

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF
ZENTRUM FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN**

Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

(Direktor: Prof. Dr. med. Udo Schumacher)

**Die Bedeutung der Zelladhäsionsmoleküle CEACAM 1,5,6 als
Malignitätsfaktoren beim duktalem Pankreasadenokarzinom in
einem Xenograftmausmodell**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Jennifer Sarah Horst aus Lübeck, Deutschland

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:
16.06.2016**

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

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

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:
Dr. Karin Milde-Langosch**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:
Prof. Dr. Maximilian Bockhorn**

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	6
1.1 Fragestellung und Hypothese.....	6
1.2 Funktion, Anatomie und Histologie des Pankreas	7
1.2.1 Funktion des Pankreas	7
1.2.2 Anatomie des Pankreas.....	7
1.2.2.1 Abschnitte, Form und Lage des Pankreas.....	7
1.2.2.2 Gefäßversorgung und Innervation des Pankreas	7
1.2.3 Histologie des Pankreas	8
1.2.3.1 Histologischer Aufbau.....	8
1.2.3.2 Exokrines Pankreas.....	9
1.2.3.3 Endokrines Pankreas.....	9
1.3 Pankreastumoren	10
1.3.1 Histologien der Pankreastumoren	10
1.3.2 Pathologien des Pankreas, das duktales Adenokarzinom	10
1.3.3 Epidemiologie	11
1.3.4 Ätiologie und Pathogenese.....	12
1.3.5 Klinik	13
1.3.6 Molekularpathologie.....	14
1.3.7 Stadieneinteilung	14
1.3.8 Diagnostik	15
1.3.9 Therapie.....	16
1.3.9.1 Chirurgische Therapie	16
1.3.9.2 Adjuvante Chemotherapie	19
1.3.9.3 Palliative Therapie	21
1.4 Biologie der Zelladhäsionsmoleküle und CEACAM.....	23
1.4.1 Zelladhäsionsmoleküle	23
1.4.2 Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin- Superfamilie	23
1.4.3 Die CEACAM Familie	23
1.4.3.1 Die CEACAM Familie- Einleitung, Entdeckung, Nomenklatur	24
1.4.3.2 Struktur und Aufbau der CEACAMs	25
1.4.3.3 Das Expressionsmuster und Vorkommen der CEACAMs	26
1.4.3.4 Die Dysregulation der Expression der CEACAMs	28
1.4.3.5 Die Biologischen Funktionen der CEACAMs.....	29
2. Material und Methoden	37
2.1 Materialien	37
2.1.1 Geräte.....	37

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Glaswaren.....	39
2.1.3 Medikamente, Enzyme, Chemikalien und Färbemittel	40
2.1.5 Immunglobuline	43
2.1.6 Allgemeine Lösungen, Färbungen, Puffer und Nährmedien	44
2.1.7 Zellen.....	47
2.1.8 Immundefiziente Tiere	48
3.1.9 Gewebeproben	48
2.2 Methoden.....	49
2.2.1 Zellbiologische Methoden	49
2.2.1.1 Allgemeine Zellkultur und Rekultivierung der Zellen.....	49
2.2.1.3 Mykoplasmentest.....	49
2.2.2 Tierhaltung, Versuchsdurchführung und Gewebegewinnung.....	49
2.2.2.1 Tierhaltung.....	49
2.2.2.2 Subkutane Injektion	50
2.2.2.3 Erfassung und pathologisch- anatomische Untersuchung der Versuchstiere.....	51
2.2.3.1 Histologische Aufbereitungen der Gewebeproben	51
2.2.3.2 Färbungen	52
2.2.3.2.1 Hämatoxylin- Eosin (H.E.) Färbung	52
2.2.3.2.2 Immunhistologische Färbungen.....	53
2.2.3.3 Auswertung der Schnittpräparate	57
2.2.4 PCR- Bestimmung disseminierter Tumorzellen im Blut.....	57
2.2.4.1 DNA Isolierung aus EDTA Blut.....	57
2.2.4.2 PCR	57
2.2.4.3 Anfertigung der Proben für die Standardkurve	57
2.2.4.4 Ansatz des Mastermixes.....	58
2.2.4.5 Light Cyler Protokoll.....	58
2.2.3 Statistische und graphische Auswertung.....	59
3. Ergebnisse	60
3.1 Auswertung des subkutanen Injektionsversuchs.....	60
3.2 Gesamtversuch chronologisch	61
3.3 Anwachsrate des stetigen Tumorwachstums	62
3.4 Analyse des Tumorgewichts.....	63
3.5 Analyse der Überlebenszeit.....	65
3.6 Histopathologische Auswertung	66
3.6.1 Makroskopische Beurteilung.....	66
3.6.2 Hämatoxylin- Eosin Färbung	69

3.6.3 CEACAM 1 Färbung	70
3.6.4 CEACAM 5 Färbung	72
3.6.5 CEACAM 6 Färbung	74
3.6.6 Auswertung der Lungenschnitte	75
3.7 PCR Auswertung disseminierter Tumorzellen	76
4. Diskussion	77
5. Zusammenfassungen.....	85
5.1 Deutsche Zusammenfassung	85
5.2 English Summary	87
6. Abkürzungsverzeichnis	89
7. Literaturverzeichnis	98
8. Danksagung	116
9. Tabellarischer Lebenslauf	117
10. Eidesstattliche Versicherung	118

1. Einleitung

1.1 Fragestellung und Hypothese

Das Pankreaskarzinom ist eine Tumorerkrankung des Menschen mit äußerst schlechter Prognose und stellt daher eine deutliche therapeutischer Herausforderung dar. Auf der Suche nach neuen Therapien müssen die biologische Grundstruktur und Malignitätsfaktoren des Tumors verstanden werden, um potentielle Angriffsziele für mögliche Therapien zu detektieren.

Ziel dieser Dissertation ist es, den Einfluss von CEACAM auf die biologische Funktion des Tumorprogresses und des metastatischen Verhaltens beim Adenokarzinom des Pankreas zu untersuchen. Hierbei wird eine Verstärkung der Malignitätsfähigkeit des Tumors bei erhöhter CEACAM Expression erwartet.

Im vorliegendem Projekt soll die Pankreaskarzinomlinie PaCa 5061 mit stark reduziertem, bis fehlendem CEACAM 1,5,6 hergestellt werden, die für den Xenotransplantationsversuche einsetzbar sind. In einem pfp-rag2 Mausmodell, soll der Effekt des CEACAM Knockdowns (CEACAM- Klon) mit dem der Transfektions-Kontrolle (LUC) und dem Wildtyp (PaCa 5061) in Bezug auf Proliferationsverhalten des Tumors und Metastaseneigung verglichen werden. In dem in vivo Xenograftmodell sollen folgende Fragen untersucht werden:

Gibt es ein verlängertes Gesamtüberleben der CEACAM- Knockdowngruppe?

Ist die histologische Struktur der verschiedenen Tumorgruppen makroskopisch oder mikroskopisch unterscheidbar?

Gibt es unterschiedliche Invasivitätsgrade der Tumorgruppen?

Kann man unterschiedliche Metastasierungsgrade der Versuchsgruppen detektieren?

Kann hierbei eine Dysfunktion oder eine Überexpression von CEACAM als Oberflächen- und Adhäsionsmolekül zur Verstärkung der Malignität und Fernaussaat der Tumorzellen verhelfen?

Gibt es eine Verbindung zu anderen Tumorproliferationsfaktoren?

Eignet sich CEACAM als prognostischer Faktor, Verlaufsparemeter oder Tumormarker?

Kann CEACAM als neuer Ansatz für eine Targettherapie des Pankreaskarzinoms fungieren?

1.2 Funktion, Anatomie und Histologie des Pankreas

1.2.1 Funktion des Pankreas

Das Pankreas ist sowohl eine exokrine als auch eine endokrine Drüse: Der exokrine Anteil des Pankreas (98 % der Organmasse) produziert pro Tag 1,5 - 2 l Verdauungssekret (ca. pH 7-8), welches aus Bikarbonat zur Alkalisierung des sauren, aus dem Magen kommenden Chymus und Verdauungsenzymen besteht. Die meisten Enzyme werden als inaktive Vorstufen sezerniert und erst durch die Enterokinase im Duodenumepithel aktiviert. Die Enterokinase spaltet Trypsinogen und die entstandene Protease Trypsin aktiviert daraufhin die anderen wichtigen Vorläuferenzyme, z.B. α -Amylase, zur Spaltung von Kohlenhydraten und Lipase zur Fettsplaltung (Aumüller et al. 2010, Schünke et al. 2005).

Der endokrine Anteil des Pankreas (ca. 2 % der Organmasse) besteht aus den über 1 Million Langerhans- Inseln, die in ihrer Gesamtheit als Inselorgan bezeichnet werden. Die Hauptfunktion des Inselorgans besteht aus der endokrinen Regulation des Glukosestoffwechsels durch die Produktion von Insulin, Glukagon, Somatostatin und Pankreatisches Polypeptid in verschiedenen Zelltypen, welche bei Bedarf durch spezifische Reize aus den Sekretgranula entleert werden (Aumüller et al. 2010, Schünke et al. 2005).

1.2.2 Anatomie des Pankreas

1.2.2.1 Abschnitte, Form und Lage des Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse ist 13 -18 cm lang und wiegt 70 - 80 g. Das längliche, leicht geschwungene Organ befindet sich im Oberbauch und liegt sekundär retroperitoneal an der hinteren Bauchwand und zieht von der konkaven Seite des Duodenums nach links bis zur Milz. Die Bauchspeicheldrüse gliedert sich makroskopisch in Kopf (Caput), Körper (Corpus) und Schwanz (Cauda). Der Pankreaskopf liegt im Duodenalbogen. Der Pankreaskörper liegt auf der Höhe von LWK I-II. Während die dorsale Seite des Pankreas mit der dorsalen Bauchwand verwachsen ist, wird die ventrale Seite von Peritoneum überzogen und bildet somit die dorsale Wand des Bursa omentalis. Der Pankreasschwanz verjüngt sich und zieht bis an die Milz (Aumüller et al. 2010, Schünke et al. 2005).

1.2.2.2 Gefäßversorgung und Innervation des Pankreas

Die arterielle Versorgung des Pankreas ist komplex. Die Bauchspeicheldrüse wird von der Aorta ausgehend über den Truncus coeliacus und der A. mesenterica superior versorgt, welche durch die A. pancreaticoduodenales inferior den R. anterior und den

1. Einleitung

R. posterior abgibt und Caput und Teile des Corpus versorgt. Über den Truncus coeliacus wird die Cauda über die A. splenica durch die A. pancreatica magna und Rr. pancreatici gespeist. Der Caput und Corpus erhalten durch den Truncus coeliacus über die A. hepatica communis, der A. gastroduodenalis ihre A. pancreaticoduodenalis superior anteriore und posteriore Anteile, welche mit den Rami aus der A. pancreaticoduodenalis anastomosieren. Innerhalb der Langerhans'schen Inseln erweitern sich die pankreatischen Kapillarnetze zu Sinusoiden (Aumüller et al. 2010, Schünke et al. 2005).

Der venöse Abfluss aus dem Corpus und der Cauda erfolgt über die Vv. pancreaticae in die V. splenica in die Pfortader. Das Blut des Caput gelangt über die Vv. pancreaticoduodenales in die Vena mesenterica superior und anschließend ebenfalls in die Pfortader (Aumüller et al. 2010, Schünke et al. 2005).

Die Lymphe fließen über die Nll. pancreatici superiores et inferiores in die Nll. mesenterici superiores in den Truncus intestinales und über die Nll. pancreaticoduodenalis superiores et inferiores in die Nll. coelici in den Truncus intestinales und von dort aus über die Cisterna chyli in den Ductus thoracicus (Aumüller et al. 2010, Schünke et al. 2005).

Bei der Innervation des Pankreas stammen die sympathischen Fasern aus dem Ganglion coeliacum. Noradrenalin bewirkt dabei an den endokrinen Zellen eine Hemmung der Insulinsekretion.

Die parasympathischen Fasern stammen aus dem Truncus vagalis posterior. Sie fördern über den Transmitter Azetylcholin die Insulinsekretion.

Die sekretorische Leistung wird über die autonome Innervation beeinflusst, die exokrine Funktion wird zwischen den Mahlzeiten gedrosselt, in den postprandialen Phasen sorgt der N.vagus für die Steigerung der Sekretionsrate (Aumüller et al. 2010, Schünke et al. 2005).

1.2.3 Histologie des Pankreas

1.2.3.1 Histologischer Aufbau

Das Parenchym der Bauchspeicheldrüse ist in Lappen und dicht gepackte Läppchen, Lobuli, gegliedert, die durch dünne Bindegewebsstraßen getrennt sind, in welchen Blutgefäße, vegetative Nerven und Lymphgefäße verlaufen. Die Gliederung in Läppchen erlaubt eine Verschiebung des Pankreasgewebes bei unterschiedlichen Füllungszuständen des Magens oder bei Peristaltik von Magen und Darm. Die größeren Gänge sind von kräftigen stützenden Bindegewebschichten umgeben.

1. Einleitung

Regelmäßig treten Vater Pacini Körperchen auf. Das Pankreas wird von einer dünnen Kapsel bedeckt, welche auf der ventralen Seite von Serosa überzogen ist (Welsch et al. 2010, Lüllmann- Rauch 2006).

1.2.3.2 Exokrines Pankreas

Das exokrine Pankreas ist eine rein seröse Drüse, die aus azinösen Endstücken, Azini, und einem umfangreichen Gangsystem besteht. Die Azini sind aus proteinsezernierenden Drüsenzellen aufgebaut, welche durch einen großen, aktiven Kern, reich an rauem Endoplasmatischem Retikulum, großen supranukleären Golgi-Apparat und durch apikalen Sekretionsgranula ausgezeichnet sind. Die einzelnen Drüsenepithelzellen können alle 20 Verdauungsenzyme des Pankreas produzieren, je nach Bedarf kann auch die Menge der einzelnen Enzyme angepasst werden.

Mehrere seröse Azini werden zu einem Azinuskomplex zusammengefasst und drainieren verzweigt in ein Schaltstück. Das Pankreas besitzt keine Myoepithelzellen und keine Streifenstücke. Es ist jedoch gekennzeichnet durch zentroazinöse Zellen, da die Anfangsstücke der Schaltstellen sich in das Zentrum des Azinus stülpen. Die Schaltstücke drainieren über die intralobulären Ausführungsgänge in die interlobulären Ausführungsgänge und schließlich über den Ductus pancreaticus.

Dieser Hauptausführungsgang des Pankreas durchzieht längs das gesamte Organ und hat einen Durchmesser von ca. 2 mm. Er mündet zusammen mit dem von dorsal eintretenden Gallengang, Ductus choledochus, in die von links austretenden Papilla duodeni major in der Pars descendens duodeni. Teilweise existiert ein zusätzlicher Pankreasgang, Ductus pancreaticus accessorius, der in der Papilla duodeni minor in das Duodenum mündet (Welsch et al. 2010, Lüllmann-Rauch 2006).

1.2.3.3 Endokrines Pankreas

Repräsentanten der endokrinen Funktion sind die Langerhans- Inseln. Der netzartige Verband der Epithelzellen wird von zahlreichen Blutkapillaren mit fenestriertem Endothel durchzogen. Zu den vier wichtigsten Zelltypen des Inselorgans gehören B- Zellen, A- Zellen, D- Zellen und PP- Zellen für die Produktion und granulären Speicherung der Inselhormone (Welsch et al. 2010, Lüllmann- Rauch 2006).

1.3 Pankreastumoren

1.3.1 Histologien der Pankreastumoren

Nach der WHO Klassifikation der Pankreastumoren von 2010 unterscheidet man zwischen benignen, malignen Vorstufen, malignen und neuroendokrinen Pankreastumoren. Zu den benignen Pankreastumoren zählt das seröse Zystadenom. Zu den malignen Vorstufen werden pankreatische Intraepitheliale Neoplasien Grad 3 (PanIN- 3) , intraduktale papillär- muzinöse Neoplasie mit niedrigen, intermediären oder hochgradigen Dysplasien, intraduktale tubulo-papiläre Neoplasie und muzinös-zystische Neoplasien mit niedrigen, intermediären oder hochgradigen Dysplasien gezählt.

Zu den malignen Pankreastumoren gehören das duktales Adenokarzinom, das Azinuszellkarzinom, das Azinuszellzystadenokarzinom, die intraduktal papillären-muzinösen Neoplasien mit einem assoziierten invasiven Karzinom, das gemischt azinös- duktales Karzinom, das gemischt azinös- neuroendokrine Karzinom, das gemischt azinös- neuroendokrin- duktales Karzinom, das gemischt duktales neuroendokrine Karzinom, die muzinös- zystische Neoplasie mit einem assoziierten invasivem Karzinom, das Pankreasblastom, das seröse Zystadenocarcinom und die solide pseudopapilläre Neoplasie. Zu den neuroendokrinen Neoplasien gehört das pankreatisch- neuroendokrine Microadenom, der neuroendokrine Tumor (NET), das groß- und kleinzellige neuroendokrine Karzinom, das Enterochromaffin (EC)- Zell Serotonin produzierende neuroendokrine Tumor Karzinoid, das Gastrinom, das Glucagonom, das Insulinom, das Somatostatinom und das VIPnom (vasoaktive intestinale Peptide). Es können zudem Teratome, mesenchymale Tumoren, Lymphome und sekundäre Tumoren im Pankreas auftreten (Bosmann et al. 2010).

1.3.2 Pathologien des Pankreas, das duktales Adenokarzinom

Das duktales Adenokarzinom mit allen Untergruppen ist der häufigste Tumortyp des Pankreas (Böcker et al. 2008). Im Pankreas finden sich teilweise Vorstufen der Neoplasien, die sogenannten PanIN, pankreatische intraepitheliale Neoplasien, welche auf eine drohende Entartung hinweisen können. Während eine PanIN, Grad 1 keine Zellatypien jedoch Zellvergrößerung erkennen lässt, kann man bei PanIN Grad 2 und Grad 3 den Übergang in ein auf das Gangepithel beschränktes Karzinom, carcinoma in situ, erkennen. Die letzteren 2 Formen entarten häufiger bzw. schneller.

Das duktales Adenokarzinom kann histologisch noch in folgende Subtypen unterteilt werden: das adenosquamöse Karzinom, das kolloid muzinös- nicht zystische Karzinom, das hepatoide Karzinom, das medulläre Karzinom, das Sichelzell-

1. Einleitung

Karzinom, das undifferenzierte Karzinom, das undifferenzierte Karzinom mit Osteoklasten ähnlichen Riesenzellen (Bosmann et al. 2010).

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist ein hoch maligner, epithelialer Tumor, dessen atypische Drüsenformation in Form und Funktion die mittelgroßen und kleinen Pankreasgänge imitiert. Der Tumor tritt bevorzugt im Pankreaskopf, bis zu 80 %, auf. Er ist unscharf begrenzt und besitzt eine feste, graugelbe Konsistenz. Im Pankreaskopf kommt es häufig zu einer tumorbedingten Stenose des D. choledochus oder des D. pancreaticus und teilweise einer Infiltration der Duodenalwand. Das histologische Bild wird geprägt durch atypisch, zumeist mittelmäßig bis schlecht differenzierte, gangartige Drüsenstrukturen mit Schleimproduktion. Die Tumorzellen präsentieren sich kubisch und besitzen einen runden Zellkern mit deutlichem Nukleolus. Diese atypischen, pathologischen Drüsenabschnitte infiltrieren das gesunde Organ und induzieren eine Bindegewebsbildung. Die wichtigsten histologischen Varianten des duktales Adenokarzinoms sind das adenosquamöse Karzinom und das anaplastische Karzinom (Böcker et al. 2008, Bosmann et al. 2010). Die Tumoren breiten sich frühzeitig lymphogen und perineural im retroperitonealen, peripankreatischen Fettgewebe aus. Die ersten Metastasen finden sich in den regionalen Lymphknoten und in der Leber. Tumoren im Pankreaskörper und Pankreasschwanz sind bei Diagnosestellung zumeist größer als Pankreaskopftumoren, da die klinischen Symptome erst verspätet eintreten und haben häufig schon zu Lebermetastasen oder einer Peritonelakarzinose geführt (Böcker et al. 2008, Bosmann et al. 2010).

1.3.3 Epidemiologie

Die epidemiologischen Daten stammen aus dem online Krebsregister für Deutschland des Robert Koch Instituts für das Jahr 2010.

2010	Männer	Frauen
Anzahl Neuerkrankungen	8.020	8.060
standardisierte Erkrankungsrate*	13,8	10,0
Sterbefälle	7.537	7.950
standardisierte Sterberate*	12,8	9,5
5-Jahres-Prävalenz	7300	7400
Relative 5- Jahres Überlebensrate	8%	8%

Tab. 1: Epidemiologische Daten des Pankreaskarzinoms 2010:

Dargestellt sind die Daten des Robert Koch Instituts zu Neuerkrankungen und Sterbefälle des Pankreaskarzinoms bei Männern und Frauen im Jahre 2010, ebenso die standardisierte Erkrankungsrate und Sterberate *je 100.000 Personen, altersstandardisiert nach Europastandard. Die 5 Jahres Überlebensrate ist bei Männern und Frauen 8% und zeigt den Ausmass der Aggressivität und Letalität des Tumors.

Quelle:

http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html

1. Einleitung

Laut der DKB, der deutschen Krebs Gesellschaft, ist das Pankreaskarziom die 8- häufigste maligne Neuerkrankung bei Männern in Deutschland 2006 und der dritthäufigste Tumor des gastrointestinalen Trakts. Bei den Frauen ist das Pankreaskarzinom laut der DKB ebenfalls an 3. Stelle der gastrointestinalen Tumoren und an 9. Stelle der malignen Neuerkrankungen von Frauen in Deutschland 2006 (<http://www.krebsgesellschaft.de/krebshaeufigkeit,11267.html>).

1.3.4 Äthiologie und Pathogenese

Zigarettenrauchen, übermäßiger Alkoholkonsum, chronische Pankreatitis, Übergewicht, Diabetes mellitus Typ 2 und fraglich geräucherte und gegrillte Nahrung gehören zu den Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms. Zu den protektiven Faktoren zählen körperliche Bewegung, Gewichtsreduktion, fraglich sind hierbei die Aufnahme von Vitamin C haltiger Nahrung und Obst-, Gemüse- und Hülsenfruchtkonsum (Adler et al. 2007, Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Zudem existieren hereditäre Syndrome mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms:

- Peutz- Jeghers- Syndrom (36-42 % Lebzeitrisiko) (Canto et al. 2004, Canto et al. 2006)
 - Hereditäre Pankreatitis
 - Familiäres Pankreaskarzinom (FPC)
 - Familiäres Muttermal und Melanom Syndrom (FAMMM) (17% Lebzeitrisiko) (Giardiello et al. 2000, Rulyak et al. 2003, Lynch et al. 2002, Lim et al. 2004)
 - Pankreas- Melanom- Syndrom
 - Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom
 - Hereditäres non- polypöses kolorektales Karzinom, HNPCC, Lynch Syndrom
 - Familiäre adenomatöse Polyposis FAP
- (Herold et al. 2010, Leitlinienprogramm Onkologie 2013)

Es existieren weitere Syndrome mit fraglich direkt und indirekt erhöhtem Entartungsrisiko:

- Gardner Syndrom
- Hippel Lindau Syndrom
- Fanconi Anämie
- zystischer Fibrose

(Herold et al. 2010, Fauci et al. 2009, Leitlinienprogramm Onkologie 2013)

1. Einleitung

Derzeit keinen Hinweis auf ein erhöhtes Entartungsrisiko gibt es bei:

- Ataxia teleangiectatica
- Neurofibromatose

(Leitlinienprogramm Onkologie 2013)

Bei fast allen Pankreaskarzinomen findet man eine Mutation des k-ras- Onkogens.

