast cancer. *Br J Cancer* 62:238-242

Allroy Y, Matsuoka Y, Bazille C, Christensen EI, Ronco P, Debiec H (2005) The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 11:1190-1197

Amer MH, Al-Sarraf M, Vaitkevicius VK (1978) Malignant melanoma and central nervous system metastases: incidence, diagnosis, treatment and survival. *Cancer* 42: 660-668

Auerbach O and Garfinkel L (1991) The changing pattern of lung carcinoma. *Cancer* 68:1973-1977

Avril MF, Charpentier P, Margulius A, Guillaume JC (1992) Regression of primary melanoma with metastases. *Cancer* 6: 1377-1381

Bamberger AM, Riethdorf L, Nollau P, Naumann M, Erdmann I, Götze J, Brümmer J, Schulte HM, Wagener C, Löning T (1998) Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEAFamily, in endometrial cancer. *AM J Pathol* 152: 1401-1491

Bamberger AM, Sudahl S, Löning T, Wagener C, Bamberger C, Drakakis P, Coutifaris C, Makrigiannakis A (1999) The adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, C-CAM, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast. *Am J Pathol* 156:1165-1170

Beer S, Oleszewski M, Gutwein P, Geiger C, Altevogt P (1999) Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *Journal of Cell Science* 112: 2667-2675

Bendas G (1999) Selektine als neue Zielstrukturen für die Pharmaforschung. Pharmazeutische Zeitung 46: 1-11

Biancone L, Araki M, Araki K, Vassalli P, Stamenkovic I (1996) Redirection of tumor metastasis by expression of E-Selectin in vivo. J Exp Med 183:581-587

Blaess S, Kammerer RA, Hall H (1998) Structural analysis of the sixth immunoglobulin-like domain of mouse neural cell adhesion molecule L1 and its interactions with $\alpha v\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$, and $\alpha 5\beta 1$ integrins. J Neurochem 71: 2615-2625

Boogerd W, Vos VW, Hart AA, Baris G (1993) Brain metastasis in breast cancer; natural history, prognostic factors and outcome. J Neurooncol 15:165-174

Breslow A (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg 172:902

Brooks SA, Lymboura M, Schumacher U, Leathem AJ (1996) Histochemistry to detect helix pomatia lectin binding in breast cancer: methodology makes a difference. J Histochem Cytochem 44: 519-524

Brooks SA and Leathem AJ (1998-1999) Expression of N-acetyl galactosaminylated and sialylated glycans by metastases arising from primary breast cancer. Invas Met 18:115-121

Brooks SA, Hall DMS, Buley I (2001) GalNAc glycoprotein expression by breast cell lines, primary breast cancer and normal breast epithelial membrane. Br J Cancer 85: 1014-1022

Brümmendorf T, Kenwrick S, Rathjen FG (1998) Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. Curr Opin Neurobiol 8:89-97

Brümmer J, Neumaier M, Gopfert, Wagener C (1995) Association of pp60c-scr with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* 11:1649-1655

Brümmer J, Ebrahimnejad A, Flayeh R, Schumacher U, Löning T, Bamberger AM, Wagener C (2001) cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin β (3) *Am J Pathol* 159:537-546

Byrne TN, Cascino TL, Posner JB (1983) Brain metastasis from melanoma. *J Neurooncol* 1:313-317

Carbone DP (1997) The biology of lung cancer. *Sem Oncol* 24:388-401

Chou DK, Ilyas AA, Evans JE, Costello C, Quarles RH, Jungalwala FB (1986) Structure of sulfated glucuronyl glycolipids in the nervous system reacting with HNK-1 antibody and some IgM paraproteins in neuropathy. *J Biol Chem* 261:11717-11725

Clark WH (1991) Tumorprogression and the nature of cancer. *Br J Cancer* 64:631-636

Cochran AJ, Wen DR (1986) S-100 protein as a marker for melanocytic and other tumors. *Pathology* 17: 340-348

Dale I, Brandtzaeg P (1989) Expression of the epithelial L1 antigen as an immunohistochemical marker of squamous cell carcinoma of the lung. *Histopathology* 14: 493-502

Doyle LA (1993) Mechanisms of drug resistance in human lung cancer cells. *Semin Oncol* 20:326-337

Duczmal A, Schöllhammer S, Katich S, Ebeling O, Schwartz-Albiets, Altevogt P (1997) The L1 adhesion molecule supports α v β 3-mediated migration of human

tumor cells and activated T-lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 232: 236-239