Verluste von folgenden Tumorsuppressorgenen spielen ebenfalls eine Rolle:

- p53
- p16, (CDKN2A Gen)
- DPC4
- BRCA2

Wobei die Kombination von k-ras Onkogen und CDKN2A fast nur beim Pankreaskarzinom gefunden wird (Fauci et al. 2009).

1.3.5 Klinik

In der Regel manifestieren sich klinische Symptome erst mit fortgeschrittenen Tumorstadien, was eine frühe klinische Diagnosestellung des Pankreaskarzinoms häufig nicht möglich macht. Zu den Leitsymptomen gehören Schmerzen, schmerzloser Ikterus, Gewichtsverlust und Appetitlosigkeit (Fauci et al. 2009).

Die Schmerzen sind häufig dumpf im Oberbauch, strahlen in den Rücken aus, sie können postprandial verstärkt auftreten und lassen typischerweise beim Vorüberbeugen nach. Sie sind häufiger stärker ausgeprägt bei Karzinomen im Corpus oder der Cauda des Pankreas, welche durch die Dehnung und Invasion in benachbarte Strukturen zu erklären ist, aber meistens auch mit einem bereits inoperablen Stadium verbunden ist. Der Gewichtsverlust ist durch Malabsorptionen, Diarrhöen, Appetitlosigkeit und schnellem Sättigungsgefühl zu erklären. Der Ikterus tritt häufiger bei Tumoren im Pankreaskopf durch die Stenose des Ductus choledochus und die zu folgende Galleabflussstörung auf. Dabei treten die bekannten Begleitsymptome wie Stuhlfärbung, Dunkelfärbung des Urins und genereller Juckreiz auf. In manchen Fällen kann man zusätzlich die prallgefüllte Gallenblase als Tumor im rechten Oberbauch tasten, welches die Patienten als nicht schmerzhaft beschreiben (Courvoisier- Zeichen). Weitere seltenere Symptome sind eine neu aufgetretene, pathologische Glukoseintoleranz, welche teilweise schon 2 Jahre vor Diagnosestellung auftritt und häufig als Neumanifestation eines Diabetes gedeutet wird, chronische Pankreatitiden, Thrombophlebitis migrans (Trousseau Syndrom) und gastrointestinale Blutungen aus Varizen (Fauci et al. 2009).

1. Einleitung

Zu den spätmanifesten, klinischen Symptomen gehören tastbare Metastasen an der Leber, tastbare Peritonealkarzinosen im Douglasraum, Hepatomegalie, Splenomegalie, Aszites und linksseitig supraklavikulär tastbare Lymphknoten (Fauci et al. 2009).

1.3.6 Molekularpathologie

Bei 80 – 90 % der duktaalen Pankreaskarzinome findet sich eine Aktivierung des K-ras Protoonkogens durch die Mutation im Kodon 12. In etwas geringerem Maße sind außerdem die Tumorsuppressorgene p16 (Chromosom 9p), p53 (Chromosom 17p) und DPC4/SMAD4 (Chromosomen 18q) und BRCA2 inaktiviert (Böcker et al. 2008).

1.3.7 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms erfolgt anhand der Klassifikation der American Joint Committee on Cancer (AJCC) im Rahmen der TNM Klassifikation (6. Ausgabe 2010, Bosman et al. 2010).

TNM

- T** Primär Tumor
- TX** Primärtumor kann nicht bewertet werden
- T0** kein Hinweis auf Primärtumor
- Tis** Carcinoma in situ inkl. PanIN -3°
- T1** Tumor begrenzt auf Pankreas, 2 cm oder weniger Durchmesser
- T2** Tumor begrenzt auf Pankreas, mehr als 2 cm Durchmesser
- T3** Tumor ist organübergreifend
- T4** Tumor infiltriert den Truncus coeliacus oder die A. mesenterica superior

N- Regionale Lymphknoten

- Nx** Regionale Lymphknoten können nicht bewertet werden
- N0** keine regionale Lymphknotenmetastasierung
- N1** Regionale Lymphknotenmetastasierung

M- Fernmetastasen

- M0** keine Fernmetastasen
- M1** Fernmetastasen

1. Einleitung

Stadieneinteilung nach UICC

Stadium	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I A	T1	N0	M0
Stadium I B	T2	N0	M0
Stadium II A	T3	N0	M0
Stadium II B	T1, T2, T3	N1	Mo
Stadium III	T4	Jedes N	Mo
Stadium IV	T4	Jedes N	M1

Tab.2.: Stadieneinteilung von Tumoren nach UICC (Fauci et al 2009)

Die klinisch wichtigere Einteilung der Stadien ist jedoch bei der Unterscheidung zwischen Operabilität und potentiell kurativem Stadium (bis Stadium IIb) und nicht operablem, palliativem Stadium (Stadium III und IV), (Fauci et al. 2009).

1.3.8 Diagnostik

Eine Diagnostik des Pankreaskarzinoms ist laut der AWMF- Leitlinien, der Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften, von 2010 durchzuführen. Die AWMF funktionieren seit 1995 in Deutschland als Sachverständigenrat. Sie entwickeln und optimieren die Leitlinien für Diagnostik und Therapie verschiedener Erkrankungen.

Die Diagnostik eines Pankreaskarzinoms ist bei folgenden klinischen Parametern durchzuführen:

- Schmerzloser Ikterus
- Neu aufgetretene Oberbauch- und Rückenschmerzen sollten eine Diagnostik auslösen, die eine Diagnose Pankreaskarzinom erlauben, hierbei wird alters- und schmerzabhängig die Methode gewählt: Sonographie ggf. CT- und Endosonographie.
- Pankreatitis unklarere Genese ab einem Alter von 50
(Adler et al. 2007, Leitlinienprogramm Onkologie 2013))

Die Bestimmung des CA 19-9 ist als Erstdiagnostik ungeeignet und wird erst bei Existenz eines Tumors zur Verlaufsbeobachtung erhoben. Die Sensitivität und Spezifität liegt bei 80 - 90 %, kann jedoch bei Cholestase falsch positiv sein (Fauci et al. 2009).

1. Einleitung

Nach der Basisdiagnostik mit Anamnese und klinischer Untersuchung soll bei Tumorverdacht zunächst als orientierende Untersuchung eine Oberbauchsonographie durchgeführt werden, wobei der Pankreasschwanz durch die Überlagerung vom Darm in der Regel unzureichender zu beurteilen ist. Eine Computertomographie ist einer Sonographie vorzuziehen, da sie nicht durch die Überlagerung des Darms beeinflusst wird und weniger untersuchungsabhängig ist, wobei eine Verbesserung der Sensitivität und Spezifität durch die Multislice- (Mehrzeilen-) CT erreicht wurde. Ein CT kann sowohl die Raumforderung im Pankreas also auch solide Fernmetastasen in der Leber, in Lymphknoten und im Peritoneum darstellen. Das Spiral- CT mit intravenöser Kontrastmittelgabe kann zudem Aufschluss über die Operabilität des Tumors durch die Darstellung der benachbarten Gefäße geben (Fauci et al. 2009, Adler et al. 2007, Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Eine ERCP und MRT mit MRCP sind ebenfalls sinnvolle Bildgebungsmethoden, allerdings zeigen diese nur Gangveränderungen und keine soliden Tumore an. Die Sensitivität und Spezifität beider Methoden ist vergleichbar, allerdings muss beim MRT kein Kontrastmittel gegeben werden, welches weniger Komplikationen zur Folge hat. Es können dafür bei der ERCP Bürstenabstriche der Stenosen des Ductus pancreaticus entnommen und zytologisch ausgewertet werden. Allerdings ist eine ERCP deutlich invasiver und es kann zu Komplikationen wie beispielsweise Perforationen und Verletzungen des gastrointestinellen Traktes kommen. Die Endosonographie ist hilfreich bei kleineren Läsionen unter 2 - 3 cm, also bei Patienten mit operablen Tumorstadien. Mit Hilfe der Endosonographie kann zusätzlich eine Feinnadelpunktion erfolgen, welche zur Sicherung der Diagnose führen könnte (Fauci et al. 2009, Adler et al. 2007, Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1.3.9 Therapie

1.3.9.1 Chirurgische Therapie

Ziel ist die Resektion des Pankreaskarzinoms im Gesunden (R0- Resektion). Bei Patienten bis Stadium IIb, ohne nachweisliche Fernmetastasen im Röntgen Thorax oder CT, kann vom kurativen Ansatz gesprochen werden. Eine ausschließliche Chemotherapie, Radiochemotherapie oder Strahlentherapie sollen bei Patienten mit als resektabel eingeschätztem Pankreaskarzinom nicht durchgeführt werden. Das Alter der Patienten sollte kein Kriterium zum Ausschluss der operativen Therapie sein. Komorbiditäten können jedoch zum Verzicht der Operation führen. Eine perioperative Antibiotikaprophylaxe sollte immer erfolgen, hierbei sollte die Prophylaxe

1. Einleitung

unterschiedslos zwischen Patienten mit oder ohne STENT erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Die Staging-Laparoskopie kann bei als resektabel eingeschätzten Pankreaskarzinomen fakultativ eingesetzt werden, insbesondere bei klinischem Verdacht auf Peritonealkarzinose oder bei Vorliegen von signifikantem Aszites. Bei fehlendem Nachweis von Peritonealmetastasen in einer diagnostischen Laparoskopie sollte keine Spülung zur Zytologiegewinnung durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Trotz der Infiltration der Nachbarorgane, extrahepatischer, lokaler Manifestation oder der V. porta und V. mesenterica kann man eine R0 Resektion erlangen. Bei Infiltration des Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior durch den Primärtumor sollte keine Resektion des Primärtumors durchgeführt werden. Eine Infiltration der V. portae und / oder der V. mesenterica superior oder V. lienalis sollte nicht als Ausschlusskriterium für eine Resektion gesehen werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Definition grenzwertig resektabler Tumore anhand der NCCN Guidelines (Callery et al 2009)

- keine Fernmetastasen
- Infiltration der V. mesenterica superior bzw. der Pfortader, entsprechend einem direkten Kontakt des Tumors mit oder ohne Stenosierung des Gefäßlumens in der Bildgebung
- Encasement der V. mesenterica superior bzw. der Pfortader ohne gleichzeitiges Encasement der nahegelegenen Arterien
- kurzstreckiger venöser Gefäßverschluss durch einen Tumorthrombus oder ein Encasement des Tumors, aber mit geeigneten Gefäßen proximal und distal des Gefäßverschlusses, die eine sichere Resektion und Rekonstruktion erlauben
- Encasement der A. gastroduodenalis bis zur A. hepatica mit entweder kurzstreckigem Encasement oder direktem Kontakt zur A. hepatica, aber ohne Ausdehnung bis zum Truncus coeliacus
- Ummauerung der A. mesenterica superior bis max. 180° der Gefäßzirkumferenz (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Die Resektion des Primärtumors sollte im Falle des Nachweises von Fernmetastasen eines duktales Pankreaskarzinoms (Organmetastasen, Peritonealkarzinose, als Fernmetastasen geltende Lymphknotenmetastasen) unterbleiben. Eine präoperative Galleablenkung mittels STENT sollte nur erfolgen, wenn eine Cholangitis vorliegt, es

1. Einleitung

sei denn, die Operation würde nicht zeitnahe nach der Diagnosestellung erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Die Reduktion der pankreasspezifischen Komplikationen durch eine perioperative Somatostatinprophylaxe ist durch eine Metaanalyse randomisierter Studien belegt. Die perioperative Prophylaxe mit Somatostatin kann jedoch nicht regelhaft bei allen Patienten empfohlen werden, da die existierenden Studien uneinheitliche Definitionen der Pankreasfistel mit sich eventuell daraus ergebenden Unterschieden in der Klassifikation postoperativer Komplikationen aufweisen. Aus der intraoperativen Peritoneallavage ergeben sich keine therapeutischen Konsequenzen. Deshalb besteht keine Indikation zur intraoperativen Peritoneallavage mit Zytologiegewinnung (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Bei der Lokalisation des Tumors im Pankreaskopf werden pyloruserhaltende oder magenresizierende Duodenopankreatektomie durchgeführt. Je nach Lage des Tumors wird die sogenannte Whipple Operation durchgeführt, welche durch die Entfernung von Duodenum, Pankreas, Gallenblase inklusives des D. choledochus gekennzeichnet ist. Die Teilresektion des Magens und die Entfernung der Milz werden je nach Infiltration und Lage des Tumors durchgeführt (Müller et al. 2010, Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Im Falle des **Pankreaskopfkarzinoms** beinhaltet die Resektion i. d. R. die partielle Duodenopankreatektomie mit oder ohne Pylorus- Erhalt. In seltenen Fällen kann bei Ausdehnung des Karzinoms nach links eine totale Pankreatektomie notwendig sein. Ggf. sollte im Falle der Infiltration von Nachbarorganen und anderer Strukturen die Resektion entsprechend ausgedehnt werden.

Bezüglich der postoperativen Komplikationen und Letalität sowie der onkologischen Langzeitergebnisse sind beide Verfahren (pyloruserhaltende vs. magenresezierende partielle Duodenopankreatektomie [klassisch]) gleichwertig. Das operative Verfahren bei **Karzinomen des Pankreasschwanzes** ist die Pankreaslinksresektion, ggf. mit Operationserweiterungen. **Pankreaskorpuskarzinome** machen im Allgemeinen eine subtotale Pankreaslinksresektion oder ggf. eine totale Duodenalpankreatektomie erforderlich (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Bei Resektion des Pankreaskarzinoms sollen mindestens 10 regionale Lymphknoten entfernt werden. Bei der Resektion eines Pankreaskarzinoms soll das Verhältnis von befallenen zu insgesamt entfernten Lymphknoten im pathologisch-histologischen Befundbericht angegeben werden. Eine erweiterte Lymphadenektomie sollte nicht durchgeführt werden. Im Falle von erst intraoperativ nachweisbaren Fernmetastasen sollte eine Resektion trotz gegebener Resektabilität unterbleiben (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1. Einleitung

Die Kriterien einer R0-Resektion sind für alle Organumore international einheitlich festgelegt. Die R-Klassifikation berücksichtigt die gesamte Situation eines Patienten. Daher ist für die Beurteilung einer R2-Situation die Information von u.U. in-situ belassenen Metastasen (z.B. Peritoneum) notwendig. Eine R1-Situation bedeutet, dass histologisch Tumorzellen am definitiven Resektionsrand nachgewiesen wurden. Die Angaben der pT- pN und M- Kategorie sowie Tumorgrading sollen im Pathologiebefund mit angegeben werden. Lymphgefäße, Invasion, Perineuralscheideninfiltration und Blutgefäßinvasion sollten Bestandteil der Pathologiebefundung sein (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1.3.9.2 Adjuvante Chemotherapie

ECOG Performance Status

Stadium	ECOG
0	Aktiver Patient, kaum oder keine Krankheitssymptome
1	Eingeschränkt bei körperlich anstrengender Arbeit, aber kann leichte Alltags- und Arbeitstätigkeiten ausführen
2	Ambulante Versorgung, leichte Hilfe zur Eigenversorgung nötig, allerdings nicht arbeitsfähig
3	Schwer behindert, Hospitalisation oder qualifizierte Hilfe benötigt
4	Schwerst krank, kann sich nicht selbst versorgen, gebunden an Bett und Stuhl, intensive medizinische und pflegerische Maßnahmen nötig
5	Tod

Tab.3 ECOG Performance Status:

Der ECOG Performance Status gibt Aufschluss über die Fähigkeit des Patienten im Bezug auf die Eigenständigkeit im Alltag, der eigenständigen Körperpflege und physische Fähigkeit des Patienten, z.B. (Arbeiten, Gehen, Laufen etc.). Der ECOG Performance Status zeigt grob die Gesamtverfassung des Patienten, anhand derer die Therapie adjustiert und die Belastbarkeit verändert werden kann. (Oken et al. 1982)

Nach R0- Resektion eines Pankreaskarzinoms im UICC- Stadium I-III soll eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden, es gibt hierfür generell keine Altersbeschränkungen, hierbei sollte ein ECOG- Performance Status von 0 bis 2 angestrebt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Das mediane Überleben liegt bei bis zu 24 Monaten. Das 5- Jahresüberleben lag in den randomisierten Studien nach adjuvanter Chemotherapie mit Gemcitabin oder 5-FU bei ca. 20 %, während es im Arm mit alleiniger Chirurgie bei ca. 10 % lag: Die Nebenwirkungen der eingesetzten Therapien waren relativ gering, im Bolus-5-FU Arm trat aber mehr Mukositis auf als unter der Gemcitabintherapie (Oettel et al. 2007, Ueno et al. 2009, Neoptolemos et al. 2004, Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1. Einleitung

Die ESPAC 3 Studie, die seit der Erstellung der S3-Leitlinie in 2006 publiziert wurde, hat in einem Phase III Design 5-FU und Gemcitabin als adjuvante Chemotherapie nach Resektion eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas verglichen (Neoptolemos et al 2010). Dabei zeigte sich, dass Gemcitabin und 5-FU, appliziert nach dem Mayo Clinic Bolus-Protokoll, gleichwertige Wirksamkeit haben. Beide Substanzen verbessern signifikant das Gesamtüberleben der Patienten und erhöhen vor allem den Anteil der Patienten signifikant, die 5 Jahre nach Resektion des Pankreaskarzinoms noch am Leben sind. Die Daten zum 5-Jahresüberleben sind bei beiden Protokollen gleich. Allerdings war die Toxizität des Gemcitabinregimes im Vergleich zum 5-FU-Bolus-Protokoll nach dem Mayo-Regime geringer: Unter 5-FU traten signifikant häufiger Grad III/IV mukosale Toxizitäten auf: Stomatitis (10 % vs. 0 %) und Diarrhoe (13 % vs. 2 %). Gemcitabin induzierte häufiger eine Grad III/IV Thrombopenie (1,5 % vs. 0 %) (Oettel et al. 2007, Ueno et al. 2009, Neoptolemos et al. 2010, Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Obwohl für die infusionalen 5-FU Protokolle in der adjuvanten Therapie des Pankreaskarzinoms keine Studien vorliegen, sind wahrscheinlich alle 5-FU Protokolle mögliche Therapieoptionen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Kontraindikationen für eine adjuvante Chemotherapie beim Pankreaskarzinom

- Allgemeinzustand schlechter als ECOG 2
- unkontrollierte Infektion
- Leberzirrhose mit Child B und C
- schwere koronare Herzkrankheit; Herzinsuffizienz (NYHA III und IV)
- präterminale und terminale Niereninsuffizienz
- eingeschränkte Knochenmarksfunktion
- Unvermögen, an regelmäßigen Kontrolluntersuchungen teilzunehmen

Nur bei Gemcitabintherapie:

- bekannte klinisch relevante Einschränkung der Diffusionskapazität (Leitlinienprogramm Onkologie 2013)

Eine adjuvante Chemotherapie oder ein R1- resizierter Pankreastumor sollte möglichst 6 Wochen post-operativ beginnen und möglichst 6 Monate dauern. Da zwei gleichwertige Chemotherapieprotokolle für die adjuvante Therapie zur Verfügung stehen (Gemitabin und 5-FU Bolusgabe), sollte bei Unverträglichkeit gegenüber einem Regime auf das jeweils andere gewechselt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1. Einleitung

Es empfiehlt sich derzeit noch keine adjuvante Radiochemotherapie, intraoperative Radiotherapie, neoadjuvante Strahlentherapie, neoadjuvante Radiochemotherapie oder neoadjuvante Chemotherapie bei resektablen Tumoren außerhalb von Studien (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

Die immuntherapeutischen Targettherapien und Hyperthermiekonzepte sollten außerhalb von prospektiven, kontrollierten Studien in der adjuvanten oder neoadjuvanten Therapie des Pankreaskarzinoms nicht angewendet werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1.3.9.3 Palliative Therapie

Bei metastasierten oder fortgeschrittenen, inoperablen Pankreaskarzinomen besteht eine palliative Indikation einer Chemotherapie. Diese sollte mit Diagnosestellung beginnen. Die Leitlinien empfehlen hier mit einem sofortigem Beginn bei Diagnosestellung, wobei ein ECOG Stadium < 3 angestrebt werden sollte. Hier wird ebenfalls Gemcitabin empfohlen (1000 mg/m² über 30 min) mit dieser Therapie sind 1- Jahresüberlebensraten von 18 - 20 % zu erzielen. 5-FU oder Folinsäure soll nicht als alleinige Erstlinientherapie eingesetzt werden. Alternativ zur Gemcitabin Monotherapie kann eine Kombinationstherapie aus Gemcitabin und dem EGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Erlotinib beim metastasierten Pankreaskarzinom eingesetzt werden, bei Ausbleiben eines Hautausschlages bis 8 Wochen nach Therapiebeginn (Hinweis auf Ansprechen von Erlotinib) sollte die Therapie mit Erlotinib beendet werden. Weitere Kombinationen von Gemcitabin mit sogenannten "Targeted Therapies", oder Targettherapien, wie Cetuximab, Bevacizumab oder Axitinib werden derzeit außerhalb von Studien nicht empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Die Kombination von 5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin nach dem sogenannten FOLFIRINOX-Protokoll kann bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und einem günstigen Risikoprofil (ECOG 0-1, Bilirubinwert unter dem 1,5-fachen des oberen Normwertes, Alter bis 75 Jahre) eingesetzt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Die Kombination von Gemcitabin mit Oxaliplatin, Cisplatin oder Capecitabin sollte nicht als Standard in der Erstlinientherapie des metastasierten oder lokal fortgeschrittenen, inoperablen Pankreaskarzinoms eingesetzt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Ebenso kann der Einsatz molekularer Marker zur Therapiesteuerung aufgrund der aktuellen Evidenzlage nicht empfohlen werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013). Bei Progress unter der Gemcitabine-Monotherapie sollte bei einem ECOG<3 eine Zweitlinientherapie mit 5-FU und Oxaliplatin durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1. Einleitung

Eine palliative Strahlentherapie sollte nur bei symptomatischen Metastasen bzw. Metastasen mit drohender Symptomatik durchgeführt werden (insbesondere Skelett- und zerebrale Metastasen). Ziel ist die Symptomkontrolle oder die Vermeidung von durch Metastasen bedingten Komplikationen (Leitlinienprogramm Onkologie 2013).

1.4 Biologie der Zelladhäsionsmoleküle und CEACAM

1.4.1 Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle auch (CAMs, cell adhesion molecules) sind Transmembranproteine, welche in der Zellmembran verankert sind. Sie vermitteln Wechselwirkungen zwischen Zellen und ihrer Umwelt und leiten Signale in die Zelle hinein oder weiter. Teilweise kommen sie nur in bestimmten Funktionszuständen in Zellen vor. Sie lassen sich biochemisch in 2 Klassen einteilen:

- Calciumabhängige Moleküle
 - Cadherine
 - Selektine
 - Integrine
- Calciumunabhängige Moleküle:
 - Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin Superfamilie

1.4.2 Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin- Superfamilie

Vom Aufbau sind die Zelladhäsionsproteine mit extrazellulären, Immunglobulin-ähnlichen Domänen versehen und haben als allgemeine Funktion den calciumabhängigen Zellkontakt.

Man unterscheidet zwischen zwei Formen

- Vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle VCAMs = interzelluläre Zelladhäsionsmoleküle = ICAMS, die sich auf den Endothelzellen befinden und Integrine auf Leukozyten binden.
- Neurale Zelladhäsionsmoleküle (NCAMs, neuronal cell adhesion molecules), welche von vielen Nervenzellen, aber auch anderen Zellen exprimiert werden. Sie binden an gleichartige NCAMs auf benachbarten Zellen und kommen oft neben den fest bindenden Cadherinen auf der gleichen Zelle vor. Sie spielen ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung und Wundheilung (Welsch et al. 2010).

Neben den immunregulatorischen Funktionen gehören auch Zellerkennung und Adhäsion zu dem Aufgaben- Spektrum dieser Proteine (Williams und Barclay 1988, Brümmendorf und Lemmon 2001, Juliano 2002).

1.4.3 Die CEACAM Familie

CEACAMs, auch CD66, sind Zelloberflächenmoleküle und gehören zur Immunglobulin-Superfamilie. Den Molekülen werden zahlreiche Modulationen von Zellprozessen zugesprochen und sie werden vielfältig in menschlichen Geweben exprimiert (Horst und Wagener 2004).

1. Einleitung

1.4.3.1 Die CEACAM Familie- Einleitung, Entdeckung, Nomenklatur

CEACAMs sind Vertreter der Immunglobulin- Superfamilie der Adhäsionsmoleküle, wobei CEACAM für Carcinoembryonic antigen (CEA)- related adhesion molecules steht. CEA, der erste Vertreter der Gruppe (heute meist eher CEACAM 5 oder seltener CD66e genannt) wurde von Gold und Freedman (1965) in einem humanen kolorektalen Karzinom entdeckt. Zunächst wurde vermutet, dass CEA ein onkofetales Protein darstelle und während eines kanzerogenen Vorgangs reexprimiert würde. Später konnte es jedoch auch in gesunden adulten Geweben nachgewiesen werden. CEA (CEACAM 5) konnte von diversen unabhängigen Untersuchungsgruppen durch Klonierung der cDNA und homologe Sequenzierung der Immunglobulin- Superfamiliengruppe zugeteilt werden (Beauchemin et al. 1987; Oikawa et al. 1987; Paxton 1987; Zimmermann et al. 1987; Schrewe et al. 1990). Zu einer wichtigen Entdeckung für die Klinik wurde es, als man erkannte, dass CEA im Blut bei verschiedenen Krebsarten, wie beispielsweise Colon-, Brust- und Lungenkarzinom, verstärkt nachzuweisen ist. Es fungiert daher als Tumormarker und ermöglicht einen prognostischen Wert in der Therapie und der Verlaufkontrolle von diversen Karzinomen, wobei steigende Serumwerte einen Zuwachs des Tumors wiedergeben und sinkende Serumwerte einen Rückgang des Tumors darstellen (Thompson 1991, Horst und Wagener 2004).

Derzeit sind 29 humane CEA-like-Gene bekannt. Anhand ihrer strukturellen Merkmale, ihrer DNA und Aminosäuresequenz wurden sie in 3 Untergruppen eingeteilt:

- 12 CEA- Gene,
- 11 PSG- Gene (Pregnancy spezific Glycoprotein) und
- 6 Pseudogene.

Die hier verwendete Nomenklatur stammt aus Beauchemin et al. 1999, <http://www.carcinoembryonic-antigen.de/>. Die Regulation der Transkription der Gene wurde in verschiedenen Zelllinien und Gewebe durch Veränderung des hormonalen Status beobachtet: die Gen- Expression kann durch cAMP (Cyclisches Adenosinmonophosphat), Retinoide, Androgene, Östrogene, Glykokortikoide oder Insulin induziert werden. (Svalander et al. 1990, Botling et al. 1995, Hsieh et al. 1995, Daniels et al. 1996, Najjar et al. 1996, Makarovskiy et al. 1999, Phan et al. 2001) Sie reagieren ebenso auf inflammatorische Stimulie wie Interferone, Tumor- Nekrose- Faktoren und Interleukine (Takahashi et al. 1993, Chen et al. 1996, Kammerer et al. 1998, Horst und Wagener 2004).

1.4.3.2 Struktur und Aufbau der CEACAMs

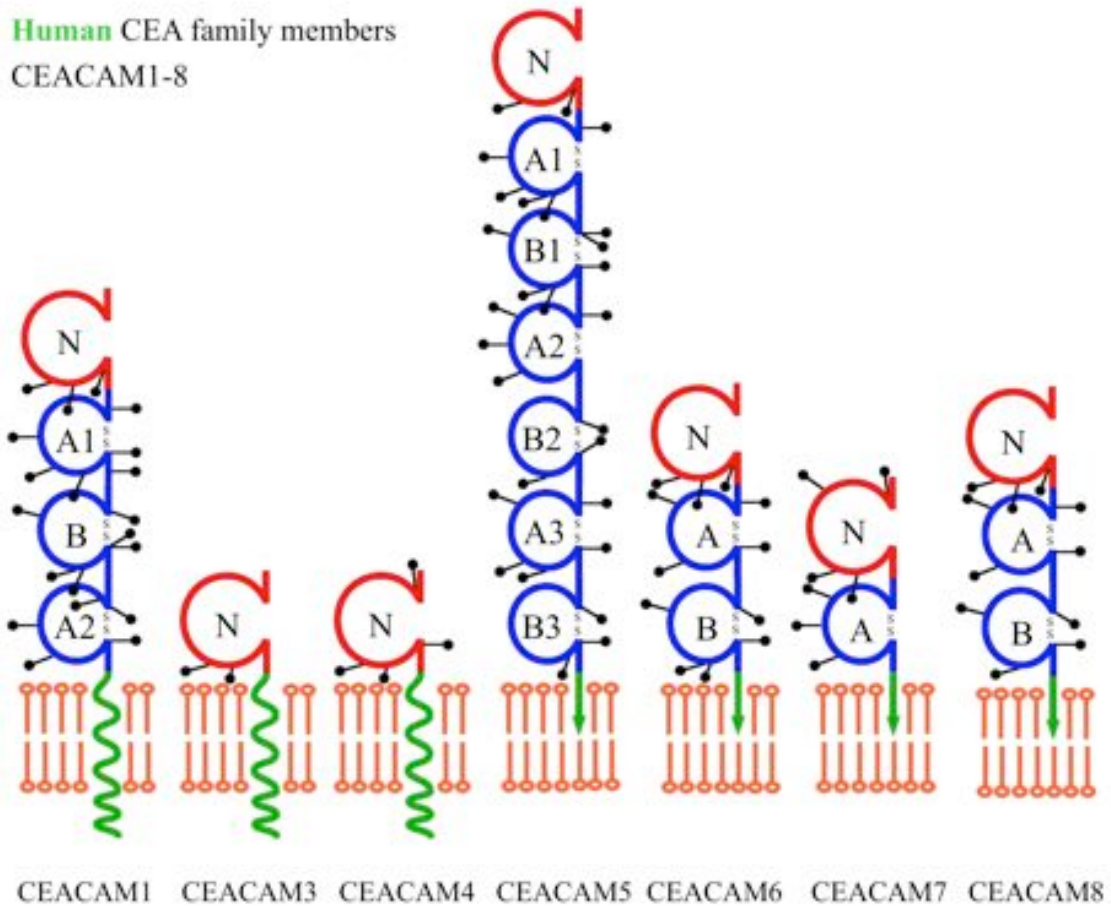











Abb. 1 Struktureller Aufbau von humanen CEACAM 1, CEACAM 3-8:

Dargestellt ist der strukturelle biochemische Aufbau der CEACAM Moleküle 1, 3,4,5,6,7, und 8.

 N-Terminales IgV-ähnliche-Domäne,
  IgC-ähnliche Domäne, A-Untergruppe
  IgC-ähnliche Domäne, B-Untergruppe,
  N-Glykolisierungsstelle,
  GPI-Anker in Lipiddoppelschicht,
  4x20 Aninosäuren

B- Untergruppe,  N- Glykolisierungsstelle,  GPI- Anker in Lipiddoppelschicht,  4x20 Aninosäuren
 Quelle: <http://www.carcinoembryonic-antigen.de/>

CEACAMs besitzen einzigartige strukturelle Eigenschaften, wenn man sie mit den anderen Mitgliedern der Ig- Superfamilie vergleicht. Alle humanen CEA- Subgruppen-Mitglieder haben N-terminal eine IgV- ähnliche Domäne und 0 bis 6 IgC- ähnliche Domänen. Diesen folgen C-terminal ein transmembranöser Anker und darauf ein langer oder kurzer zytoplasmatischer Anhang oder ein glycosylphosphatidylinositol (GPI-) Anker oder, im Fall einer löslichen PSG- Untergruppe, ein kurzer hydrophober Anhang. Die CEA verwandten- Adhäsionsmoleküle sind stark glykolisiert, wobei die Glykane hauptsächlich aus Mannose, Komplex- Typ- Oligosaccharid- ähnlichen Laktosaminoglykanen Typ 1 und Typ 2 bestehen, welche auf Fucosyl- und Sialyl- Resten enden (Odin et al. 1986; Mahrenholz et al. 1993; Stocks et al.1993, Fukushima et al. 1995; Kannnicht et. al. 1999, Sanders und Kerr 1999) Typ 1 und Typ 2 Laktosaminoglykane bilden u. a. die Lewis Blutgruppen- Antigene. Hervorstechende

1. Einleitung

Kohlenhydrat-Anteile von CEACAM 1 und CEA (CEACAM 5) sind Lewis^x und Sialyl-Lewis^x Antigene (Sanders und Kerr 1999). Bei CEACAM 1 beschränkt sich die Präsenz von sogenannten High-Mannose Strukturen auf den Bereich proximal der A2- Domäne (Mahrenholz et al. 1993, Horst und Wagener 2004).

Dreidimensional ähneln sich CEACAM 1 und CEA und andere Repräsentative ihres Ig-Familienkreises (namentlich CD2, CD4, CD8 und Bence Jones Protein REI) in ihrem strukturellen Aufbau (Tan et al. 2002). In strukturellen Analysen zeigte sich, dass der Aufbau der IgC- ähnlichen Domäne in CEACAMs eher einer I- ähnlichen Ig- Faltung gleichen als einer C2- Faltung.

Die N- terminale Domäne der CEA Familie ist außergewöhnlich, welches sich dadurch bemerkbar macht, dass ihre CC' Schleife gebogen ist und sich zurück auf das A'GFCC'C" β - Faltblatt wendet, welches CFG-face genannt wird. Die CFG Strukturen von IgV-ähnlichen Domänen werden auch zum Teil für Zell-Oberflächen Erkennungen genutzt (Stuart et al. 1995, Wang und Springer 1998). Die Vielfalt dieser Region bestimmt die charakteristische homophile oder heterophile Bindung, ebenso des jeweiligen CEACAMs bzw. seine Bindung zu extrazellulären Liganden, Mikroben oder Viren (Horst und Wagener 2004).

1.4.3.3 Das Expressionsmuster und Vorkommen der CEACAMs

Die Expression der CEA Familienmitglieder beginnt in der frühen fetalen Phase bei Nagetieren und bei Menschen ca. im ersten Trimester der Schwangerschaft, wobei die Expression gegen Ende der Embryonalentwicklung zunimmt und ein Leben lang erhalten bleibt, hierbei lässt sich CEA ausschließlich in Geweben nachweisen, welche aus dem Endoderm entstehen. CEACAM 1 und PSGs werden auch vom invasiven Trophoblasten während der Gestation exprimiert (Rebstock et al. 1993, Daniels et al. 1996, Bamberger et al. 2000, Horst und Wagener 2004).

CEACAMs zeigen ein sehr vielfältiges Expressionsmuster und Kreuzreaktionen zwischen diversen anti-CEACAM Antikörpern erschwerten deutlich die Charakterisierung der individuellen Expressionsmuster, bis spezifischere Antikörper entwickelt wurden. Zusammenfassungen der Kreuzreaktionen kann man unter Nap et al. 1992, Schölzel et al.2000, Watt et al. 2001 finden.

Die Expressionsmuster von CEACAM 1, CEACAM 5, CEACAM 6 und CEACAM 7 wurden bisher am ausführlichsten untersucht (Prall et al. 1996, Stanners 1998) und weitere detaillierte Ergebnisse wurden für CEACAM 6 und CEACAM 7 veröffentlicht (Schölzel et al. 2000), wohingegen kaum etwas zu den Expressionsmustern von CEACAM 3, CEACAM 4 und CEACAM 8 bekannt ist.

1. Einleitung

Unabhängig von den verschiedenen Expressionsmustern wurden CEACAMs in 4 verschiedene Gruppen unterteilt:

1. Selektive epitheliale Expressionsmuster: CEA, CEACAM 7 mit deutlich apikaler Expression
2. Expression auf Granulozyten: CEACAM 3, CEACAM 8
3. Weites Expressionsmuster: CEACAM 1, CEACAM 6
4. Predominantes Expressionsmuster in Synzytiotrophoblasten: CEACAM- ps1-11 (PSGs)

CEACAM 1, CEACAM 3 und CEACAM 4 haben eine hydrophobe Transmembran-Domäne, welche von einer kurzen oder langen zytoplasmatischen Domäne gefolgt ist, wohingegen CEACAM 2, CEACAM 5, CEACAM 6, und CEACAM 7 über einen Glycosylphosphatidyl- Inositol- Anker mit der Membran verbunden sind. Das Verteilungsmuster in Menschen und Nagetieren sind sehr ähnlich, wobei es bei den Mäusen 2 CEACAM Gene gibt: CEACAM 1 und CEACAM 2, welche leicht abweichende Expressionsmuster zeigen. CEACAM 1 Genexpression findet man hauptsächlich in Epithelien, Leukozyten und Endothelien, wohingegen CEACAM 2 hauptsächlich in der Niere, Milz und im Hoden exprimiert wird (Robitaille et al. 1999, Han et al. 2001, Horst und Wagener 2004).

CEACAM 1 zeigt das weiteste Expressionsmuster von allen CEACAMs sowohl bei Nagern als auch bei Menschen. Die Expression reicht von diversen Epithelien, z.B. Ösophagus (epitheliale Drüsen Zellen), Magen (schleimproduzierende Zellen des Pylorus), in Epithelien von Duodenum (einschließlich Brunner Drüsen), Jejunum, Ileum und Kolon (hochprismatisches Epithel), des Pankreas (duktale Epithelzellen), Leber (Gallengangsepithel, Gallen-Canaliculi), Gallenblase, in Epithelzellen des proximalen Tubuli der Niere, der Blase, der Prostata, des Zervix, Plattenepithelzellen, des Endometriums, der Hautanhangdrüsen, der Schweiß- und Talgdrüsen. Ebenso findet man es in Granulozyten, Leukozyten (T-, B- Leukozyten und Monozyten), dendritischen Zellen und auf Endothelzellen mancher Organe (Hananberg et al. 1994; Frängsmyr et al. 1995; Prall et al. 1996, Kammerer et al. 1998; Kammerer et al. 2001). Die 2 größten Isoformen CEACAM 1-L und CEACAM 1-S scheinen bisher in allen überprüften Geweben gemeinschaftlich exprimiert zu sein bis auf Brust, Endothel und T-Lymphozyten (Baum et al. 1996, Turbide et al. 1997, Horst und Wagener 2004). CEACAM 5 zeigt ein stärker begrenztes Expressionsmuster, man findet es im Zylinderepithel des Colons, in muzinösen Hals- und Becherzellen, in den muzinösen Zellen des Pylorus, Plattenepithel der Zunge, des Ösophagus, der Prostata und

1. Einleitung

Zervix, als auch in sekretorischen und duktalem Zellen der Schweißdrüsen, ebenso wie in Endothelien (Majuri et al. 1994, Horst und Wagener 2004).

CEACAM 7 wird in einem ähnlichen Verteilungsmuster zu CEACAM 5 im Kolon exprimiert, wird jedoch nicht auf Granulozyten gefunden. Dagegen werden CEACAM 3 und CEACAM 8 von Granulozyten exprimiert, wurden aber bisher nicht auf Epithelien beschrieben.

1.4.3.4 Die Dysregulation der Expression der CEACAMs

CEACAMs sind in diversen Tumoren epitheliale Ursprungs exprimiert, z. B. im kolorektalen Karzinom, Lungen- Adenokarzinom, muzinösem Ovarialkarzinom und im Adenokarzinom des Endometriums. Insgesamt ist die Expression von CEA in Tumoren beschränkter als die von CEACAM 1 und CEACAM 6, welche in Leukämien, hepatozellulärem Karzinom und dem Melanom dysreguliert zu sein scheinen. Im Vergleich zu anderen CEA- Familienmitgliedern, welche in humanen Tumoren hoch- oder herunterreguliert sind, zeigt CEACAM 1 ein eher widersprüchliches Expressionsmuster. Im humanen Kolon, Prostata und hepatozellulären Karzinom beispielsweise wird CEACAM 1 im Vergleich zum gesunden Gewebe herunter reguliert. CEACAM 1 wird hingegen hoch reguliert beim Magenkarzinom, Plattenepithelkarzinomen der Lunge, Pankreaskarzinom oder beim malignen Melanom. Wird CEACAM 1 während der frühen Tumorgenese herunter reguliert, wird meist eine drastische Gewebsstrukturveränderung beobachtet, verursacht durch eine veränderte Polarisation und verändertes Adhäsionsverhalten der Zelle. Diese Veränderungen sind phänotypisch sehr ähnlich zu denen einer Cadherin-Mutation oder dem Funktionsverlust der Expression durch eine maligne Transformation (Birchmeier und Behrens 1994, Bracke et al. 1996). Der Zusammenhang zwischen CEACAM 1 Expression und Zellarchitektur konnte klar gezeigt werden bei hepatischen, kolorektalen und Prostatakarzinomen (Hixson et al. 1985, Nollau et al. 1997, Busch et al. 2002). In deutlichem Gegensatz dazu zeigt sich hingegen in invasiven Melanomen und Adenokarzinomen der Lunge eine Reexpression von CEACAM 1, beim malignem Melanom vor allem an der invasiven Front des Tumors und auch in Fernmetastasen (Laack et al. 2002, Thies et al. 2002, Horst und Wagener 2004). CEACAM 1 fungiert auch als cis-Bindungspartner für Integrin $\alpha\beta_3$ in vielen Epithelien, Endothelien und im malignen Melanom (Brümmer et al. 2001). Da das invasive Potential eines Tumors von den Bindungspartnern abhängig zu sein scheint, ist es daher durchaus wahrscheinlich, dass diese cis-Interaktionen eine Invasion des Tumors begünstigt (Horst und Wagener 2004). Die verminderte Expression von CEACAM 1,

1. Einleitung

beispielsweise beim Kolonkarzinom, wird als Hinweis auf eine massive genetische Änderung während der Tumorentwicklung interpretiert (Neumaier et al. 1993).

1.4.3.5 Die Biologischen Funktionen der CEACAMs

CEACAM als zelluläre Adhäsionsmoleküle

Die biologische Funktion der CEACAMs ist sehr stark auf interzelluläre Adhäsion ausgelegt. Die Bindungen von CEACAMs können dann allogenen oder durch extrazelluläre Liganden spezifische Signalwege induzieren, vor allem über CEACAM 1-L und CEACAM 3-L.

Die gesamte Gruppe (bis auf CEACAM 3, 4 und 7) kann untereinander homophile und heterophile Bindungen eingehen, wobei CEACAM 1, CEA und CEACAM 6 untereinander über heterophile oder homophile Bindungen interagieren, wohingegen für CEACAM 8 bislang nur Bindungen mit CEACAM 6 bekannt sind (Oikawa et al. 1991). Für CEACAM 1 konnten Bindungen zu sich selbst, CEA oder CEACAM 6 durch Einsatz von rekombinantem CEACAM 1 oder heterologen Transfektionen aufgezeigt werden. CEACAM 1 reguliert seine Adhäsion über Dimerisierung, Phosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils, der Calmodulinbindung und der Aktivität der Gewebstransglutaminase (Öbrink 1997, Hunter et al. 1998). Homodimerisierung wurde auch für andere Mitglieder der Ig-Superfamilie und Cadherine beschrieben, wobei eine cis-Formation der Homodimere eine Adhäsion von CEA und Cadherinen verstärkt (Bates et al. 1992, Rao et al. 1994, Sharpio et al. 1995, Nagar et al. 1996, Sun et al. 1996, Alais et al. 2001, Korstrewa et al. 2001, Martin et al. 2001, Horst und Wagener 2004).

Zu den Funktionen der CEACAMs, welche durch homophile Adhäsion vermittelt werden, zählen: die Organisation der Gewebsstruktur während der embryologischen Entwicklung der Darmepithelien, der Hepatozyten, des plazentaren Trophoblasten, während der Myogenese, während der Vaskularisation des zentralen Nervensystems, in Aktivitäten der neutrophilen Granulozyten, in Extravasion während inflammatorischen Prozessen, in der Angiogenese und der Regulation der Zellproliferation (Öbrink et al. 1997, Hammarström et al. 1999, Zimmermann et al. 2002, Horst und Wagener 2004). Beispiele zu den heterophilen Interaktionen von CEACAM-Mitgliedern sind die Adhäsion an E-Selektine, Galektin-3, äußere Membranproteine von *Neisseria gonorrhoea* und *meningitis*, *Haemophilus influenzae*, Fimbrien der *Salmonella typhimurium* und *E. coli* und murine Hepatitis Viren (Horst und Wagener 2004).

CEACAMs Funktion in der Signaltransduktion und Interaktion mit dem Zytoskelett

Die Primärstrukturen der zytoplasmatischen Domäne der CEACAMs von Maus und Mensch zeigt eine hohe Ähnlichkeit. CEACAM 1-L wurde als die Haupt-Splicing Variante von CEACAM 1 in der Signaltransduktion beschrieben. Eine erstaunliche Eigenschaft der CEACAM1-L zytoplasmatischen Domäne liegt im 2 ITIM (immunorezeptor tyrosin based inhibition motif), welche grundlegend für die Regulation der Signaltransduktion durch CEACAM 1-L ist. Diese Einheiten können an Thyrosinresten phosphoryliert werden durch SRC- Kinasen und Wachstumsfaktor-Rezeptor-Tyrosinkinase wie dem Insulin-Rezeptor (IR) und dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) (Philipps et al. 1987). Hierdurch kann CEACAM 1 mit Komponenten des Zytoskeletts interagieren, wie z.B. Aktin, Paxillin und β_3 -Integrin (Ebrahimnejad et al. 2000, Sadekova et al. 2000, Brümmer et al. 2001, Schumann et al. 2001, Horst und Wagener 2004). CEACAM 1-L kann zusätzlich an Serinresten phosphoryliert werden, was die Hemmung von Tumorwachstum bedingen kann (siehe unten). In Bürstensaumzellen des Dünndarmes von Ratten und in Skelettmuskelzellen fand man eine Verbindung zwischen CEACAM 1-L und kortikalem Aktin, dessen Beeinflussung der Organisation und dessen Aufrechterhaltung der Gewebsarchitektur veränderte (Hansson et al. 1989, Da Silva-Azevedo et al. 1999). Man geht davon aus, dass dies durch homophile bzw. heterophile Bindungen zwischen CEACAM 1 Molekülen und Nachbarproteinen passiert (Da Silva-Azevedo et al. 1999, Sadekova et al. 2000). CEACAM 1 interagiert zudem auch mit Tropomyosin nahe der Bindungsstelle des Aktins (Sadekova et al. 2000, Schumann et al. 2001). In Studien mit Adenokarzinomzelllinien konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion mit G-Aktin (globuläres Aktin) von der Thyrosin Phosphorylierung des langen zytoplasmatischen Anhangs von CEACAM 1 moduliert wird (Schumann et al 2001). Eine Assoziation mit F-Aktin (fibrilläres Aktin) kann auftreten, man geht allerdings davon aus, dass dies indirekt stattfindet (Sadekova et al. 2000, Schumann et al. 2001). CEACAM 1-L kommt hauptsächlich apikal und lateral in Epithelzellen vor, z. B. bei Zell-Zell-Kontakten (Sundberg und Öbrink 2002), welches auch durch Sadekova et al. 2000 bestätigt werden konnte. In Mikroinjektionsversuchen wurden CEACAM 1-L und CEACAM 1-S co-exprimiert (Sadekova et al. 2000) mit aktiven Rho-guanosin- Triphosphatasen (GTPasen), welche eine Vielfalt von zellulären Prozessen (wie der Organisation vom Zytoskelett, Transkription von Genen und Adhäsion) beeinflussen (Mackay und Hall 1998). Es zeigte sich, dass die RHO- GTPase für eine Beförderung von CEACAM 1-L an die Peripherie, genauer an Bereiche der Zell-Zellkontakte, benötigt wird (Fournes et al. 2003).