Ebrahimnejad A, Streichert T, Nollau P, Horst A, Wagener C, Bamberger AM, Brümmer J (2004) CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells. *Am J Pathol* 165:1781-1787

Engers R, Gabbert H (2000) Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:682-692

Ergün S, Kilic N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Götze J, Wurmbach J-H, Horst A, Weil J, Fernando F, Wagener C (2000) CEA-related cell adhesion molecule1: a potent angiogenic factor and major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell* 5:311-320

Ewing J (1928) A treatise on tumors, 3rd edn. W.B. Saunders, Philadelphia. In: Weiss L (1992) Comments on haematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin Exp Metastasis* 10:191-199

Fenlon S, Ellis IO, Bell J, Todd JH, Elston CW, Blamey RW (1987) Helix pomatia and ulex europeus lectin binding in human breast carcinoma. *J Pathol* 152:169-176

Fidler IJ (1970) Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 45: 773-782

Fogel M, Mechtsheimer S, Huszar M, Smirnov A, Abu-Dahi A, Tilgen W, Reichrath J, Georg T, Altevogt P, Gutwein P (2003a) L1 adhesion molecule (CD171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Lett* 189:237-247

Fogel M, Gutwein P, Mechtsheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A, Edler L, Ben-Arie A, Huszar M, Altevogt P (2003b) L1 expression as a predictor of

progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. Lancet 362:869-875

Galea MH, Ellis IO, Bell J, Elston CW, Blamey RW (1991) Prediction of lymph node involvement in breast cancer. Lancet 338:392-393

Giovino G (2002) Epidemiology of tobacco use in the United States. Oncogene 21:7326-7340

Gusterson BA, and the international (ludwig) breast cancer study group (1993) Prognostic value of helix pomatia in breast cancer. Br J Cancer 68:146-150

Gutwein P, Oleszewski M, Mechtersheimer S, Agmon-Levin N, Krauss K, Altevogt P (2000) Role of src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. Biol Chem 275: 15490-15497

Hart IR, Fidler IJ (1980): Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. Cancer Res 40: 2281-2287. In: Hart IR (1982) "Seed and Soil" revisited: mechanisms of site –specific metastasis. Cancer Metastasis Reviews 1:5-16

Huang J, Hardy JD, Sun Y, Shively JE (1999) Essential role of biliary glycoprotein (CD66a) in morphogenesis of the human mammary epithelial cell line MCF10F. J Cell Sci 112:4193-4205

Hubbe M, Kowitz A, Schirmacher V, Schachner M, Altevogt P (1993) L1 adhesion molecule on mouse leukocytes: regulation and involvement in endothelial cell binding. Eur J Immunol 23:2927-2931

Ikeda Y, Mori M, Adachi Y, Matsushima T, Sugimachi K. (1994) Prognostic value of the histochemical expression of the Helix pomatia agglutinin in advanced colorectal cancer. Dis Colon Rectum 37:181-184

Izzy L, Turbide C, Houde C, Kunath T, Beauchemin N (1999) Cis-determinants in the cytoplasmatic domain of CEACAM1 responsible für ist tumor inhibitory function. *Oncogene* 18:5563-5572

Takeji I, Tsujitani S, Mori M, Maehara Y, Sugimachi K. (1991) Helix pomatia binding is a predictor of survival time for patients with gastric carcinoma. *Cancer* 68:2438-2442

Katayama M, Iwamatsu A, Masutani H, Furuke K, Takeda K, Wada H, Masuda T, Ishii K (1997) Expression of neural cell adhesion molecule L1 in human lung cancer cell lines. *Cell Struct Funct* 22:511-516

Kirshner J, Chen CJ, Liu P, Huang J, Shively JE (2003) CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. *Natl Acad Sci* 21:521-526

Kleinerman DI, Troncoso P, Lin SH, Pisters LL, Sherwood ER, Brooks T, von Eschenbach AC, Hsieh JT (1995) Consistent expression of an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) during human prostate development and loss of expression in prostate cancer: Implication of a tumor supressor. *Cancer Res* 55: 1215-1220

Konno A, Hoshino Y, Terashima S, Motoki R, Kawaguchi T (2002) Carbohydrate expression profile of colorectal cancer cells is relevant to metastastic pattern and prognosis. *Clin Exp Metastasis* 19: 61-70

Kowitz A, Kadmon G, Eckert M, Schirmacher V, Schachner M, Altevogt P (1992) Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur J Immunol* 22:1199-1205