1. Einleitung

Die Splicingvariante CEACAM 1-S hat ebenso interessante Signaltransduktions-Eigenschaften wie Interaktion mit den Zytoskelett Komponenten und Phosphorylierung von Serin- und Tyrosinresten über die Protein Kinase C Isoenzyme (Edlund et al. 1998), allerdings sind die biologische Funktionen dieser Variante bisher noch wenig untersucht. Das Expressionsmuster und die Lokalisation auf den Epithelzellen und Fibroblasten sind eher diffus im Vergleich zu CEACAM 1-L (Sadekova et al. 2000). Zusätzlich wurde Annexin II, ein Regulator der sekretorischen Differenzierung der Brustdrüsenzellen, als intrazellulärer Ligand für CEACAM 1-S identifiziert (Kirschner et al. 2003 b). Es besitzt im Vergleich zu CEACAM 1-L eine leicht veränderte Aktin-Bindungsstelle. Man geht von einem regulatorischen Mechanismus der Aktin-Polymerisation durch CEACAM 1 aus, in dem CEACAM 1-S vermutlich mit G-Aktin interagiert, indem eine G-Aktin Polymerisationsstelle bereitgestellt wird, wobei CEACAM 1-L als Anker-Plattform für die Polymerisation der Aktin-Filamente dienen könnte (Schumann et al. 2001, Horst und Wagener 2004). Die CEACAM 1-4S Variante vermittelt zudem auch Apoptose während der Morphogenese der Brustdrüsen. In Brustkrebs- Zelllinien in 3D- Kultur verändert sich der maligne Phänotyp durch eine Reexpression von CEACAM 1-4S zu einem normalen Phenotyp (Kirschner et al. 2003a, Horst und Wagener 2004).

CEACAM 1 als Tumorsuppressor

Die ersten Hinweise auf eine Hemmung des Tumorzellwachstums durch CEACAM 1 wurden durch das unterschiedliche Expressionsmuster von CEACAM 1 in Hepatomen beobachtet (Hixson et al. 1985). Hierbei entdeckte man in Leberkarzinomzellen einen Verlust der CEACAM 1 Expression im Vergleich zu gesunden Zellen (Tanaka et al. 1997). Später konnte nachgewiesen werden, dass CEACAM 1 ebenso in anderen Tumoren epitheliale Ursprungs herunterreguliert war, sowohl beim Menschen als auch bei Ratten und Mäusen, z.B. in Kolonkarzinomen (Neumaier et al. 1993, Rosenberg et al. 1993, Nollau et al. 1997), Prostatakarzinomen (Kleiner mann et al. 1995a, Pu et al. 1999, Busch et al. 2002), Mammakarzinomen (Riehtdorf et al. 1997, Huang et al. 1998, Bamberger et al. 1998), Endometriumkarzinomen (Bamberger et al. 1998) und Harnblasenkarzinomen (Kleiner mann et al. 1996), was zu der Hypothese führte, dass CEACAM 1 als Tumorsuppressor fungiert. Allerdings fand man ein unterschiedliches Expressionsmuster: Im Anfangsstadien bei der Entwicklung eines Kolonkarzinoms, während des Beginns der malignen Transformation, zeigte sich eine Herunterregulierung und im späteren Stadium von Mikroadenomen oder Adenokarzinom-Stadien eine leichte Erhöhung der Expression (Ilantzis et al. 1997, Nollau et al. 1997). Man identifizierte eine 1 bp- Deletion durch eine Mikrosatelliten Region des humanen

1. Einleitung

CEACAM 1- Genes, für welche ein Zusammenhang mit der Tumorprogression durch eine dramatische Erhöhung der CEACAM 1 Expression vermutet wird (Ruggiero et al. 2003).

Das Antitumor-Potential von CEACAM 1 wurde in Zellkulturen und orthotopen Xenograft- Modellen ausführlich untersucht, wodurch weitere Belege für einen hemmenden Effekt auf das Tumorzellwachstum in Kolon- und Prostata- Karzinomen erbracht wurden (Hsieh et al. 1995, Kleinermann et al. 1995b, Kunath et al. 1995, Luo et al. 1999, Estera et al. 2001). Die Tumorsuppressor Effekte durch CEACAM 1 hängen dabei stark vom Vorkommen des langen zytoplasmatischen Anhangs und dem physiologischem Level der Expression ab, damit die natürliche Funktion erhalten bleibt (Luo et al. 1997, Turbide et al. 1997, Izzi et al. 1999). Der zytoplasmatische Anhang von CEACAM 1-L reguliert suffizient die wachstumsinhibitorische Aktivität, wohingegen CEACAM 1-S diese Funktion nicht besitzt (Turbide et al. 1997). Hierbei wichtige Aminosäuren von CEACAM 1 für die Reduktion des Tumorzellwachstums sind Tyr488, lokalisiert im ITIM, und SER 503 (Izzi et al. 1999, Estera et al. 2001, Fournes et al. 2001). Die Aufhebung der Phosphorylierung an diesen Aminosäuren beeinflusst hierbei die Inhibition des Zellwachstums. Die genauen grundlegenden molekularen Mechanismen der Tumorsuppression durch CEACAM 1 sind immer noch spärlich verstanden (Horst und Wagener 2004).

Ein weiterer Aspekt der Tumorsuppression ist das Phänomen der Kontaktinhibition, welches zum Arrest der zellulären Proliferation führen kann. In einem Zellkultur- Experiment wurde ein Zelllinie von normalem Prostataepithel- mit einer Blasenkarzinom- Zelllinie verglichen, homophile zelluläre Adhäsion durch CEACAM 1 in trans- und dessen Isomer zeigten Unterschiede in ruhenden und proliferierenden Zellen. Wie schon erwähnt, hängt die Fähigkeit von CEACAM 1 mit den Komponenten des Zytoskeletts, src- Kinasen und Tyrosinkinase zu interagieren davon ab, in welcher Isoform es exprimiert ist, von welchem spezifischen Zelltyp es exprimiert wird und ebenso von der Bindung als Dimer. Das empfindliche Gleichgewicht von CEACAM 1-L Monomeren gegenüber den CEACAM 1-L Dimeren reguliert hierbei die Balance zwischen proliferativen oder anti-proliferativen Effekten (Öbrink et al. 2002, Horst und Wagener 2004).

Es sind wenige Beispiele für einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Einfluss der Signaltransduktion eines Adhäsionsmoleküls mit einer Ausbreitung oder erhöhtem Wachstum eines Tumors bekannt. Bekannte Beispiele sind hier E-Cadherine und N-CAM (Birchmeier und Behrens 1994, Cavallaro et al. 2001, Hajra und Fearon 2002). Abgesehen von dem Cadherin-Catenin-Weg wurde eine Membranassoziation zu den Tyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2 bei kontaktinhibitions- vermittelnden Zellen

1. Einleitung

beobachtet. Diese Konstellation wird für den E-Cadherin vermittelten Wachstums Arrest durch p27^{Kip} benötigt, einem Effektor der Cyclin E-abhängigen Kinaseaktivität (Pallen und Tong 1991, St. Croix et al. 1998). Interessanterweise korreliert die CEACAM 1 Expression auf ruhenden, konfluenten Blasenkrebszellen mit der Expression von p27^{Kip} (Singer et al. 2000), wohingegen p27^{Kip} in proliferierenden Zellen herunterreguliert ist. Zusätzlich ist die Expression von CEACAM 1 bei humanem Brustkrebs in Verbindung zu setzen mit der Expression der Tumorsuppressorgene wie RB (Retinoblastom Protein) und p27^{Kip} (Bamberger et al 2002). Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherine und N-CAMs reagieren auf Signale der Wachstumsfaktorrezeptoren wie beispielsweise EGF und dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF). Während der Tumorprogression werden vor allem die adhäsiven Eigenschaften durch diese Faktoren moduliert, bei E-Cadherinen wird die Expression durch die EGF-Rezeptor Aktivierung vermindert (Hazan und Norton 1998, Cavallaro et al. 2001, Al Moustafa et al. 2002). CEACAM 1 ist auch ein Substrat für Wachstumsfaktoren oder reagiert auf deren Stimuli (Philipps et al. 1987, Ergün et al. 2000, Horst und Wagener 2004). CEACAM 1 wird jedoch nicht in allen Tumoren herunterreguliert, es kann auch hochreguliert werden in bestimmten Tumoren, wie bereits erwähnt. CEACAM 1 Expression korreliert zudem auch mit der β_3 - Integrin Expression in regulierten und dysregulierten invasiven Prozessen wie der Trophoblasten Invasion und Progression des malignen Melanoms (Bamberger et al. 2000, Thies et al. 2002). Der Einfluss von vermuteten Interaktionspartnern mit CEACAM 1 in cis und trans auf dessen invasiven Charakter in Primärtumoren wurde bisher noch nicht bis ins Detail erforscht, es wurde aber gezeigt, dass β_3 -Integrin das einzige derzeit identifizierte cis- interaktive Adhäsions Molekül für CEACAM 1-L ist (Brümmer et al. 2001). Die Verteilungsmuster der Isoformen CEACAM 1-S und CEACAM 1-L wurden bisher in den meisten Tumoren noch nicht definiert (Horst und Wagener 2004). Im Gegensatz zu den oben genannten Beobachtungen ist CEACAM 1 in humanen invasiven Melanomen, primären Lungentumoren (Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom, und kleinzelliges Karzinom), Pankreaskarzinomen und Magentumoren überexprimiert (Kim et al. 1992, Ohwada et al. 1994, Kingugasa et al. 1998, Wang et al. 2000, Laack et al. 2002, Thies et al. 2002). In humanen malignen Melanomen ist die CEACAM 1 Expression am stärksten an der invasiven Front des primären Tumors und bleibt auch bis zu den Fernmetastasen erhalten (Thies et al. 2002). Zusätzlich korreliert die CEACAM 1 Expression mit der Entwicklung hin zu einer metastatischen Erkrankung und ist ein eigenständig prognostischer Parameter. Ebenso besteht ein Zusammenhang zwischen CEACAM 1 Expression und einer schlechten Prognose bei Adenokarzinomen der Lunge (Laack et al. 2002) und des Pankreas. In metastatischen Läsionen von Lungentumoren ist jedoch

1. Einleitung

die mRNA- Expression leicht vermindert im Vergleich zu dessen Primärtumor (Ohwada et al. 1994). Das cis-Isomer von CEACAM 1 interagiert mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ an der invasiven Front von malignen Melanomen des Menschen und an der apikalen Oberfläche der Drüsenzellen des Endometriums während der Schwangerschaft (Brümmer et al. 2001). Dies alles könnten Hinweise dafür sein, dass CEACAM 1 in manchen Tumoren eher eine Invasion fördert (Horst und Wagener 2004).

Vorkommen und Funktionen der CEACAMs im Immunsystem

Die CEA Familien Mitglieder, vor allem CEACAM 1 (CD66a), CEACAM 3 (CD66b), CEACAM 6 (CD66c) und CEACAM 8 (CD66d), werden auf neutrophilen Granulozyten exprimiert, wobei man sie z.B. bei CEACAM 1 von den Myelozyten- Stadium bis hin zur neutrophilen Differenzierung beobachten kann (Elghetany 2002, Skubitz et al. 1992). Ebenso findet man eine Hochregulation von CEACAM 1 während inflammatorischer Prozesse (Honig et al. 1999). Durch die Bindung von CEACAM 1 an speziellen Proteinkinasen kann eine erhöhte Assoziation zu Zytoskelett Komponenten beobachtet werden (Brümmer et al. 1995, Skubitz et al. 1995). Bei einer Bindung von CEACAM 1-L an monoklonalen Antikörpern oder $F(ab')_2$ Fragmenten kann man unter anderem eine Hochregulation der β_2 Integrin (CD11b/CD18) Expression, Aktivierung einer Herunterregulierung von L-Selektinen und einen Anstieg der neutrophilen Adhäsion an Endothelzellen, Fibrinogen und Fibronectin beobachten (Stocks et al. 1995, Skubitz et al. 1996, Stocks et al. 1996, Klein 1996, Ruchaud-Sparagano et al. 1997, Horst und Wagener 2004). CEACAM 1-L ist zudem noch auf humanen und murinen T- und B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen exprimiert (Khan et al. 1993, Möller et al. 1996, Kammerer et al. 2001, Boulton und Gray-Owen 2002). Das Expressionsmuster ist hier abhängig vom Aktivierungszustand und der äußeren Stimuli, CEACAM 1 beeinflusst an B-Zellen beispielsweise die B-Zell Proliferation, die Ig- Sekretion und die β_2 -Integrin vermittelte homotype Adhäsion (Greicius et al 2003, Horst und Wagener 2004).

CEACAM modulierte Angiogenese

Die Angiogenese ist der Prozess des Wachstums kleiner Blutgefäße aus einem bereits bestehenden Blutgefäß, welche durch eine Kaskade verschiedener anti-angiogener und pro- angiogener Faktoren beeinflusst wird (Hanahan und Folkman 1996). Zu den (Haupt-) Phasen der Angiogenese gehören:

1. Die Aktivierung der Endothelzellen durch lösliche Wachstumsfaktoren, welche an verwandte Rezeptor Tyrosinkinasen binden (Folkman 1996)

1. Einleitung

2. Die Initiation von Endothelzellen, Migration und zellulärer Interaktion mit extrazellulären Matrix Komponenten
3. Die zelluläre Proliferation und Differenzierung in endotheliale Gefäße.

Zu den Hauptfamilien der beteiligten Wachstumsfaktoren zählen die Vascular endothelial growth factor (VEGF)- Rezeptor- Familie, Tie Rezeptor- Familie, welche an Angiopoetin binden, und die Ephrine. Die Angiogenese wird durch einen oder mehrere dieser Rezeptoren entweder alleine oder mit Hilfe von adhäsiven Molekülen, welche wiederum durch Wachstumsfaktorrezeptoren aktiviert wurden, eingeleitet (Bryzova et al. 2000, Carlson et al. 2001). In späteren Phasen der Angiogenese werden adhäsive Moleküle, beispielsweise Immunglobuline oder Integrine, zu wichtigen Werkzeugen, z.B. bei der zellulären Migration und Interaktion mit der extrazellulären Matrix (Carmeliet und Jain 2000, Conway et al. 2001, Horst und Wagener 2004).

CEACAM 1 ist das einzige Mitglied der CEA Familie mit einer zytoplasmatischen Domäne, welche auf Endothel exprimiert wird, ebenso wurde es als angiogener Wachstumsfaktor identifiziert (Majuri et al. 1994, Ergün et al. 2000). Zusätzlich interagiert CEACAM 1 mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ in menschlichen Epithel- und Endothelzellen, welches die Angiogenese durch Zellmigration und Mediation der Zell-Zell und Zell-extrazellulärer Matrix beeinflussen kann (Ferrero et al. 1995, Varner et al. 1995, Brümmer et al. 2001, Horst und Wagener 2004).

CEACAM 1 wurde zuerst an Mikrogefäßen proliferierender Gewebe (Sawa et al. 1994) und Wundheilungsrändern in granuliertem Gewebe entdeckt. Bei Erwachsenen kann CEACAM 1 hauptsächlich an kleinen Blutgefäßen gefunden werden und nicht an großen, ausgewachsenen Gefäßen. Bei Tumoren wie dem Nierenzellkarzinom, dem Blasenkarzinom, dem Prostatakarzinom und dem Leydigzelltumor fand man CEACAM 1 ebenfalls an den Gefäßen exprimiert (Ergün et al 2000, Horst und Wagener 2004). In Mausversuchen präsentierte sich CEACAM 1 auf kapillar-ähnlichen Strukturen, welche durch Endothelprogenitorzellen geformt wurden, sobald sie mit Tumorzellen in severe combined immunodeficiency (SCID) Mäuse transplantiert wurden (Gehling et al. 2000). Die angiogenen Effekte durch CEACAM 1 scheinen sich zu denen von VEGF und basischem Fibroblast Growth Factor (bFGF) zu addieren. Ebenso konnte durch eine Stimulation von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen mit VEGF und bFGF eine Erhöhung der CEACAM 1 Expression hervorgerufen werden, was zu der Annahme führt, dass eine funktionelle Verbindung dieser Signalwege vorliegen könnte (Ergün et al. 2000, Horst und Wagener 2004). Allerdings ist diese molekulare Verbindung noch nicht näher untersucht worden.

CEACAM 1 ist häufig Träger von Sialyl Lewis^x und Lewis^x Resten auf Granulozyten, daher nimmt man an, dass es als Ligand für E-Selektine fungiert (Kerr und Stocks

1992, Stocks und Kerr 1993, Sanders und Kerr 1999), da unter physiologischen Umständen sialyl-Lewis^x- und Lewis^x- tragende Glykoproteine die Adhäsion der endothelialen Zellen unterstützen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CEACAM 1 an Funktionen in verschiedenen Stadien der Angiogenese teilnimmt: während der frühen Stadien interagiert es in löslicher Form chemotaktisch und die Expression während angiogener Stimuli ist heraufreguliert (Ergün et al. 2000). In späteren Stadien der Angiogenese sind Adhäsionsmoleküle wichtige Instrumente zur Rekrutierung zusätzlicher Zellen (z. B. Perizyten) und zur Etablierung von Zell-Zell Verbindungen. CEACAM reguliert zusammen mit den CD31 und junktionalen Zelladhäsionsmolekülen (JAMs) unter anderem die Gefäßpermeabilität und Endothelzell-Zell Interaktionen (Ferrero et al. 1995, Dejana et al. 2001). Während der Organisation von zellulärer Adhäsion konnte gezeigt werden, dass CEACAM 1 eine Röhren-Formation in humanen Endothelzellen und Lumenformationen in Epithelzellen in einer extrazellulären Matrix fördert, welches darauf hindeuten könnte, dass CEACAM 1 eine Schlüsselstellung in der Organisation von luminalen Gewebsarchitekturen und der Regulation der zellulären Differenzierung spielen könnte (Huang et al. 1998, Kirschner et al. 2003a, Horst und Wagener 2004).

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Gerätetyp	Hersteller
Absauger Zellen	Vacunsafe comfort	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Brutschrank Zellen	Hera Cell, Heraeus	KENDRO Laboratory Produkts GmbH, Hessen Deutschland
Einbettautomat	Leica TP 1020	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany
Einlesegerät Schnitte	Miramax Midi zeiss	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Gelelektrophorese	Powersupply E844	Consort bvba, Turnhout, Belgium
Gelelektrophorese Halterung	PeqLAB	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gewebeinfiltration Leica TP 1020	Leica	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany
H.E. Färbeautomat	Shandon Varistain 24-4	Thermo, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Kühlraum 4 °C	Maßanfertigung	SBS Kühltechnik GmbH, Melle, Deutschland
Light Cycler PCR	Light Cycler 480 II	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany
Microtom	Microm HM 430	MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland

2. Material und Methoden

Mikroskop Kamera	AxioCam Mrc5	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Schnitte	Axioplan2 mit Axiophot 2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Zellen	Axiovert 35	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrowelle R 240	Sharp	Sharp Electronics Gmbh, Senninstraße 3, 20097 Hamburg
Paraffinausguss Automat	Leica EG 1160	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany
Pipette „klein“ diverse Größen zwischen 1-10 µl und bis 1000 µl	Finnpipette®	Thermo, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Pipette groß Zellenkultur für Glaspipetten Spitzen	Pipetus®- akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Schwenkplatte	St 5 Cat	Neo Lab Heidelberg, Deutschland
Steamer Pascal	Dako GmbH	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Vortex	MS2 Minishaker IKA®	IKA – Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wage	Mettler PJ 3000	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Wärmeplatte	Typ 14501	Medax GmbH & Co KG Neumünster, Germany
Wärmeschrank für histologische Schnitte	Melag	Wilke und Wilke Medizintechnik
Werkbank Zellen	Hera Safe , Heraeus Instruments	KENDRO Laboratory Produkts GmbH, Hessen Deutschland
Zentrifuge 96 Wellplatte	Perfect Spin P 91-PSPIN-P	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany

2. Material und Methoden

Zentrifuge	Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Nanodrop	Spektrophotometer NO-1000	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany
Kühlblock 96 Well Platte	Eppendorf AG	Eppendorf AG, Hamburg Germany
IVC racks	Aeromaus IVC greenline	Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Germany

Tab. 4: Geräte

Dargestellt ist eine alphabetisch sortierte Tabelle mit Auflistung der verwendeten Versuchsgeräte.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Glaswaren

Gerätebezeichnung	Gerätetyp	Hersteller
Collection Tube	Collection Tube 2ml	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
Deckgläser	Menzel- Gläser, diverse Größen	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Germany
EDTA Röhrchen	EDTA KE/1.3	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Objektträger beschichtet	HistoBond®	Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, Germany
Objektträger unbeschichtet	Elka	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH&Co G, Sonderheim, Germany
Pipettenspitze groß, Glas	Falcon®	Becton Dickson Labware Europe, Le Pont de Claix, France
Pipettenspitzen, Kunststoff, diverse Größen zwischen 1-10 µl und bis 1000 µl	Tip One	STARLAB GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Sine Column	Mini Spine Column	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany

2. Material und Methoden

Trockenblock	Whatman®	Whatman GmbH, Dassel, Germany
Zellkulturflaschen	Tissue Culture Flask 75 cm ² , Pe Vented Cap	Sarstedt, Newton, U.S.A.
96 Wells Platte	96 Well Roche	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Germany
Abdichtfolie 96 Well Platte	Roche	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Germany
Eppendorfer Gefäß klein	Safe Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg Germany
Eppendorfer Gefäß groß	Safe Lock Tubes 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg Germany

Tab. 5: Verbrauchsmaterialien und Glaswaren:

Dargestellt ist eine alphabetisch sortierte Tabelle mit Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Glaswaren.

2.1.3 Medikamente, Enzyme, Chemikalien und Färbemittel

Substanz	Firma	Firmensitz
ABC- AP Kit- Alkaline Phosphatase Standart AK- 5000	Vector Laboratories Inc.	Vector Laboratories Inc.U.S. HEADQUARTERS, Burlingame, United States of Amerika
AE Puffer	Buffer AE- Elution buffer	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
Agar Noble	Difco™ Agar Noble	Becton, Dickson Company Sparks, U.S.A.
Agarosegel 1,8%ig	SeaKem® LE Agarose	Lonza, Rockland, U.S.A.
AL Puffer	Buffer AL Lysis Buffer	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
Antikörper Diluent	Dako	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
AW 1 Puffer Konzentrat	Buffer AW1 Wash buffer 1 concentrate	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
AW2 Puffer Konzentrat	Buffer AW2 Wash buffer 2 concentrate	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
Casy	Schärfe	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland

2. Material und Methoden

Citronensäure Monohydrat	Merck	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid	Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
DTBS	Gibco / Invivogen	Cayla - InvivoGen Europe Toulouse, France
EGF	Peprotech	Peprotech GmbH Zytokine für Deutschland, Hamburg, Deutschland
Erythrosin B	Merck	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol in verschiedenen Potenzen	Geyer GmbH	Geyer GmbH, Hamburg, Germany
Ethidiumbromid 10mg/ml	Promega	Promega , Mannheim, Germany
Eukitt	O. Kindler GmbH	O. Kindler GmbH & Co. Mikroskopische Gläser Freiburg im Breisgau, Deutschland
FCS	Gibco / Invivogen	Cayla - InvivoGen Europe Toulouse, France
FGF	Peprotech	Peprotech GmbH Zytokine für Deutschland, Hamburg, Deutschland
Formalin 37%	Merck	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Merck	Merck, Darmstadt, Deutschland
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Munich, Germany
Isopropanol, Propanol 2	Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Ketanest Gräub, Ketamin (100mg/ml)	Albrecht	Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland
KH₂PO₄	Merck	Merck, Darmstadt, Deutschland
Levanisol - Tetramisol hydrochlorid	Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Liquid Permanant Red Chromogen	Dako	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

2. Material und Methoden

Liquid Permanent Red Substrat Buffer	Dako	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Na₂HPO₄	Merck	Merck, Darmstadt, Deutschland
Naphthol AS-Bisphosphat disodium salt	Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Natrium Chlorid 0,9% Isotone Natriumchloridlösung	Braun	Braun Melsung AG, Melsung, Germany
Natrium Chlorid, NaCl	J.T. Baker	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
Natrium Nitrit, Sodium Nitrit	Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Neufuchsin	Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
PCR H₂O	Light Cycler ®480 SYBR Green I Master 2	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany
Pen/Strep	Gibco / Invivogen	Cayla - InvivoGen Europe Toulouse, France
Penancin	Roche	Roche Diagnostics Deutschland GmbH Mannheim, Deutschland
Protease Solvent	Qiagen	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
Puromycin	clontech	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en Laye , France
Qiagen Protease		QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
Rabbit Serum Vernal	Dako	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Rompun	Bayer	Bayer AG CHEMPARK , Leverkusen, Deutschland
RPMI 164	Gibco / Invivogen	Cayla - InvivoGen Europe Toulouse, France
Salzsäure, HCl 2	Merck	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sedalaxan	Xylazin 20mg/ml	WDT, Grabsen, Germany
SYBR Green	Light Cycler ®480 SYBR Green I Master1	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany

2. Material und Methoden

Target Retrieval Solution 10 x Concentrate	Dako	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
TBE Puffer	Ulture Pure	Cayla - InvivoGen Europe Toulouse, FRANCE
Transferrin	Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Trizma Base	Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Trypsin EDTA	Gibco / Invivogen	Cayla - InvivoGen Europe Toulouse, FRANCE
Tween®20	Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
XTT	Roche	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Xylolersatz Medium	Diatec GmbH	DiaTec GmbH , Hallstadt, Deutschland
100%iges Ethanol für PCR	Merck	Merck, Darmstadt, Deutschland
PCR Mykoplasmentest	Personal Cycler	Biometra GmbH, Goettingen, Deutschland
Tierfutter	ssniff	Ssniff Spezialdiäten GmbH Ferdinand- Gabriel- Weg 16 D- 59494 Soest

Tab. 6: Medikamente, Enzyme, Chemikalien und Färbemittel:

Dargestellt ist eine alphabetisch sortierte Tabelle mit Auflistung der verwendeten Medikamente, Enzyme, Chemikalien und Färbemittel.

2.1.5 Immunglobuline

Immunglobulin	Hersteller	Firmensitz
4D1C2 - monoklonaler primärer Antikörper gegen CEACAM 1	Klinische Chemie	Uniklinikum Hamburg Eppendorf, Prof Dr. C. Wagener, Klinische Chemie, Hamburg, Deutschland
Anti CEA- CD66e CB30 - monoklonaler primärer Antikörper gegen CEACAM 5	Cell Signaling Technologie	Cell Signaling Technology, Danvers, United States of Amerika

2. Material und Methoden

Anti human CEACAM 6, CEA,Cd66c, - Monoklonaler primärer Antikörper gegen CEACAM 6	Covance	Covance, Princeton, United States of Amerika
Iso Mouse IgG 2A Antikörper - Antikörper der Isotypkontrolle der CEACAM 1 Färbung	Dako	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Mouse IgG1 - Antikörper der Isotypkontrolle der CEACAM 5, 6 Färbungen	Dako	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Polyclonal Rabbit anti Maus Mouse Immunglobulins /biotinylated - Sekundärantikörper aller Färbungen	Dako	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

Tab. 7: Immunglobuline

Dargestellt ist eine alphabetisch sortierte Tabelle der Auflistung der verwendeten Immunglobuline.

2.1.6 Allgemeine Lösungen, Färbungen, Puffer und Nährmedien

5 %ige Neufuchsin- Lösung 100 ml Ansatz

100ml HL 2N

+ 5 g Neufuchsin

1966 Puffer, Ansatz 200 ml

180 ml Aqua dest.

+ 20 ml Target Retrieval Solution Puffer

ABC- AP- Lösung

2,5 ml TBS

+ 1 Tropfen A

+ 1 Tropfen B

2. Material und Methoden

Agar Noble 4%ig, 100 ml Ansatz

100 ml Aqua Dest.

+ 4 g Agar Noble

danach für ca. 3 min in die Mikrowelle bis die Lösung schlierenfrei ist.

AW1 Spühpuffer, Ansatz

95ml AW1 Puffer Konzentrat

+ 125 ml Ethanol 100%ig (Merck)

AW2 Spühpuffer, Ansatz

60 ml AW2 Puffer Konzentrat

+ 160 ml Ethanol 100%ig (Merck)

Citratpuffer, Ansatz 2000 ml, pH 6

2000 ml aqua dest.

+ 4,2028 g Citroensäure Monohydrat

+ 10 ml 10 N NaOH (bis der pH- Wert erreicht ist)

Eosin 0,5% ig, Ansatz 1 L

9995 ml Aqua dest

+ 5 ml Eosin

Färbelösung zur Entwicklung der alkalischen Phosphatase, 200 ml Ansatz

400 mg Natrium Nitrit mit 10 ml Aqua dest. vermischen und schwenken, bis sich die Kristalle aufgelöst haben. Hiernach 400 µl 5%ige Neufuchsin- Lösung dazugeben, ebenso 200 ml TBS- Puffer mit einem pH- Wert von 8,24. Dann zunächst ca. 30 mg Naphthol mit 1 ml Dimethylformamid vermischen, bis das Pulver sich gelöst hat, und ebenfalls in den Hauptbehälter geben. Zuletzt 260 µl Tween und 80 mg Levamisol dazugeben und gut verrühren. Die Lösung muss sofort gebraucht werden.

Formalin 4%ig gepuffert Ansatz 1 Liter

100 ml Formalin 37% ig

+ 500 ml Phosphatpuffer 0,2 M

+ 400 ml Aqua dem.

2. Material und Methoden

Hämalaun nach Mayer, 500 ml Ansatz

- 250 ml Hämalaun
- + 250 ml Aqua dest.

Kalium- Phospatpuffer 0,1 M pH 7,2- 7,4, Ansatz 1 Liter

- 4,03 g KH_2PO_4
- + 17,8 g Na_2HPO_4
- + 1000 ml Aqua dem.

Ketanest Rompun, 10 ml Ansatz

- 10 ml 0,9 %ige isotone Natrium Chlorid Lösung
- + 120 mg Ketanest
- + 16 mg Rompun

TBS- Puffer,- Saliner Tris/HCL Puffer für Immunhistologische Färbungen, Ansatz 10 Liter (pH 7,6 für Immunhistologie, pH 8,24 für Entwicklungslösung)

- 9,800 l aqua dest,
- + 60,57 g Trizma Base
- + 87,09 g NaCl
- + 200 ml HCl 2N (bis der gewünschte pH Wert erreicht ist)

TBS- T – TBS- Puffer mit Tween versetzt

- 2000 ml TBS- Ansatz
- + 2 ml Tween@20

TUM Nähr-Medium

- 500 ml RPMI 1640/Glumax Lösung
- + 50 ml FCS
- + 5 ml FGF
- + 5 ml EGF
- + 2,5 ml Transferrin
- + 5 ml Insulin
- + 5 ml Pen/Strep

2.1.7 Zellen

Bei der verwendeten Pankreaskarzinomzelllinie handelt es sich um PaCa 5061 Zellen. Diese wurden im Jahr 2008 im durch die Abteilung der Allgemeinen,- Viszeralen,- und Thoraxchirurgie der Universitätsklinikum Hamburg von einem Patienten mit einem Adenokarzinom des Pankreaskopfes in Rahmen einer totalen Pankreatoduodenektomie entnommen. Die endgültige Tumorklassifikation nach UICC, 7. Edition, beschreibt den Tumor als Adenokarzinom des Pankreaskopfes (pT3, N1, L1, V1, R0, G2). Die Zellen wurden nach Genehmigung der Ethikkommission der Ärztekammer und mit Einverständnis des Patienten für eine Primärkultur verwendet. Dafür wurden durch Kalinina und Kollegen kleine Tumoranteile entnommen, enzymatisch aufgespalten, gereinigt und daraufhin kultiviert. Mittels der „DNA fingerprinting Analyse“ wurde die Zugehörigkeit der Zellen zum Patienten nochmals bestätigt. Die Zellen wurden genetisch mit der Ursprungs DNA des Patienten verglichen, die Chemosensibilität gegenüber etablierter Chemotherapeutika wurde in vitro gemessen, ebenso ein Expressionsmuster von diversen Oberflächenmoleküle erstellt und die in vivo Kanzerogenität und Metastasefähigkeit im Mausmodell überprüft. Die Zellen wurden somit unter dem Namen PaCa 5061 in der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf etabliert. (Kalinina et al 2010, Gebauer et al 2014)

Das Erzeugen der CEACAM Knockdown Klone erfolgte mittels Transfektion mit shRNA Konstrukten, dabei wurde ein Knockdown von 95 % im Verhältnis zur Wildtyp Zelle bzw. zu der Kontrolltransfektanten LUC erzielt. Für den Knockdown, also das Herabregulieren eines Gens, wurden Oligonukleotide in einen pSIREN- Retro Q Vektor geklont und durch den FuGene transfections Agenten transfiziert. Nach der Transfektion wird somit die gewünschte shRNA exprimiert, dies veranlasst eine Stilllegung an der Endterminale der CEACAM Gene für CEACAM 1,5 und 6 und bewirkt somit den Knockdown all dieser. Die Selektion mittel Zellkultur der erfolgreichen Transfektionszellen erfolgte durch eine Puromycin Chemoresistenz, welche durch den Vektor ebenfalls integriert wurde. Als Bestätigung des Knockdowns und zur Selektion wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierzu müssen zunächst die gesunden Zellen mittels des Farbstoffs Propidiumiodid von den geschädigten Zellen selektiert werden. Bei einer vorhandenen Schädigung der Zellmembran dringt der Farbstoff in die Zelle, welches die defekten Zellen dadurch markiert, so dass diese separiert und eliminiert werden können. Für die eigentliche Durchflusszytometrie wurden konjugierte Antikörper gegen CEACAM 1, 5 und 6 und korrespondierende sekundäre Antikörper, IgM mouse und IgA rat, verwendet, welche mit Goat anti Mouse Ig-APC detektiert wurden. Die Zellen wurden darauf mit CyFlow Zytometer analysiert, hierbei wurde die quantitative Expression von CEACAM

2. Material und Methoden

Molekülen bestimmt und mit niedriger Expression von CEACAM separiert. Es wurden nur Zellen mit über 90%igem Knockdown für die *in vitro* und Mausmodell- Versuche verwendet. (Wicklein 2012, Gebauer et al 2014)

XTT-Proliferationstests zur Bestimmung des *in-vitro* Proliferationspotentials wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt sie wichen nicht von den Ursprungsangaben der etablierten Zellreihe ab. (Kalinina et al 2010).

2.1.8 Immundefiziente Tiere

Für den Xenotransplantationsversuch wurden C57BL/6 pfp/rag2 Mäuse, oder kurz pfp/rag2 Mäuse, verwendet. Diese Mäuse zeichnen sich dadurch aus, dass sowohl das pfp- Gen als auch das rag2- Gen im Rahmen eines transgenen Knockouts funktionell inaktiv sind. Die Natürlichen Killerzellen, NK- Zellen, sind durch das Fehlen des pfp- Gens teildefizient, da sie das für ihre Funktion wichtige Perforin nicht mehr bilden können. Das Fehlen reifer T- und B- Lymphozyten wird durch die Abwesenheit des rag2-Gens erreicht. Insbesondere die Deletion von rag2 führt zu der deutlichen Immundefizienz, welche eine Xenotransplantation erst möglich macht (Shinkai et al. 1992, Walsh et al. 1994).

Es wurden sowohl männliche als auch weibliche pathogenfreie pfp^{-/-}/rag2^{-/-} Mäuse (n=30) von der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf zur Verfügung gestellt.

Die Tiere wurde in 3 Versuchsgruppen eingeteilt mit jeweils 10 Tieren - wobei 5 männliche und 5 weibliche Tiere einer Gruppe angehörten. Die 3 Versuchsgruppen wurden je nach injiziertem Zelltyp benannt:

- "Wildtyp" - mit PaCa 5061 Wildtyp Zellen
- "LUC"- mit PaCA 5061 Kontrolltransfektanten, welche eine siRNA gegen Luciferase herstellen, welche in humanen Zellen nicht vorkommt.
- "CEACAM"- mit PaCa 5061 CEACAM Knockdown Zellen

3.1.9 Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden, wie in Abschnitt Methoden beschrieben, entnommen und weiterverarbeitet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Allgemeine Zellkultur und Rekultivierung der Zellen

Die Zellkulturen für diesen Versuch waren in 3 Gruppen eingeteilt:

- Unveränderte Zellen vom
 - Wildttyp PaCa 5061
- Veränderte Zellen
 - CEACAM Knockdown PaCa 5061
 - Luc Transfektionsdeterminante PaCa 5061

Zellkulturen Splitten

Die Zellkulturen wurden aus dem Wärmeschrank geholt und deren Wachstum durch das Mikroskop überprüft. Unter sterilen Bedingungen wurde unter der Werkbank der Mediumüberstand aus den Zellkulturflaschen abgesaugt. Danach wurden 5 ml Trypsin/EDTA in die Kulturen pipettiert. Die Kulturen wurden anschließend 5-10 min im Brutschrank inkubiert.

Währenddessen wurden neue Zellkulturflaschen vorbereitet: Je 15 ml des TUM Kulturmediums wurden in neue T75 Zellkulturflaschen gegeben. Die veränderten Zelllinien (CEACAM und LUC) erhielten zusätzlich 7,5 µl Puromycin in die Zellkulturflasche. Nach Kontrolle des Ablösens der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche unter dem Mikroskop wurden vorsichtig Zellen durch ca. 5 - 10 maliges Spülen (mit der Pipette) des Bodens und der Ränder der Flasche gelöst. Von diesem Überstand wurde 1 ml in der neuen Flasche ausgesäht.

2.2.1.3 Mykoplasmentest

Der Mykoplasmentest wurde mit dem Venor® geM – Mykoplasmen- Detektionskits von Minerva Biolabs, Berlin Deutschland, nach Anleitung durchgeführt.

2.2.2 Tierhaltung, Versuchsdurchführung und Gewebegewinnung

2.2.2.1 Tierhaltung

Die Tierversuche wurden mit etablierten Methoden nach den Richtlinien der UKCCR, United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research, für das Wohlergehen von Tieren in Neoplasie- Experimenten, durchgeführt. Für die Versuche wurden pathogenfreie Mäuse der Linie C57BL/6 pfp-/rag2- verwendet. Die 14 - 16 Wochen alten Tiere wurden in IVC- Käfigen, individual ventilated cages, gehalten und mit sterilem Wasser und und Futter ad libitum versorgt, wobei maximal 5 Mäuse pro Käfig gehalten wurden. Zu Beginn des Versuches wogen die Tiere 20 -25 g.

2. Material und Methoden

2.2.2.2 Subkutane Injektion

Zu Beginn des Versuchs wurden den Tieren 10^6 PaCa 5061 Zellen in 200 μ l RPMI1640 Medium (ohne Zusätze) subkutan unter die rechte Scapula injiziert. Die Mäuse wurden bei einem Punktwert von 20 und höher nach folgenden Kriterien getötet, wobei zwischen 4 Kriterien unterschieden wurde: Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten und versuchsspezifische Kriterien. Der Punktwert ergibt sich durch Addition der Wertungspunkte aus allen Kategorien.

Beobachtung	Wertung
1. Körpergewicht	
Unbeeinflusst oder Anstieg	0
Reduktion > 10 %	10
Reduktion > 20 %	20
2. Allgemeinzustand	
Fell glänzend, anliegend, Körperöffnungen sauber	0
Fell stumpf, gestäubt, Augen trüb	5
Verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unklare Haltung, hoher Muskeltonus, Dehydration	10
Krämpfe, Lähmungen, Atemgeräusche, Tier fühlt sich kalt an	20
3. Spontanverhalten	
Normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen, Berührung, Neugier, Sozialkontakt)	0
Ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik	5
Isolation, Schmerzäußerungen, Apathie, ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Stereotypien, Koordinationsstörungen	10
Automutilation	20
4. Versuchsspezifische Kriterien	
Ulzerationen	20
Gewichtsanstieg > 10 %	20

Tab. 8: Kriterien der Mäusegesundheit

Dargestellt ist eine Tabelle zu den Kriterien der Mäusegesundheit. Hierbei werden zu den 4 Kategorien:

1. Körpergewicht, 2. Allgemeinzustand, 3. Spontanverhalten und 4. Versuchsspezifische Kriterien Punktwerte vergeben, welche additiv das Gesamtergebnis ergeben und Aufschluss über den Gesundheitszustand der Versuchstiere geben.

2. Material und Methoden

Im Versuch wurden 30 pfp/rag2 Mäuse in 3 Gruppen zu jeweils 10 Tieren eingeteilt mit je 5 männlichen und 5 weiblichen Tieren pro Gruppe. Die Gruppen erhielten jeweils folgende Zellen injiziert:

- CEACAM- Knockdown – im Folgenden auch „CEACAM- Gruppe“ genannt-,
- LUC Kontrolltransfektante – im Folgenden auch „LUC-Gruppe“ genannt und
- Wildtyp PaCA5061 – im Folgenden auch „WT-Gruppe“ genannt.

2.2.2.3 Erfassung und pathologisch- anatomische Untersuchung der Versuchstiere

Der Maus wurde eine Kombinationsnarkose aus Ketanest und Xylain gewichtsadaptiert 0,1 ml je 10 g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Sobald das Versuchstier nicht mehr auf Schmerzreize reagierte, wurde eine finale Blutentnahme durchgeführt. Diese fand entweder aus dem retrobulbären Venenplexus oder intrakardial statt, wobei die gewonnene Blutmenge zwischen 200 und 1000 µl betrug und in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert wurde. Im Anschluss an die Blutentnahme wurde das Tier bei anhaltender Anästhesie durch zervikale Dislokation getötet. Zur Präparation wurde das Versuchstier zunächst in Rückenlage fixiert, der Brustkorb wurde eröffnet und die Lunge entnommen. Nach Drehen des Tiers in Bauchlage, wurde der Tumor resiziert und gewogen. In einem vorbereiteten Untersuchungsprotokoll wurden folgende Parameter schriftlich vermerkt: die Entnahmenummer, das Datum, der Zelllinienname, das Tiermodell, die Entnahmen, das Tumorgewicht, sonstige Tumorbeschaffenheiten, die Tiernummer und der Verbleib/ Lagerungsort des entnommenen Gewebes.

2.2.3.1 Histologische Aufbereitungen der Gewebeproben

Fixierung

Der Tumor und die Lunge wurden in 4 % Formalin gepuffert fixiert. Nach 24 h Fixierung wurden die Präparate in 0,1 M Phosphatpuffer bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Entwässerung und Einbettung

Die Entwässerung der Gewebeproben erfolgte vollautomatisch durch das Gerät Leica TP 1020. Das Präparat wird in der Pufferlösung in das Gerät eingebracht und durch eine aufsteigende Isopropanolreihe entwässert: 50 %ig Isopropanol 90 min, 70 % Isopropanol 30 min und nochmals 90 min, 90 % Isopropanol zuerst 60 min, dann zweimalig 120 min und schließlich in 100 % Isopropanol dreimalig jeweils 210 min. Danach wird das Präparat zweimalig jeweils 5 h unter Vakuum in Paraffin eingebettet. Hiernach werden die Gewebeproben zum Paraffinausguss und Fixierung auf dem

2. Material und Methoden

Träger an dem Gerät Leica EG 1160 weiter bearbeitet und sind nach dem Auskühlen fertig zum Schneiden.

Tumor

Der Paraffinblock wird auf einem Träger fixiert und in das Mikrotom Microm HM 430 gespannt. Der eingebettete Tumor wird unter Kühlung und Befeuchtung in 4 µm dünne Schnitte geschnitten. Im aqua dest. wird der Schnitt bei Raumtemperatur mit Hilfe von Pinseln entrollt und schließlich in einem 37 °C warmen Wasserbad aus aqua dest. für ca. 1 min geglättet und auf den Histobond Objektträger gezogen. Der Objektträger wird nun grob mit dem Papier und auf einer Wärmeplatte gelagert. Nach Beendigung des Schneidens, werden die Objektträger mit den Schnitten für mindestens 24 h im Wärmeschrank bei konstanten 37 °C gelagert.

Lunge

Nach der Fixierung der Lungen wurden diese in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten, welche anschließend in 4 % Agar Noble eingegossen wurden. Nach dem Abkühlen wurden die Präparate, wie oben beschrieben, zunächst entwässert, durch den Automaten Leica TP 1020, und in Paraffin mit dem Automaten Leica EG 1160 eingegossen.

Die Lungen wurden am Mikrotom in 5 µm dünne Schnitte geschnitten, hierbei wurde der erste Anschnitt von Lungengewebe mit 1 gekennzeichnet. Danach wurde jeder 10. Schnitt, wie oben beschrieben, auf einen Objektträger gezogen und mit seiner laufenden Nummer gekennzeichnet. Die dazwischen liegenden Schnitte wurden hingegen verworfen. Die Lungen wurden aufgeschnitten, bis kein Lungengewebe mehr vorhanden war, die Gesamtzahl an Schnitten (mit enthaltenem Lungengewebe) wurde notiert. Die Schnitte, welche für immunhistologische Färbungen verwandt werden sollten, wurden aus einem Bereich mit möglichst viel Lungengewebe entnommen (in der Mitte des Paraffinblocks), ab ca. dem 80. bis 200. Schnitt. Aus diesem Bereich wurden 20 direkt nacheinander folgende Schnitte auf die Histo-Bond Objektträger gezogen.