Kowitz A, Kadmon G, Verschueren H, Remels L, De Baetselier P, Hubbe M, Schachner M, Schirmacher V, Altevogt P (1993) Expression of L1 cell adhesion

molecule is associated with lymphoma growth and metastasis. Clin Exp Metastasis 11:419-429

Krause T and Turner GA (1999) Are selectins involved in metastasis? Clin Exp Metastasis 17:183-192

Kujat R, Mirgall F, Krause D, Dermietzel R, Wrobel KH (1995) Immunolocalization of the neural cell adhesion molecule L1 in non-proliferating epithelial cells of the male urogenital tract. Histochem Cell Biol 103:311-321

Kunath T, Ordonez-Garcia C, Turbide C, Beauchemin N (1995) Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. Oncogene 11:2375-2382

Laack E, Nikbakht H, Peters A, Kugler C, Jasiewicz Y, Edler L, Hossfeld DK, Schumacher U (2002a) Lectin histochemistry of resected adenocarcinoma of the lung. Helix pomatia agglutinin binding is an independent prognostic factor. Am J Pathol 160:1001-1008

Laack E, Nikbakht H, Peters A, Kugler C, Jasiewicz Y, Edler L, Brümmer J, Schumacher U (2002b) Expression of CEACAM1 in adenocarcinoma of the lung: a factor of independent prognostic significance. J Clin Oncol 21:4279-4284

Leathem AJ and Brooks SA (1987) Predictive value of lectin binding on breast cancer recurrence and survival. Lancet 1:1054-1056

Leavesley DI, Ferguson GD, Wayner EA, Cheresh DA (1992) Requirement of the integrin $\beta 3$ subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. J Biol Chem 117:1101-1107

Levi F, La Vecchia C, Lucchini F, Negri E (1995) Cancer mortality in Europe. 1990-1992. Eur J Cancer Prev 4:389-417

Linnemann D, Raz A, Bock E (1989) Differential expression of cell adhesion molecules in variants of K1735 melanoma cells differing in metastatic capacity. *Int J Cancer* 43:709-712

Lucka L, Fernando M, Grunow D, Kannicht C, Horst A, Nollau P, Wagener C (2005) Identification of lewis x structures of the cell adhesion molecule CEACAM1 from human granulocytes. *Glycobiology* 15:87-100

Luo W, Wood CG, Early K, Hung MC, Lin SH (1997) Suppression of tumorigenicity of breast cancer cells by an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM1): the adhesion and growth suppression are mediated by different domains. *Oncogene* 14:1697-1704

Luo W, Tapolsky M, Earley K, Wood CG, Wilson DR, Logothetis CJ, Lin SH (1999) Tumor-suppressive activity of CD 66a in prostate cancer. *Cancer Gene Ther* 6:313-321

Luo W, Lin SH, Wu WG, Kemp BL, Walsh GL, Hong WK, Mao L (2000) C-CAM1, a candidate tumor suppressor gene, is abnormally expressed in primary lung cancers. *Clin Cancer Res* 6:2988-2993

Martini R, Schachner M (1988) Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Cell Biol* 106:1735-1746

Martini R (1994) Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* 23:1-28

Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, Stoeck A, Oleszewski M, Riedle S, Postina R, Fahrenholz F, Fogel M, Lemmon V, Altevogt P (2001) Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* 155:661-674

Meier F, Busch S, Gast D, Göppert A, Maczey E, Riedle S, Garbe C, Schittek B (2006) The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression. *Int J Cancer* 119:549-555

McCarthy WH, Shaw HM, Milton GW (1978) Spontaneous regression of metastatic malignant melanoma. *Clin Oncol* 4:203-207

Mehta M, Tremont-Lukats IW (2002) Evaluation and management of brain metastasis. *J Clin Oncol (ASCO Educ Book)* 375-382

Montgomery AM, Becker JC, Siu JC, Lemmon VP, Cheresch DA, Pancook JD, Zhao X, Reisfeld RA (1996) Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin $\alpha v \beta 3$. *J Cell Biol* 132:475-485

Moos M, Tacke R, Scheerer H, Teplow D, Fruh K, Schachner M (1988) Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334:701-703

Neumaier M, Paululat S, Chan A, Matthaes P, Wagener C (1993) Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10744-10748

Noguchi M, Thomas M, Kitagawa H, Kinoshita K, Nagamori M, Miyazaki I (1993) Further analysis of predictive value of helix pomatia lectin binding to primary breast cancer for axillary and internal mammary lymph node metastases. *Br J Cancer* 67:1368-1371