2.2.3.2 Färbungen

2.2.3.2.1 Hämatoxylin- Eosin (H.E.) Färbung

Die Halterung für die Schnitte wird in den Automaten Shandon Varistan 24 E eingespannt und läuft vollautomatisch im Programm Nr. 1 durch verschiedene Stufen. Zuerst erfolgt zweimalig, jeweils 5 min Xylol- Ersatz, dann 3 min in 99 % Ethanol, danach 5 min 99 % Ethanol, 5 min in 96 % Ethanol, 5 min in 70 % Ethanol, 5 min in

2. Material und Methoden

50 % Ethanol, jeweils zweimalig 2 min in Aqua dest. waschen, 5 min in Hämalaun nach Mayer einfärben, 2 min in Aqua dest. reinigen, 5 min mit Wasser waschen, 3 min in 0,5 % Eosin gegenfärben, ca. 30 s in Aqua dest. auswaschen, 15 s in 70 % Ethanol, 30 s in 96 % Ethanol, 30 s in 96 % Ethanol, 2 x 5 min in 100 % Ethanol entwässern, zum Schluss 3 mal jeweils 5 min in Xylol- Ersatz baden und schließlich unter dem Abzug mit Eukitt und einem Deckglas luftblasenfrei abdecken.

2.2.3.2 Immunhistologische Färbungen

Alle immunhistologischen Präparate wurde zunächst entparaffiniert durch das vollautomatische Programm des Shandon Varistan 24 E, hierbei wurden verschiedene Stufen durchlaufen: 5 min im Xylol- Ersatz, 5 min Xylol- Ersatz, 3 min 99 % Ethanol, 5 min 99 % Ethanol, 5 min 96 % Ethanol, 5 min in 70 % Ethanol, 5 min 50 % Ethanol und 2 min in aqua dest. Es wurden zu allen Färbungen Positivkontrollen und Iso-Kontrollen angefertigt.

CEACAM 1 Färbung

Für die Iso- und Positivkontrolle wurden Schnitte der Zellreihe Mewo, eines malignen Melanoms, genommen.

Tag 1

Vorbehandlung

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte in einer Küvette mit Citratpuffer für zweimal sieben min in der Mikrowelle bei 800 Watt vorbehandelt. Im Anschluss folgte zum Abkühlen eine Inkubation für 20 min auf dem Kippschüttler. Danach wurde die Hälfte der Flüssigkeit aus der Küvette verworfen und durch Aqua dest. ersetzt und die Küvette wurde zum Kühlen für weitere 10 min auf den Kippschüttler gestellt. Danach wurde die gesamte Flüssigkeit abgegossen und die Küvette mit Aqua dest. aufgefüllt und für weitere 5 min auskühlen lassen. Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal jeweils 5 min mit TBS-T gespült und danach einmalig 5 min mit TBS.

Blockieren

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde normales Kaninchenserum im Verhältnis von 1 : 10 in TBS verdünnt und es wurden 150 µl der Lösung auf jedes Präparat pipettiert und 20 min in der Feuchtkammer inkubiert.

Primärer Antikörper

Nach Abgießen der Lösung aus dem Blockierungsschritt wurden 150 µl einer 1 : 380 Verdünnung des 4D1C2 Antikörpers bzw. 150 µl einer 1 : 10 Verdünnung der IgG2a Isotypkontrolle in Antikörper Diluent auf die Präparate gegeben. Die Schnitte wurden in der Feuchtkammer bei 4 °C über Nacht inkubiert.

2. Material und Methoden

Tag 2

Spülen

Die Präparate wurden aus den Feuchtkammern genommen und in Küvetten (die Isokontrolle in einer getrennten Küvette) zweimal jeweils 5 min mit TBS gespült.

Sekundärer Antikörper

Die Präparate wurden aus den Küvetten entnommen und mit 150 µl einer 1: 40 Verdünnung von biotinyliertem Kaninchen anti Maus in TBS inkubiert; die Inkubationszeit betrug 20 min. Währenddessen wurde die Lösung der Streptavidin gekoppelten Alkalischen Phosphatase angesetzt. Hierfür wurde 7,5 ml TBS mit drei Tropfen A- Lösung und drei Tropfen B- Lösung aus dem ABC-AP Kit versetzt.

Alkalische Phosphatase

Nach der Inkubation (20 min) wurden alle Präparate 2 mal jeweils fünf min in TBS gespült. Die Präparate wurden mit 150 µl der ABC-Lösung auf jeden Schnitt 30 min in der Feuchtkammer inkubiert.

Dako Permanent Red Färbung

Als nächstes wurden die Schnitte wieder zweimal je fünf min in TBS gespült. Eine Dako-Permanent-Red Lösung wurde unmittelbar vor der Färbung bestehend aus 6 ml Liquid Permanent Red Substrat Buffer und zwei Tropfen Liquid Permanent Red Chromogen angesetzt. Es wurde mit je 150 µl pro Schnitt für 15 min in der Feuchtkammer inkubiert.

Gegenfärbung

Nach der Inkubation wurden die Schnitte in Küvetten 5 min mit fließendem Leitungswasser und anschließend 1 - 2 min in Aqua dest. gespült. Unter dem Abzug erfolgt nun eine Gegenfärbung in der vorher gefilterten Hämalaun Lösung nach Meyer für 5 Sekunden. Hiernach wurde weitere 5 min unter fließend Leitungswasser und 1 - 2 min in Aqua dest. gespült.

Entwässerung

Die Entwässerung der Präparate erfolgte wieder automatisch im Programm Nr. 3 des Shandon Varistan 24 E. Hierbei wurden folgende Schritte durchlaufen. Zuerst in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 % Ethanol für 15 s, dann zweimal in 96 % Ethanol für 30 s, dann zweimal in 99 % Ethanol für 5 min und dreimal in Xylol-Ersatz für 5 min.

Eindeckeln

Hiernach wurden die Präparate unter dem Abzug mit Eukitt und Deckgläsern versehen. Das Aushärten erfolgte über Nacht unter dem Abzug.

2. Material und Methoden

CEACAM 5 Färbung

Für die Iso- und Positivkontrolle wurden Schnitte der Pankreaskarzinomzelllinie PaCa 5061 verwendet.

Tag 1

Vorbehandlung

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte in einer Küvette in Citratpuffer für zwei mal 7 min bei 800 Watt in der Mikrowelle vorbehandelt. Nach Abkühlen für 20 min auf der Schwenkplatte wurde die Hälfte der Flüssigkeit aus der Küvette verworfen, die Küvette mit Aqua dest. aufgefüllt und für weitere 10 min zum weiteren Abkühlen auf die Schwenkplatte gestellt. Die komplette Flüssigkeit wurde im Anschluss verworfen, das Gefäß mit Aqua dest. aufgefüllt und für weitere fünf min abkühlen lassen. Hiernach wurden die Schnitte zweimal jeweils fünf min mit TBS-T gespült und danach einmalig fünf min mit TBS.

Blockieren

Zum Blockieren wurde Kaninchenserum in 1: 10 Verdünnung in TBS angesetzt. Es wurden 150 µl der Lösung auf jedes Präparat pipettiert und 60 min in der Feuchtkammer inkubiert.

Primäre Antikörper

In diesem Schritt wird die Isotypenkontrolle separat von den anderen Präparaten behandelt: Nach Abgießen die Flüssigkeit wurden 150 µl einer 1: 50 Verdünnung des Isotypenkontrolle (Maus Ig G1) in Antikörper Diluent auf die entsprechenden Proben gegeben. Die weiteren Schnitte wurden dagegen in 150 µl einer 1: 100 Lösung des anti-CEA/CD66e (CB30) Antikörpers in Antikörper Diluent inkubiert. Die Inkubation der Schnitte erfolgte über Nacht in der Feuchtkammer bei 4 °C.

Tag 2

Spülen

Die Präparate wurden aus den Feuchtkammern entnommen und in Küvetten zweimal jeweils fünf min mit TBS gespült. Hierbei wurde die Isotypenkontrolle in einer getrennten Küvette behandelt.

Sekundärer Antikörper

Die Präparate wurden aus der Küvette entnommen und in 150 µl einer 1: 200 Verdünnung des sekundären Antikörpers (biotinyliertes Kaninchen anti-Maus) in TBS inkubiert; die Inkubationszeit betrug 20 min. Währenddessen wurde die Lösung der Alkalischen Phosphatase angesetzt. Hierfür wurden 7,5 ml TBS mit drei Tropfen Lösung A und drei Tropfen Lösung B aus dem ABC-AP Kit versetzt.

2. Material und Methoden

Alkalische Phosphatase

Nach der Inkubation von 20 min wurden alle Präparate zweimal jeweils 5 min in TBS gespült. Es wurden 150 µl der ABC-Lösung auf jeden Schnitt pipettiert und anschließend 30 min in der Feuchtkammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte zweimal jeweils fünf min in TBS gespült.

Färbelösung zur Entwicklung der alkalischen Phosphatase

Je Küvette wurden 200 ml der Färbelösung der alkalischen Phosphatase benötigt und erst unmittelbar vor der Färbung angesetzt. Ansetzen und Umfüllen der Lösung wurde unter dem Abzug durchgeführt; es wurde 30 min im Dunkeln inkubiert und anschließend 5 min in Leitungswasser gespült. Im Anschluss wurde ein bis zwei min in Aqua dest. gespült.

Gegenfärbung

Unter dem Abzug erfolgte eine Gegenfärbung in der vorher gefilterten Hämalaun nach Meyer- Lösung für fünf s. Hiernach wurde weitere 5 min mit fließendem Leitungswasser gespült und anschließend ein bis zweimin in aqua dest.

Entwässerung

Die Entwässerung der Präparate erfolgt wieder automatisch im Programm Nr. 3 des Shandon Varistan 24 E (s. H.E. -Färbung).

Eindeckeln

s. H.E.-Färbung

CEACAM 6 Färbung

Für die Iso- und Positivkontrolle wurden Schnitte der Pankreaskarzinomzelllinie PaCa 5061 verwendet.

Tag 1

Vorbehandlung

wie CEACAM 5 Färbung

Blockieren

wie CEACAM 5 Färbung

Primärer Antikörper

Dieser Schritt erfolgte entsprechend der CEACAM 5 Färbung, außer dass 150 µl einer 1: 40 Verdünnung des Anti-CEACAM 6 (9A6) Antikörpers in Antikörper Diluent eingesetzt wurden.

Tag 2

wie CEACAM 5 Färbung

2.2.3.3 Auswertung der Schnittpräparate

Die histologische Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axioplan 2 Lichtmikroskop.

2.2.4 PCR- Bestimmung disseminierter Tumorzellen im Blut

2.2.4.1 DNA Isolierung aus EDTA Blut

Innerhalb von vier Tagen nach Entnahme (s.o.) wurde aus 200 µl EDTA-Blut der Tiere die Gesamt- DNA isoliert. Die Isolierung wurde mittels QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben wurden im Anschluss bei - 20° C gelagert.

2.2.4.2 PCR

Es wurde eine quantitative Real Time- PCR für die Detektion von Tumorzellen im Blut mit Hilfe des LightCycler Systems und dem LightCycler-Master SYBR Green Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Für die Amplifikation wird ein Gesamtvolumen von 20 µl benötigt.

Als Primer wurde die sogenannte Alusequenz genommen, nach Angaben des Herstellers ist der Primer als 100 pmol/ µl Lösung vorhanden.

Die Primer Sequenzen lauteten wie folgt:

Alu forward: 5' TGG CTC ACG CCT GTA ATC CAA 3'

Alu reverse: 3' GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT 5'

Alu forward: 5' TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA GCA CTT TGG 3'

Alu reverse : 3' GTC TCG CTC TGT CGC CCA GGG GAG TGC AGT 5'

2.2.4.3 Anfertigung der Proben für die Standardkurve

Zunächst wurden Proben für eine Standardkurve mit PaCa 5061 Zellen aus der Zellkultur angesetzt, indem mit der extrahierten DNA von 10^6 Zellen (QIAmp DNA Blood Mini Kit) Verdünnungen mit dem DNA-Extrakt (QIAmp DNA Blood Mini Kit) aus 200 µl Blut von pfp⁻/rag2⁻ Mäusen hergestellt wurden, entsprechend 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 bzw. 10 Zellen/ml.

2. Material und Methoden

2.2.4.4 Ansatz des Mastermixes

Mastermixansatz für 10 µl Ansätze

	1x	20 x	35 x
Primer forward (100 pmol/µl)	0,2 µl	4 µl	7 µl
Primer reverse (100 pmol/µl)	0,2 µl	4 µl	7 µl
LC-MM (tube grüner Deckel)	2,0 µl	40 µl	70 µl
ddH ₂ O PCR grade (2)	5,6 µl	112 µl	196 µl
	8,0 µl	160 µl	280 µl

Nach Festlegen des Pipettierschemas wurde zunächst die vorgefertigte Standardreihe, mit jeweils 10 µl je Well in die gekühlte 96-Well Platte gegeben. In jedes weitere Well wurden 0,8 µl des Mastermixes vorgelegt und später 0,2 µl der zu messenden DNA hinzugefügt. Alle Werte wurden in Doppelansätzen erhoben, um einen validen Mittelwert zu erlangen. Danach wurde die 96-Well Platte mit Hilfe des Applikators und einer Klebe-Folie abgedichtet.

2.2.4.5 Light Cycler Protokoll

Die gekühlte 96-Well Platte wurde kurz zentrifugiert, um die gesamten Ansätze am Boden der Wells zu konzentrieren, anschließend erfolgte die Inkubation im Light Cycler nach folgendem Protokoll:

Prä-Inkubation von 10 min bei 95 °C

Anschließend wurden vollautomatisch folgende Schleife 40 mal durchlaufen:

Denaturierung bei 95 °C für 5 s

Annealing- Phase bei 67 °C für 5 s

Elongation bei 72 °C für 20 s

Hiernach erfolgte die „Melting Curve“ Phase:

Denaturierung bei 95 °C für 1 s

Annealing bei 65 °C für 1 s

Melting bei 95 °C.

Die Detektion der markierten DNA- Abschnitte wird mit Hilfe des LightCycler Systems gemessen. (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

2.2.3 Statistische und graphische Auswertung

Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism 5 erstellt, die statische Auswertung erfolgte nach der Mann-Whitney-U-Testung und nach dem Log Rank Test.

3. Ergebnisse

3.1 Auswertung des subkutanen Injektionsversuchs

Nach der subkutanen Injektion wurden die Versuchstiere überwacht. Sobald die Versuchstiere die Abbruchkriterien erfüllten, wurden sie, wie bereits in Material und Methoden beschrieben, unter Berücksichtigung der UKCCR Richtlinien getötet. Neben der Gewebegewinnung des Tumors, der Lunge und des Blutes wurden die Überlebenstage und das Tumorgewicht der jeweiligen Gruppenmitglieder miteinander verglichen. Es wurden ausschließlich Tiere mit stetigem Tumorwachstum in die Ergebnisse mit einbezogen (siehe 3.2, Tab. 9). Es erfolgte eine chronologische Auflistung des Versuches und danach eine analytische Auswertung bezüglich der Takerate, des Tumorgewichts, der makroskopischen Morphologie des Tumors, der Überlebensdauer der Versuchstiere, eine histopathologische Untersuchung der Tumore und Lungenschnitte, hierbei wurden Färbungen mittels Hämatoxylin- Eosin- Färbung und immunhistochemische Färbung zur Detektierung von CEACAM 1,5 und 6 Oberflächenmolekülen verwandt. Die Schnittbilder der Lunge wurden nach Metastasen durchsucht und es erfolgte eine PCR- Untersuchung des murinen Blutes nach humanen Zellbestandteilen, welche auf das Vorhandensein von Mikrometastasen hinweisen könnte.

3. Ergebnisse

3.2 Gesamtversuch chronologisch

	Versuchs-	Präparat-		Tumor-	Maus	
	Endpunkt	Nummer	Zelllinie	Gewicht	Identifikations-	Makroskopie
					nummer	
1	06.07.10	243-1-10	LUC 5061	0,32	3572	ulzeriert
2	06.07.10	244-1-10	WT 5061	0,15	3567	ulzeriert
3	06.07.10	244-2-10	WT 5061	4,83	3568	ulzeriert
4	09.07.10	249-1-10	WT 5061	0,13	3569	ulzeriert
5	09.07.10	249-2-10	WT 5061	0,13	3570	ulzeriert
6	22.07.10	278-1-10	WT 5061	0,59	3557	ulzeriert
7	09.08.10	314-1-10	WT 5061	1,5	3571	zystisch
8	09.08.10	315-1-10	WT 5061	1,61	3558	zystisch
9	09.08.10	316-1-10	LUC 5061	0,94	3573	zystisch
10	09.08.10	317-1-10	LUC 5061	1,72	3562	Zystisch
11	23.08.10	338-1-10	LUC 5061	0,73	3574	Keine Besonderheit
12	23.08.10	338-2-10	LUC 5061	1,14	3563	Keine Besonderheit
13	23.08.10	339-1-10	WT 5061	1,48	3559	Keine Besonderheit
14	30.08.10	347-1-10	CEACAM 5061	0,93	3553	zystisch
15	30.08.10	347-2-10	CEACAM 5061	0,84	3466	zystisch
16	02.09.10	353-1-10	LUC 5061	0,79	3575	zystisch
17	24.09.10	373-1-10	WT 5061	1,55	3560	zystisch
18	24.09.10	374-1-10	CEACAM 5061	0,94	3554	zystisch
19	24.09.10	374-2-10	CEACAM 5061	0,8	3555	zystisch 0,2 Zyste, Tumorgewicht
20	30.09.10	376-1-10	CEACAM 5061	0,7	3556	ohne Flüssigkeit
21	19.11.10	423-1-10	CEACAM 5061	1,33	3551	Riesenzyste
22	06.12.10	438-1-10	CEACAM 5061	1,41	3577	Keine Besonderheit Zyste, Tumorgewicht
23	21.12.10	454-1-10	WT 5061	0,75	3561	ohne Flüssigkeit
24	19.01.11	026-1-11	LUC 5061	0,02	3564	Zystisch
25	19.01.11	026-2-11	LUC 5061	0,28	3565	zystisch
26	19.01.11	026-3-11	LUC 5061	0,07	3566	zystisch
27	19.01.11	027-1-11	CEACAM 5061	0,06	3552	zystisch
28	19.01.11	-	LUC 5061	-	3576	kein Tumor
29	19.01.11	-	CEACAM 5061	-	3578	kein Tumor
30	19.01.11	-	CEACAM 5061	-	3579	kein Tumor

Tab. 9: Gesamtversuch chronologisch: Dargestellt ist eine Tabelle über den chronologischen Gesamtverlauf unter Angabe des Versuchsendpunktes, der Tiernummer, der Zelllinie des Tumors, des Tumorgewichts, der Mausidentifikationsnummer und der makroskopischen Beurteilung des Tumors, wobei Nr. 24-27 kein stetiges Tumorwachstum zeigte. Bei Nr. 28-30 wuchs kein Tumor an.

3.3 Anwachsrate des stetigen Tumorwachstums

In der Wildtypgruppe zeigte sich ein stetiges Tumorwachstum bei 10 von 10 Tieren (100 %), in der LUC Gruppe bei 6 von 10 Tieren (60 %) und in der CEACAM Gruppe bei 7 von 10 Tieren (70 %), so dass sich eine valide Tumorwachstumsrate für den Versuch ergab.

Bei 3 Tieren aus der LUC Gruppe und einem Tier der CEACAM Gruppe konnten palpatorisch sehr kleine Raumforderungen im Nacken festgestellt werden, welche jedoch im Verlauf keinerlei Grössenzuwachs zeigten. Nach einem Beobachtungszeitraum von ca. 2 Monaten ohne Grössenprogredienz entschied man sich zum Versuchsabbruch und tötete alle übrig gebliebenen Tiere. Hierbei wurden bei allen Versuchstieren makro- und mikroskopisch nach Tumorgewebe in der Injektionsstelle gesucht. Da die Tiere kein stetiges Wachstum zeigten und auch die Tumoren vom histologischen Aufbau nicht vergleichbar waren mit den anderen Präparaten (siehe Ergebnisdarstellung der histologischen Auswertungen), wurden diese nicht in die statistische Auswertung mit hineinbezogen und in den folgenden Tabellen (Tab. 9) vollständigshalber mit aufgeführt. Die Abbildung 2 zeigt die Tumorwachstumsrate der stetig wachsenden Tumoren nach Versuchsgruppen unterteilt.

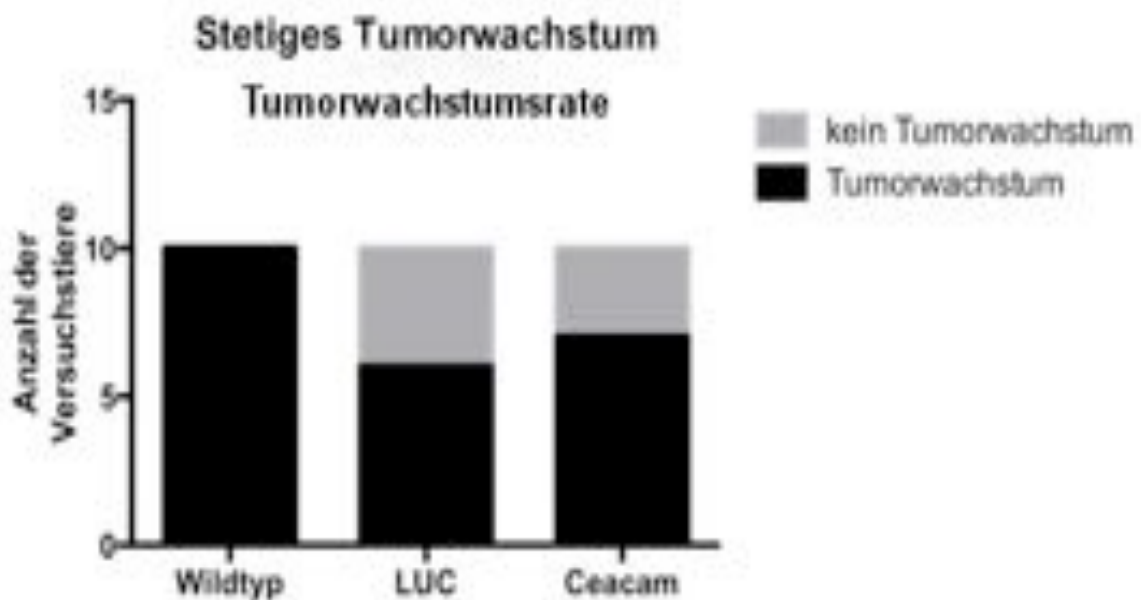


Abb. 2: Tumorrare des subkutanen Injektionsversuchs,

Dargestellt ist ein additives Säulendiagramm, welches die Tumor- Takerate der stetig wachsenden Tumoren des subkutanen Injektionsversuchs nach Gruppenzugehörigkeit (Wildtyp, Luc, CEACAM) unterteilt darstellt. Hierbei sieht man einen Unterschied in der Takerate, wobei der Wildtyp mit 100 % am besten angenommen wurde, hiernach folgt die CEACAM- Gruppe mit 70% und die LUC- Gruppe mit 60%.

x: Anzahl der Tiere mit stetigem Tumorwachstum, y: Gruppen: Wildtyp, LUC, CEACAM

3.4 Analyse des Tumorgewichts

Die Tumoren wurden nach dem Versuchsendpunkt entnommen und gewogen. Die Tumoren waren vom strukturellen Aufbau her sehr unterschiedlich, welches später in der histologischen Auswertung noch beschrieben wird. Für die Auswertung des Tumorgewichts ist hierbei wichtig, dass die Präparation der zystischen Tumore sich sehr schwierig gestaltete und es nur bei manchen dieser Tumoren gelang, hierbei die Zysten nicht zu perforieren. Das durchschnittliche Tumorgewicht wurde nach SEM, Standardabweichung des Mittelwertes, analysiert (siehe Abb. 3). Hierfür wurden ausschließlich die Tumoren des stetigen Tumorwachstums in die Versuchsauswertung hinzugezogen.

	Wildtyp	LUC	CEACAM
1	0,15	0,32	0,93
2	4,83	0,94	0,84
3	0,13	1,72	0,94
4	0,13	0,73	0,8
5	0,59	1,14	0,7
6	1,5	0,79	1,33
7	1,61		1,41
8	1,48		
9	1,55		
10	0,75		

Tab. 10: Tabellarische Darstellung des Tumorgewichts:

Dargestellt ist eine Tabelle, welche die Tumorgewichte der subkutanen Tumoren nach Entnahme in Gramm zeigt, diese wurden nach Zugehörigkeit der Versuchsgruppen Wildtyp, LUC und CEACAM chronologisch sortiert.

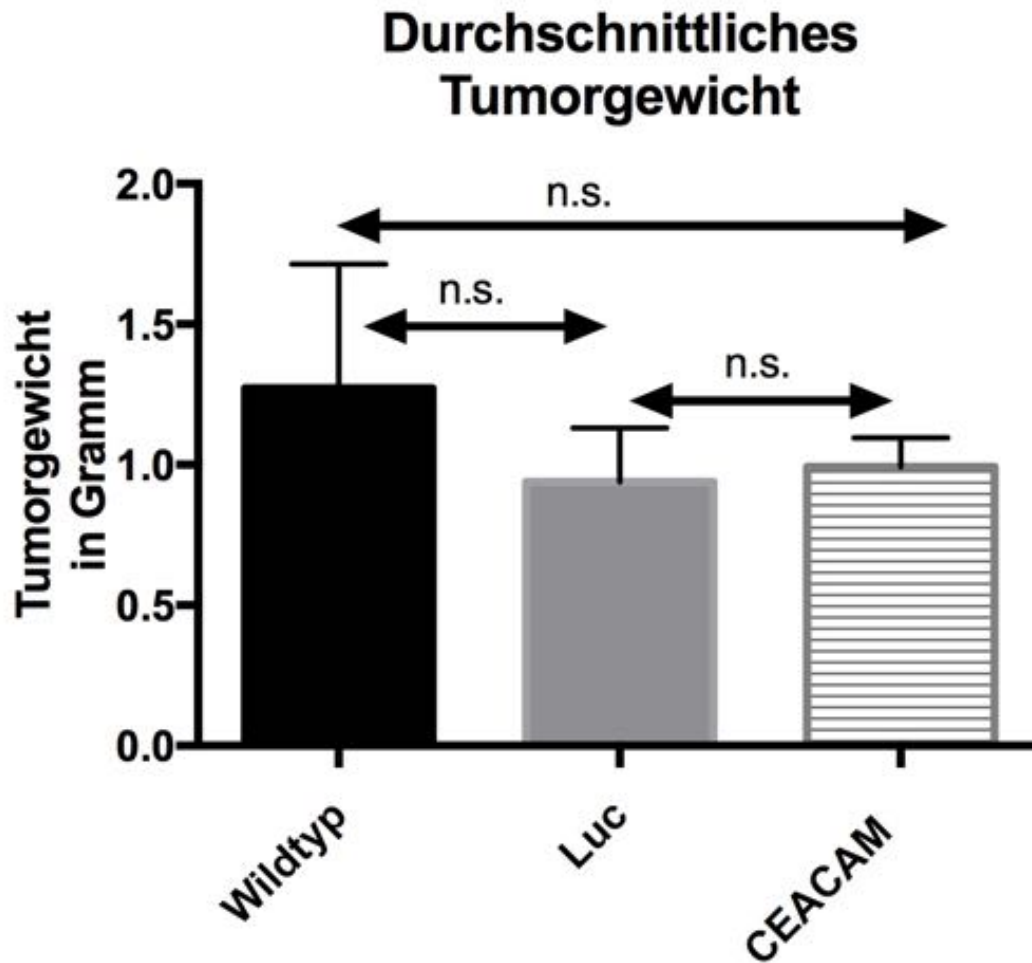


Abb. 3: Standardabweichung des durchschnittlichen Tumorgewichts

Dargestellt ist ein Säulendiagramm, welches das durchschnittliche Tumorgewicht nach SEM, Standardabweichung des Mittelwertes, darstellt und nach Versuchsgruppenzugehörigkeit unterteilt. Hierbei sieht man ein durchschnittliches Tumorgewicht beim Wildtyp von 1,27 g, LUC von 0,94 g und CEACAM von 0,99 g, dies ist bei ($p > 0,05$) untereinander nicht signifikant.

3.5 Analyse der Überlebenszeit

Kaplan Meier Überlebenskurve

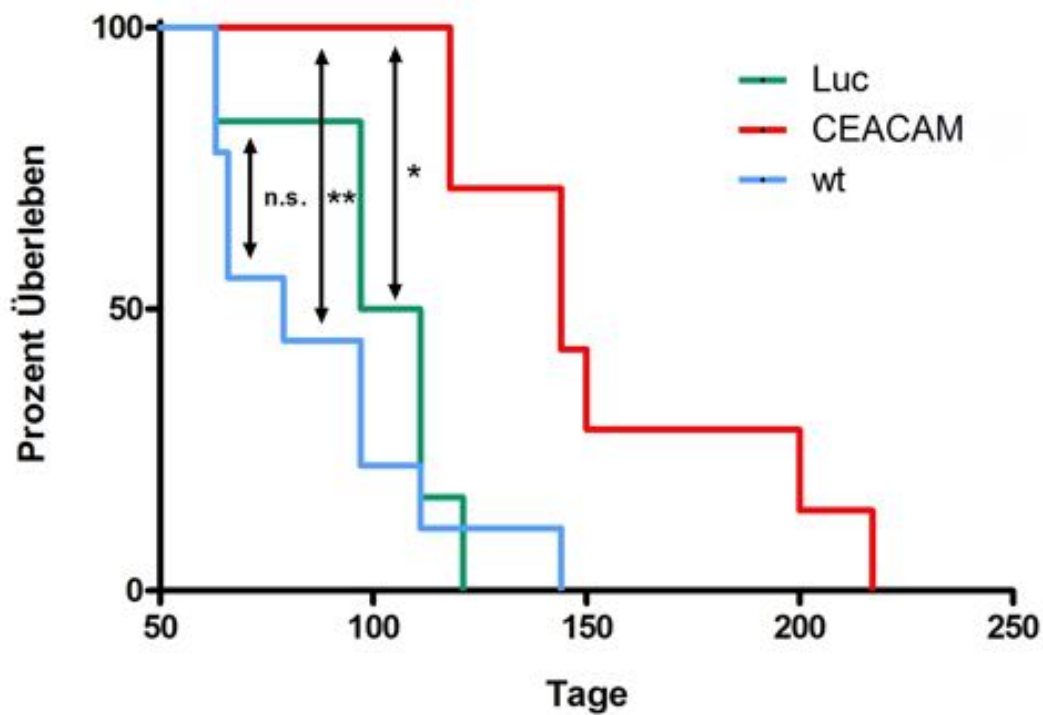


Abb. 4. : Überlebenszeit der Versuchstiere als Kaplan Meier-Kurve

Dargestellt ist eine Kaplan- Meier Kurve zu den Endzeitpunkten des Versuches nach Versuchsgruppen, wt= Wildtyp, CEACAM und Luc unterteilt. Mit einbezogen wurden Tumoren mit stetigem Tumorwachstum. Die Daten wurde mit dem Log Rank Test statistisch analysiert. Man sieht hier klar einen signifikanten Überlebensvorteil bei der CEACAM Gruppe gegenüber der Wildtyp- (** : signifikant $P = 0,0138$) und der Luc Gruppe (* : signifikant $P = 0,0027$). Zwischen der Wildtyp und der Luc Gruppe besteht hingegen kein signifikanter Unterschied (n.s. : nicht signifikant $P = 0,5178$).

x: Prozent Überleben, y: Anzahl der Überlebenstage

3.6 Histopathologische Auswertung

3.6.1 Makroskopische Beurteilung

Insgesamt wurden alle 23 Tumore des stetigen Wachstums in die Bewertung genommen. Bei der Präparation und Entnahme der Tumore konnte man in der makroskopischen Darstellung der Tumore Unterschiede zwischen den Untergruppen Wildtyp, LUC und CEACAM feststellen.

Alle Tumoren waren glatt begrenzt vom umliegenden Gewebe zu differenzieren. Sie präsentierten sich weißlich- gelblich an der Schnittkante, wobei man teilweise ulzerierende Bereiche makroskopisch erkennen konnte. Die Tumoren hatten sowohl solide als auch zystisch- bullöse Anteile, in dem sich ein weißlich- gelbliches, schleimiges Sekret entleerte.

Es zeigte sich eine Tendenz, dass die schneller wachsenden Tumoren eher zu Ulzerationen neigten, wobei die ersten sechs Tumoren ulzerierten und die langsamer wachsenden Tumoren eher eine zystische Morphologie hatten (siehe Tabelle 10). Man kann sehen, dass der Anteil der zystischen Tumore insgesamt überwiegt, 13 von 23 Tumoren (siehe Abb. 5). Es zeigte sich, dass die CEACAM Gruppe (sechs von sieben Tumoren) fast ausschließlich zystische Erscheinungen hatte (siehe Abb. 6).

Makroskopische Beurteilung der Tumore

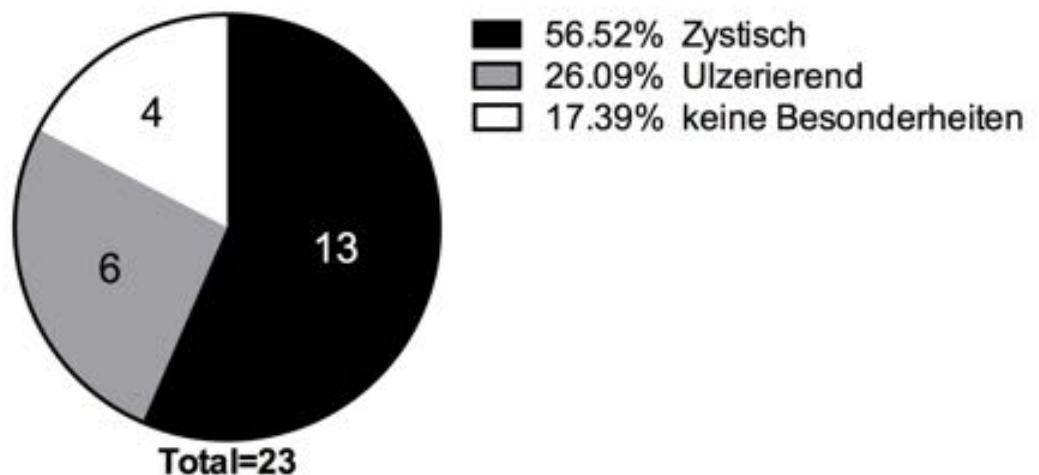


Abb. 5: Makroskopische Beurteilung der Tumore

Dargestellt ist ein Kreisdiagramm zur makroskopischen Beurteilung der Tumoren. Die Gesamtzahl der Tumore betrug hier 23, davon präsentierten sich 13 Tumore zystisch (56,62%), 6 ulzerierend (26,09%) und 4 Tumore zeigten keine makroskopischen Besonderheiten (17,39%).

Makroskopische Beurteilung der Tumoren nach Tumorgruppen unterteilt

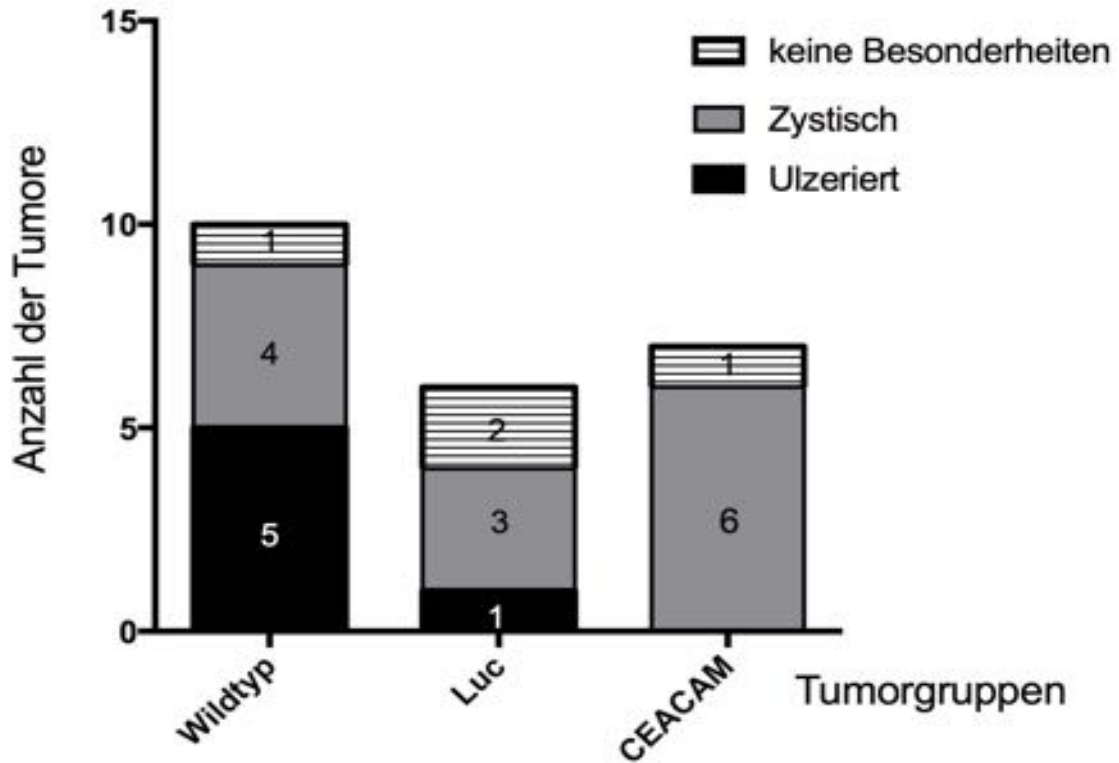


Abb. 6, Makroskopische Beurteilung der Tumore nach Versuchsgruppen unterteilt:

Dargestellt ist ein additives Säulendiagramm, welches nach den Versuchsgruppen Wildtyp, LUC und CEACAM die unterschiedliche makroskopische Ausprägung der Tumore mit stetigem Tumorwachstum zeigt. In der Wildtypgruppe zeigten sich 5 Tumore ulzerierend (50%), 4 zystisch (40%) und 1 Tumor ohne makroskopische Besonderheit (10%). Bei der LUC Gruppe zeigte sich hingegen 1 Tumor ulzerierend (16,66%) , 3 zystisch (50%) und 2 ohne makroskopische Besonderheit (33%). In der CEACAM Gruppe ist auffällig, dass sich die Tumore vorwiegend zystisch präsentieren, es zeigten sich keine ulzerierenden Tumore (0%), 6 zystische Tumore (85,71 %) und 1 Tumor zeigte makroskopisch keine Besonderheiten (14,29%).

3. Ergebnisse

Makroskopie der Tumore Unterteilung nach Morphologischem Erscheinungsbild

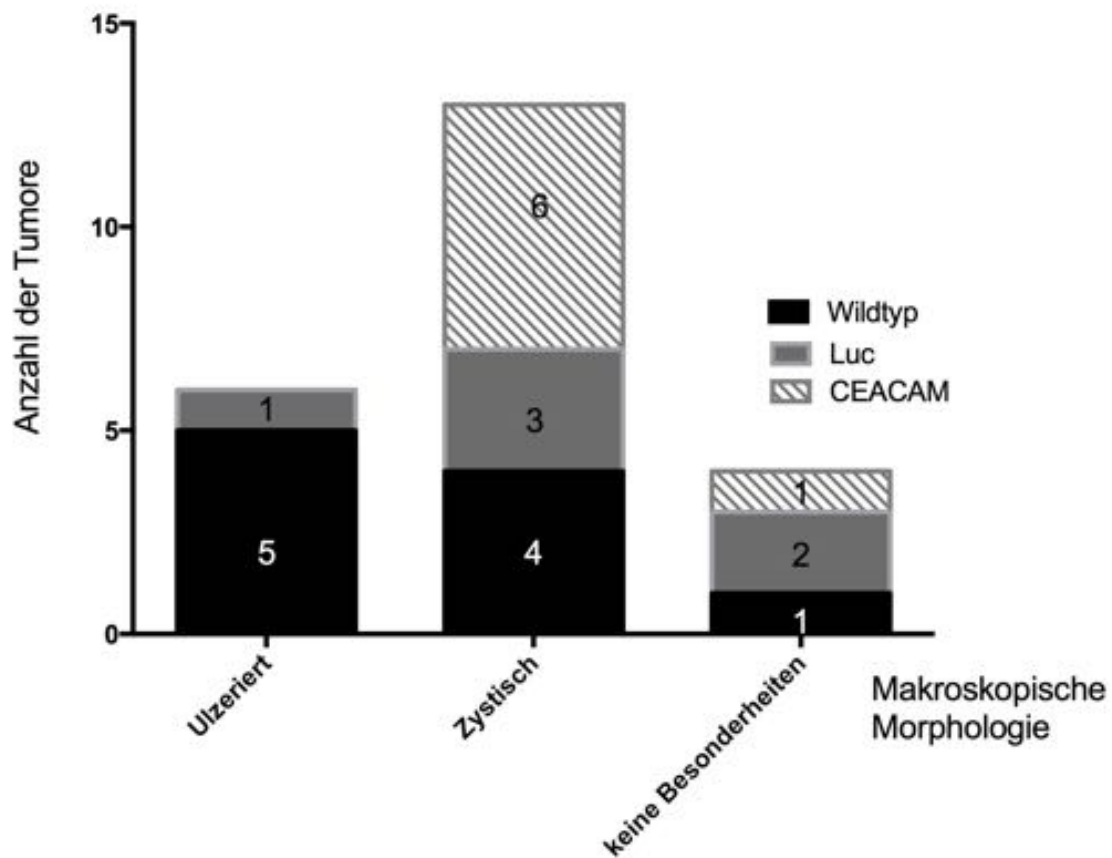


Abb. 7, Graphische Darstellung der makroskopischen Erscheinung der Tumore:

Dargestellt ist ein additives Säulendiagramm, welches die Anzahl der Tumore mit stetigem Tumorwachstum nach makroskopischer Morphologie unterteilt darstellt, diese werden nach ulzerierend, zystischen und makroskopisch ohne Besonderheiten unterteilt. Bei den ulzerierenden Tumoren waren 5 Tumore in der Wildtypgruppe (83,33%) vertreten, 1 Tumor in der Luc Gruppe (16,66%) und 0 in der CEACAM- Gruppe (0%). Die zystischen Tumoren fand man in allen Versuchsgruppen, wobei CEACAM mit 8 Tumoren dominierte, der Wildtyp 4 Tumore aufzeigte und in der LUC Gruppe 3 Tumore zystisch waren. Von den Tumoren ohne makroskopische Besonderheiten war 1 Tumor (25%) aus der Wildtypgruppe, 2 aus der Luc Gruppe (50%) und 1 aus der CEACAM Gruppe (25%).

3.6.2 Hämatoxylin- Eosin Färbung

Die Hämatoxylin- Eosin- Färbung wurde als Übersichtsfärbung der Tumore, zur Orientierung im Präparat und zur Färbung der Lungenschnitte verwendet. Hämalaun färbt hierbei die basophilen Strukturen blau, z. B. Zellkerne, RNA, DNA. Eosin färbt alle acidophilen Strukturen rot, zu denen unter anderen Zellplasmaproteine, Kollagene und Mitochondrien gehören (Aumüller et al. 2010).

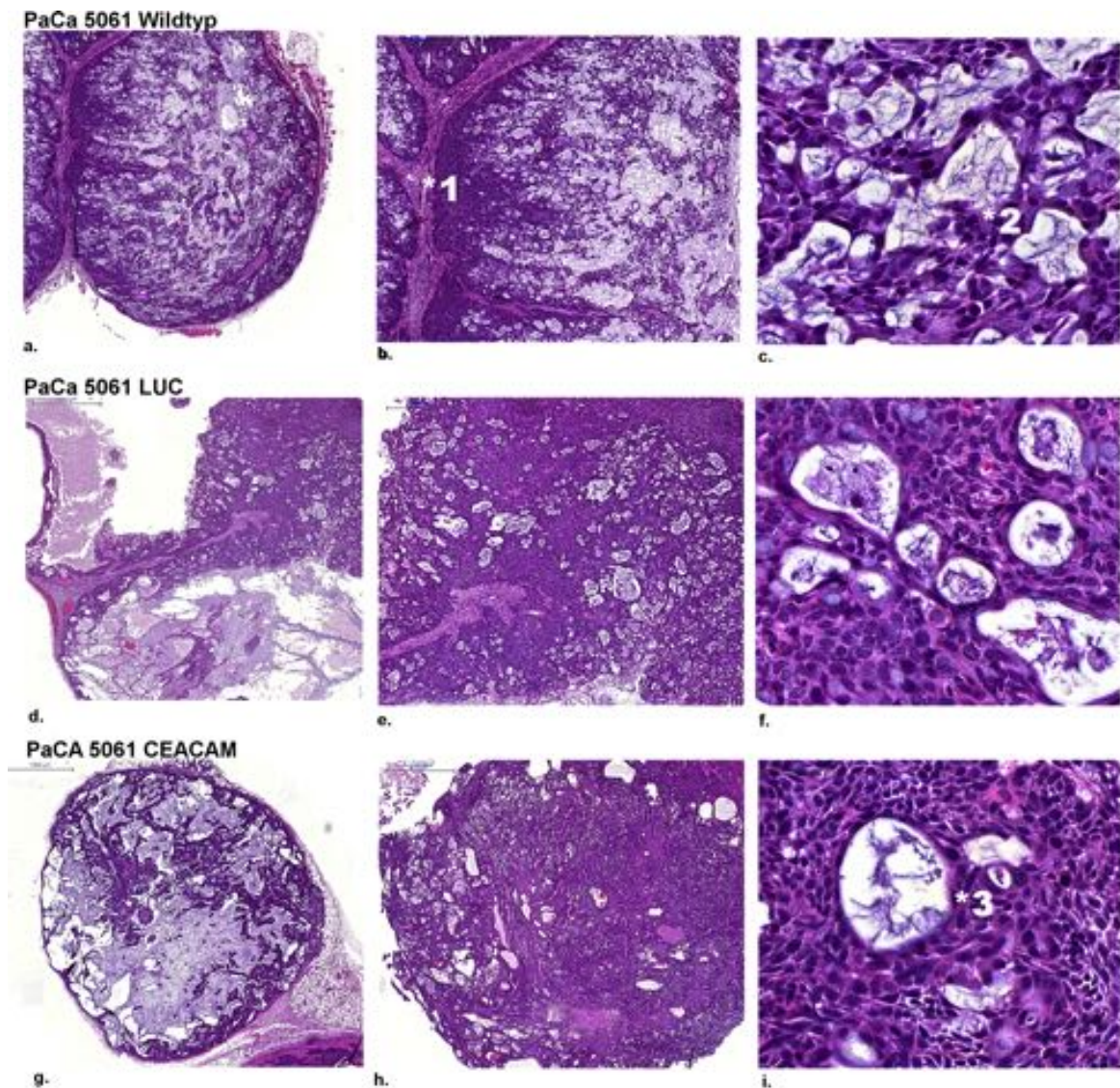


Abb. 8: PaCa 5061, H.E. Färbung

In diesen Abbildungen sieht man humane PaCa 5061 Zellen als subkutaner Primärtumor in pfp-rag2 Mäusen gewachsen in Hämatoxylin- Eosin gefärbt. a-c zeigen Übersichten und Vergrößerungen der PaCa 5061 Wildtyp Tumoren, d-f zeigen PaCa 5061 der LUC Gruppe und g-i zeigt Tumorausschnitte der PaCa 5061 CEACAM Tumoren. Es ließen sich, bis auf die im Teil 3.6.1 beschriebenen makroskopischen Unterschiede, keine auffälligen, histologischen Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen feststellen. Das histologische Bild der Tumore ist geprägt durch atypische, drüsenartig differenzierte Tumorzellen, welche durch Bindegewebssepten (*1) lobulär begrenzt sind. Man kann drüsengang-ähnliche Strukturen (*3) und Azini erkennen. Der Tumor besteht aus einem großen Anteil an muzinösen, schleimproduzierenden Siegelringzellen (*2), welche man an ihrem hellen Zytoplasma erkennen kann. Das Zellbild ist vorwiegend von kubischen Zellen geprägt, welche rund-ovale Zellkerne besitzen, die in Form, Größe und Lage stark variieren und selten Mitosefiguren zeigen.