Nussbaum ES, Djalilian HR, Cho KH, Hall WA (1996) Brain metastases: histology, multiplicity, surgery and survival. *Cancer* 78:1781-1788

Paget S (1889) The distribution of secondary growth in the cancer of the breast. Lancet 1:571-579 In: Hart IR (1982) "Seed and Soil" revisited: mechanisms of site –specific metastasis. Cancer Metastasis Reviews 1:5-16

Patchell RA (1991) Brain metastases. Neurol Clin 9:817-824

Prall F, Nollau P, Neumaier M, Haubeck HD, Drzeniek Z, Helmchen U, Löning T, Wagener C (1996) CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family , is expressed in epithelium, endothelium and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. J Histchem Cytochem 44:35-41

Riethdorf L, Lisboa BW, Henkel U, Naumann M, Wagener C, Löning T (1997) Differential expression of CD66a (BGP), a cell adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, in benign, premalignant, an malignant lesions of the human mammary gland. J Histochem Cytochem 45:957-963

Rovensky YA (1998) Cellular and molecular mechanisms of tumor invasion. Biochemistry Mosc 63:1029-1043

Ruppert M, Aigner S, Hubbe M, Yagita H, Altevogt P (1995) The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. J Cell Biol 131:1881-1891

Russel DS und Rubenstein LJ (1971) Pathology of the nervous system. Williams&Williams, Baltimore. In: Brain metastasis from melanoma (1983) J of Neuro-Oncology 1:313-317

Sampson JH, Carter JH Jr, Friedmann AH, Seigler HF (1998) Demographics, prognosis, and therapie in 702 patients with brain metastases from malignant melanoma. J Neurosurg 88:11-20

Schachner M (1997) Neural recognition molecules and synaptic plasticity. Curr Opin Cell Biol 9:627-634

Schneeberger A, Strohal R, Stingl G (2004) Das maligne Melanom. In: Hiddemann W, Huber H, Bartram R (2004) Die Onkologie Teil 2, Springer-Verlag, pp1554-1601

Schumacher U, Kretzmar H, Brooks SA, Leathem AJ (1992) Helix pomatia lectin binding pattern of brain metastases originating from breast cancers. *Pathol Res Pract* 188:284-286

Schumacher U, Higgs D, Loizidou M, Pickering R, Leathem A, Taylor Y (1994) Helix pomatia agglutinin binding ist a useful prognostic indicator in colorectal cancer. *Cancer* 74:3104-3107

Schumacher U, Adam E, Brooks SA, Leathem AJ (1995) Lectin binding properties of human best cancer cell lines and human milk with particular reference to helix pomatia agglutinin. *J Histochem Cytochem* 43:275-281

Schumann D, Chen CJ, Kaplan B, Shively JE (2001) Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton proteins actin and tropomyosin. *JBC* 276:47421-47433

Shiraishi T, Atsumi S, Yatani R (1992) Comperative study of prostatic carcinoma bone metastases among japanese in japan and japanese americans and whites in hawaii. *Adv Exp Med Biol* 324:7-16

Sienel W, Dango S, Woelfle U, Morresi-Hauf A, Wagener C, Brümmer J, Mutschler W, Passlick B, Pantel K (2003) Elevated expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes progression of non-small lung cancer. *Clin Cancer Res* 9:2260-2266

Siitonen SM, Kononen JT, Helin HJ, Rantala IS, Holli KA, Isola JJ (1996) Reduced e-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 105:394-402

Singer BB, Scheffrahn I, Öbrink B (2000) The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation. *Cancer Res* 60: 1236-1244

Stocks SC, Albrechtsen M, Kerr MA (1990) Expression of the CD15 differentiation antigen (3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine, Le^x) on putative neutrophil adhesion molecules CR3 and NCA-160. *Biochem* 268:275-280

Thies A, Moll I, Berger J, Schumacher U (2001a) Lectin binding to cutaneous malignant melanoma: HPA is associated with metastasis formation. *Br J of Cancer* 84:819-823

Thies A, Pfüller U, Schachner M, Horny H-P, Moll I, Schumacher U (2001b) Binding of mistletoe lectins to cutaneous malignant melanoma: implications for prognosis and therapy. *Anticancer Res* 21:2883-2888

Thies A, Moll I, Berger J, Wagener C, Brümmer J, Schulze H-J, Brunner G, Schumacher U (2002a) CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J Clin Oncol* 20-2530-2536

Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U (2002b) Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer* 38:1708-1716

Thies A, Berlin A, Brunner G, Schulze H-J, Moll I, Pfüller U, Wagener C, Schachner M, Altevogt P, Schumacher U (2006) Glycoconjugate profiling of primary melanoma and its sentinel node and distant metastases: implications for diagnosis and pathophysiology of metastases. *Cancer Lett* 248:68-80

Thomas M, Noguchi M, Fonseca L, Kitagawa H, Kinoshita K, Miyazaki I (1993) Prognostic significance of helix pomatia lectin and c-erbB-2 oncoprotein in human breast cancer. *Br J Cancer* 68:621-626

Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W (1991) Carcinoembryonic gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 5:344-366

Thor G, Probstmeier R, Schachner M (1987) Characterization of the cell adhesion molecules L1, N-CAM and J1 in the mouse intestine. *EMBO J* 6:2581-2586

Tuszynski GP, Wang TN, Berger D (1997) Adhesive proteins and the haematogenous spread of cancer. *Acta Haematol* 97:29-39

Uhlenbruck G (1979) Immunologische und klinisch-diagnostische Studien an Tumor-assoziierten Antigenen. Opladen: Westdeutscher Verlag. In: Uhlenbruck G (1981) Lektine, Toxine und Immunotoxine. *Naturwissenschaften* 68:606-612

Valentiner U, Hall DMS, Brooks SA, Schumacher U (2005) HPA binding and metastasis formation of human breast cancer cell lines transplanted into severe combined immunodeficient (scid) mice. *Cancer Lett* 219:233-242

Walker RA (1993) Helix pomatia and breast cancer. *Br J Cancer* 68 :453-454

Weiss L (1992) Comments on haematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin Exp Metastasis* 10:191-199

Yoshida Y, Okamura T, Shirakusa T (1993) An immunohistochemical study of helix pomatia agglutinin binding on carcinomas of the oesophagus. *Surg Gynecol Obstet* 177:299-302

Zetter BR (1993) Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 4: 219-229

Zielinski C, Possinger K, Kiechele M (2004) Das Mammakarzinom. In: Hiddemann W, Huber H, Bartram R (2004) Die Onkologie Teil 2, Springer-Verlag, pp 1012-1055

Zöller M, Wittig B (2004) Zellinvasion und Metastasierung. In: Hiddemann W, Huber H, Bartram R (2004) Die Onkologie Teil 1, Springer-Verlag, pp 326-354

7. Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. U. Schumacher für die Überlassung des Themas und die Erlaubnis, die Einrichtungen des Anatomischen Institutes II nutzen zu dürfen. Desweiteren möchte ich ihm für seine persönliche Betreuung und seine herzliche Art danken.

Für die freundliche Erlaubnis, histologisches Material aus ihren jeweiligen Instituten verwenden zu dürfen sowie die Erlaubnis zur Einsicht in die Patientendaten, danke ich: Frau Professor Dr. I. Moll, Herrn Professor Dr. U. Helmchen, Herrn Professor Dr. T. Löning und Herrn Professor Dr. C. Hagel.

Für die freundliche Überlassung der Antikörper danke ich Herrn Professor Dr. C. Wagener und Herrn Professor Dr. P. Altevogt.

Frau Dr. A. Thies möchte ich herzlichst für die vielen Anregungen und Hilfestellungen danken.

Für die jederzeit vorhandene Unterstützung bei der technischen Durchführung der Arbeit und der Unterstützung bei Laborarbeiten sowie der Erklärung der Lektin- und Immunhistochemischen Färbemethoden möchte ich ganz besonders danken:

Frau Maike Märker, Frau Renate Gehrcke, Frau Tjandra Coellen, Frau Susanne Feldhaus, Frau Christiane Knies und Herrn Klaus Siebert.

Frau Hroswitha Gagliardi-Schellhaus möchte ich für ihre freundliche Hilfsbereitschaft danken.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katharina Schmitz
Wohnort	Hamburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

August 1987 - Juli 2000	Rudolf-Steiner-Schule-Bergedorf, Hamburg
Oktober 2000 - heute	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
März 2003	Physikum

Berufspraktika

August 2006 - Juli 2007	Praktisches Jahr: I. Tertial: Neurologische Abteilung der Asklepios Klinik St.Georg II. Tertial: II. Medizinische Abteilung der Asklepios Klinik Altona III. Tertial: Chirurgische Abteilung der Schön Klinik Eilbek
-------------------------	--

9. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.