3.6.3 CEACAM 1 Färbung

Bei der CEACAM 1 Färbung wurden alle 23 relevanten Tumore mit stetigem Tumorwachstum verwendet. Man kann deutliche Unterschiede zwischen den Tumoren der Wildtyp- und Luc- Gruppe im Vergleich zur CEACAM- Gruppe erkennen.

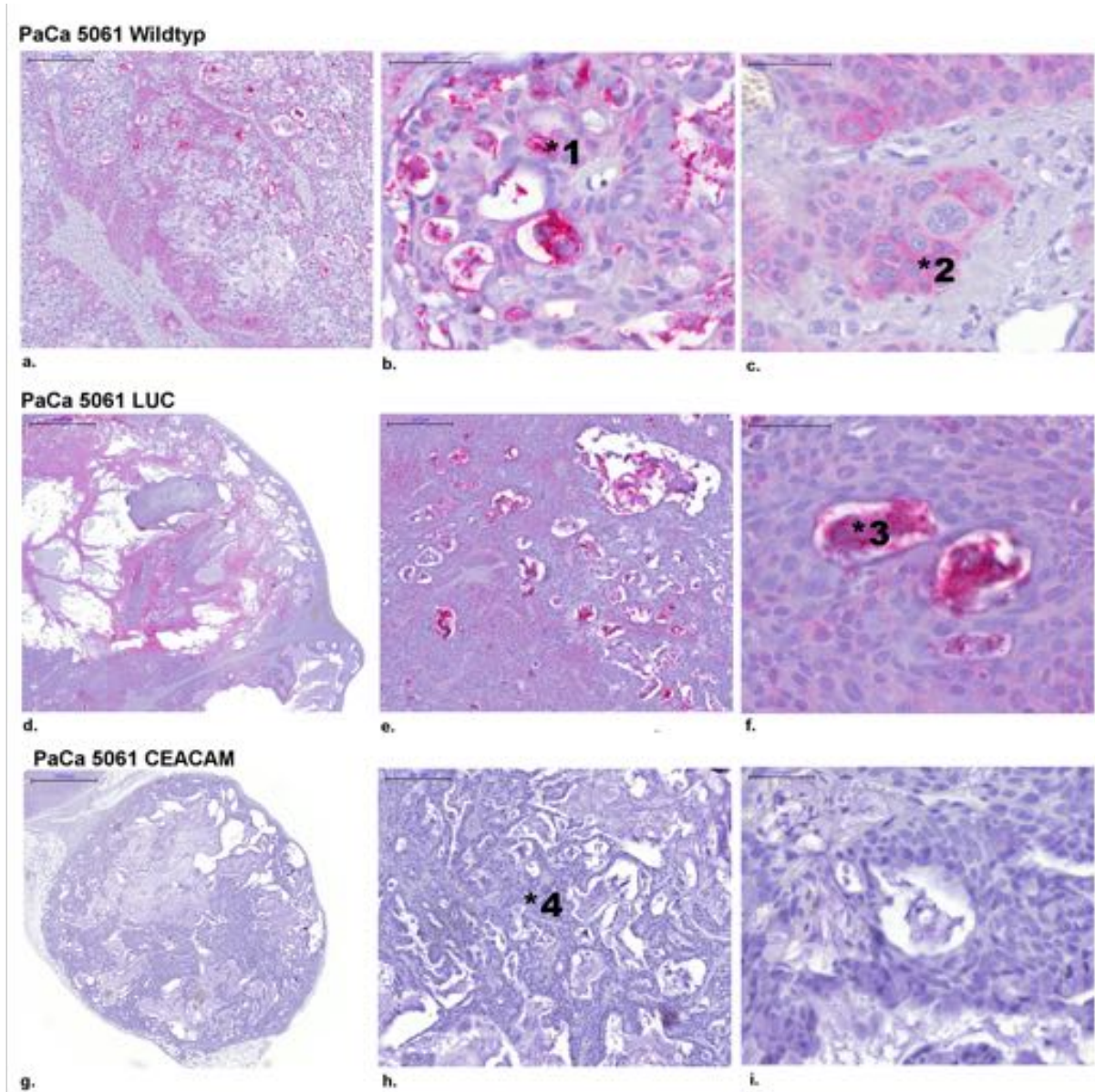


Abb. 9: PaCa 5061, CEACAM 1 Färbung

In diesen Abbildungen sieht man humane PaCa 5061 Zellen als subkutaner Primärtumor in pfp-rag2 Mäusen gewachsen in der CEACAM 1 Färbung. a-c zeigen Übersichten und Vergrößerungen der PaCa 5061 Wildtyp Tumoren, d.-f. zeigen PaCa 5061 der LUC Gruppe und g.-i. zeigt Tumorauschnitte der PaCa 5061 CEACAM Tumoren. Der drüsenähnliche Aufbau der PaCa 5061 Tumoren bleibt wie oben in Abbildung 8 beschrieben bestehen, diese Färbung zeigt nun das Verteilungsmuster der CEACAM 1 Moleküle an. Beim PaCa 5061 Wildtyp (a-c) kann man eine starke Expression der CEACAM 1- Moleküle in luminalen Strukturen im Bereich der Zellmembran erkennen, ebenso findet man eine Anhäufung des roten Farbstoffes im Bereich des Zytoplasmas (*2) der Zelle, welches sich zu den Oberflächenmembranen hin konzentriert (*1). Diese zytoplasmatisch-CEACAM 1 positiven Tumorzellen sind jedoch nicht homogen im Tumor verteilt, sie tauchen nest-, bzw. inselartig im Tumor auf. In nekrotischen Arealen wurde CEACAM 1 positive extrazelluläre Immunreaktivität verstärkt vorgefunden. Nekroseareale sind jedoch häufig unspezifisch angefärbte, extrazelluläre Strukturen. Ein ähnliches Verhalten kann man bei der LUC- Gruppe (d.-f.) beobachten. In der Übersichtsaufnahme erkennt man zu den großen, zystisch- angelegten Lumina hin eine verstärkte CEACAM Expression sowie in den kleinen gangähnlichen Lumina eine Ansammlung stark CEACAM 1- positiver Strukturen (*3). Das Zytoplasma der Tumorzellen verhält sich ebenso sehr ähnlich mit der leicht inhomogenen Expressierungen im Gesamtzellbild. Intrazellulär wird die zytoplasmatische Rotfärbung jedoch zur Membran hin intensiver. Dies kann Hinweise auf die membranöse verstärkte Expression und intrazelluläre Kontaktfunktion von CEACAM 1 sein.

3. Ergebnisse

Bei der CEACAM -Gruppe (g.-i.) sieht man auf den ersten Blick eine homogene Blaufärbung (*4) der Gegenfärbung, hierbei sieht der histologische Aufbau im Vergleich zu den anderen Subgruppen nicht verändert aus. Wenn man genauer alle Areale der Schnitte abfährt, kann man in dieser Färbung ein Areal finden, in denen luminal vereinzelt Strukturen mit CEACAM 1 positiver Substanz zu finden sind.

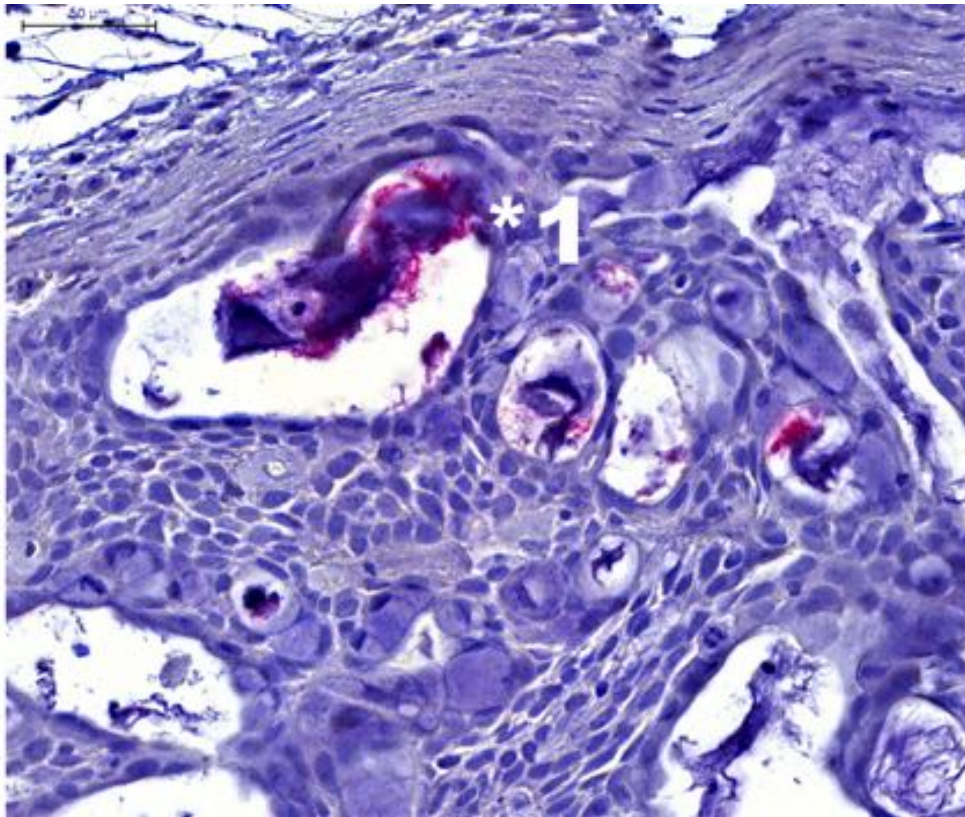


Abb. 10: PaCa 5061, CEACAM 1 Färbung, CEACAM Gruppe

In diesen Abbildungen sieht man humane PaCa 5061 Zellen der CEACAM Knockdowngruppe als subkutaner Primärtumor in pfp-rag2 Mäusen gewachsen in der CEACAM 1 Färbung gefärbt. Man sieht hier beispielhaft, die sehr selten, jedoch teilweise vorkommenden, intraluminal liegende CEACAM 1 positive Bereiche (*1), welche als nekrotische Zellreste ebenso mit angefärbt werden können und als unspezifisch zu werten sind.

3. Ergebnisse

3.6.4 CEACAM 5 Färbung

Bei der CEACAM 5 Färbung wurden alle 23 relevanten Tumore mit stetigem Tumorwachstum verwendet.

Man kann hier ebenso deutliche Unterschiede zwischen den Tumoren der Wildtyp- und Luc- Gruppe im Vergleich zur CEACAM- Gruppe erkennen.

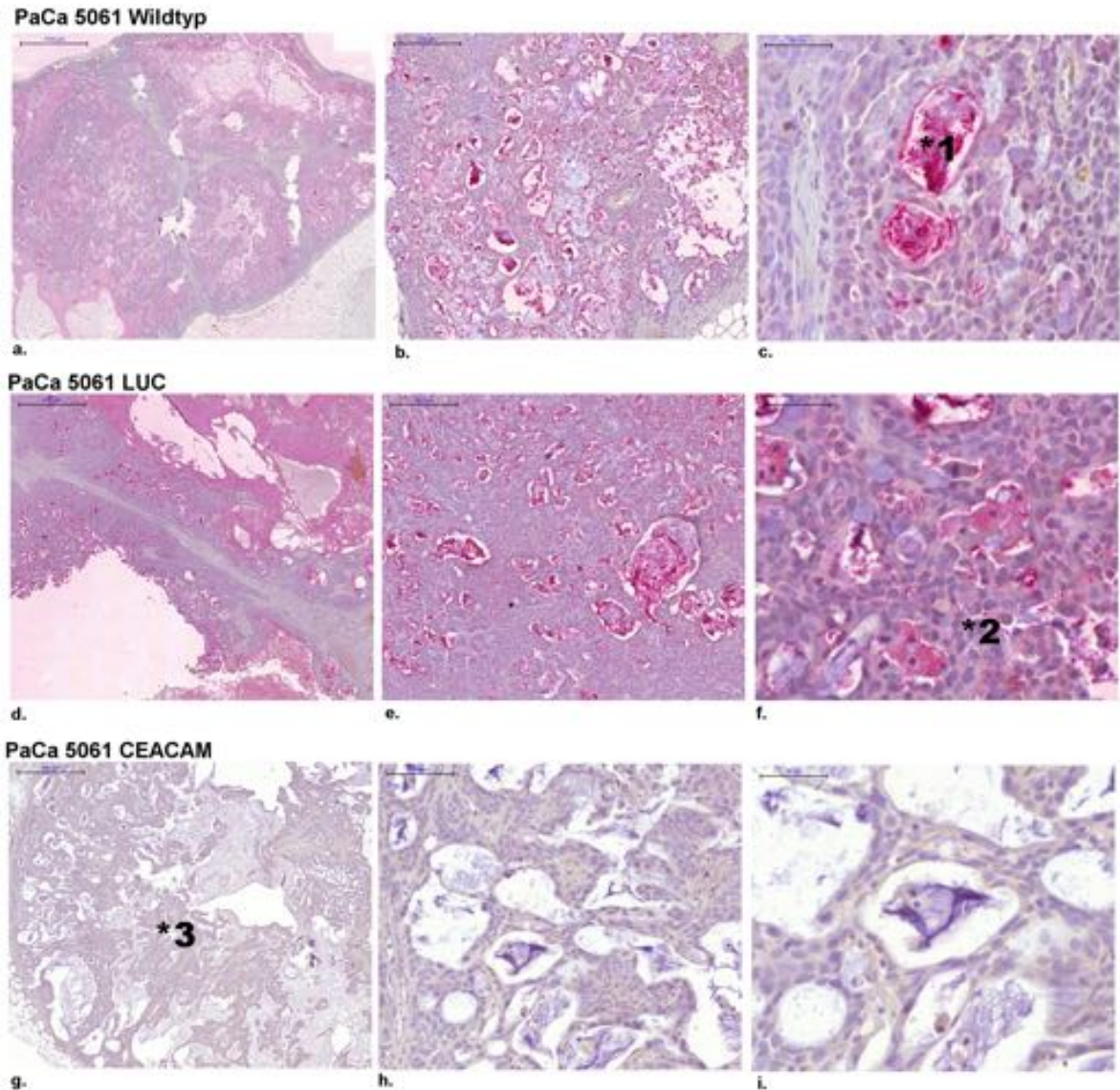


Abb. 11: PaCa 5061, CEACAM 5 Färbung

In diesen Abbildungen sieht man humane PaCa 5061 Zellen als subkutaner Primärtumor in pfp-rag2 Mäusen gewachsen in der CEACAM 5 - Färbung. a.-c. zeigen Übersichten und Vergrößerungen der PaCa 5061 Wildtyp Tumoren, d.-f. zeigen PaCa 5061 der LUC Gruppe und g.-i. zeigt Tumorausschnitte der PaCa 5061 CEACAM Tumoren. Der drüsenähnliche Aufbau der PaCa 5061 Tumoren bleibt, wie oben in Abbildung 8 beschrieben, bestehen. Diese Färbung zeigt nun das Verteilungsmuster der CEACAM 5 Moleküle an.

Die Wildtypgruppe (a.-c.) präsentiert sich in der CEACAM 5- Färbung sehr ähnlich zu der CEACAM 1- Färbung. Es werden hierbei ebenso die vorwiegend die luminalen, drüsengangartigen Strukturen verstärkt angefarbt (*1) mit nekrotisch, intraluminalen CEACAM 5 positiven, unspezifischen Zellresten. Das Zytoplasma der meisten Tumorzellen ist leicht rot gefärbt und somit CEACAM 5 positiv, wobei sich zu den Zellmembranen hin das Signal sehr verstärkt. Insgesamt zeigt sich ein homogeneres Bild der CEACAM 5- Expression im Gesamtzellbild des Tumor im Vergleich zur CEACAM 1- Färbung.

Die LUC- Gruppe (d.-f.) verhält sich in der CEACAM 5- Färbung ebenso wie die Wildtyp- Gruppe. Der luminalen Saum der drüsenartigen Tumorzellen ist ebenso hervorgehoben in dieser Darstellung, um die hohe Expression an der Membran zu zeigen. Das Zytoplasma zeigt sich ebenso fast homogen CEACAM 5 positiv (*2).

3. Ergebnisse

In der CEACAM Gruppe (g.-i.) wurden keine roten, CEACAM 5 positiven Areale gefunden. Man kann hier deutlich lediglich die blaue Gegenfärbung (*3) erkennen. Es sind hier keine intraluminale, extrazelluläre, nekrotische Areale CEACAM 5 positiv anfärbbar. Man kann folglich deutlich den erfolgreichen CEACAM 5 Knockdown erkennen.

3. Ergebnisse

3.6.5 CEACAM 6 Färbung

Bei der CEACAM 6 Färbung wurden alle 23 relevanten Tumore mit stetigem Tumorwachstum verwendet. Man erkennt wieder starke Unterschiede zwischen den Tumoren der Wildtyp- und Luc- Gruppe im Vergleich zur CEACAM- Gruppe.

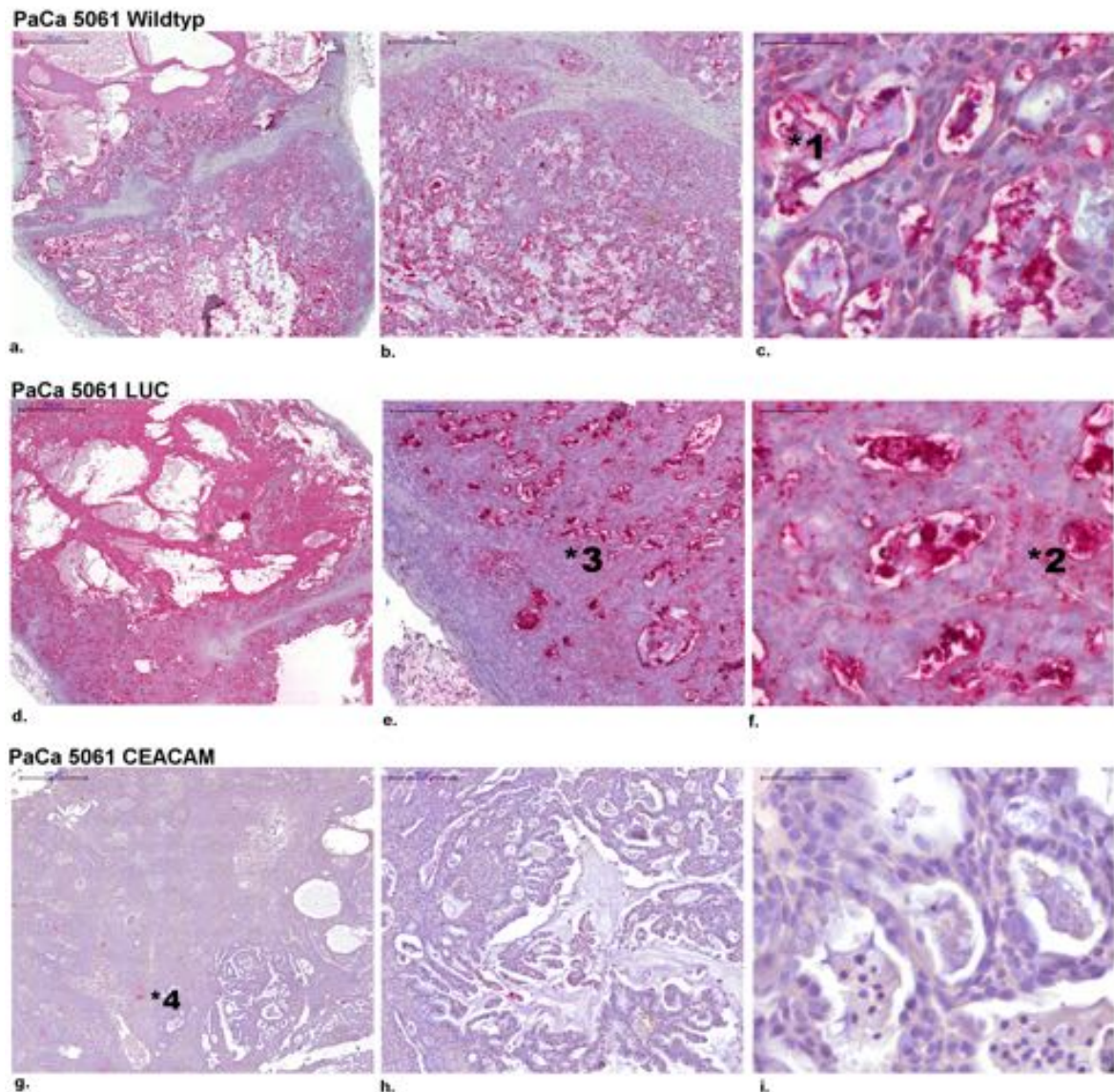


Abb. 12: PaCa 5061, CEACAM 6 Färbung

In diesen Abbildungen sieht man humane PaCa 5061 Zellen als subkutaner Primärtumor in pfp-rag2 Mäusen gewachsen in der CEACAM 6 - Färbung. 1a-c zeigen Übersichten und Vergrößerungen der PaCa 5061 Wildtyp Tumoren, d.-f. zeigen PaCa 5061 der LUC Gruppe und g.-i. zeigt Tumorauschnitte der PaCa 5061 CEACAM Tumoren. Der drüsenähnliche Aufbau der PaCa 5061 Tumoren bleibt wie oben in Abbildung 8 beschrieben bestehen, diese Färbung zeigt nun das Verteilungsmuster der CEACAM 6 Moleküle an. Das Verteilungsmuster der CEACAM 6 positiven Areale ist bei der Wildtyp- Gruppe (a.-c.) und LUC- Gruppe (d.-f.) präsentiert sich gleich.

Wie schon in den CEACAM 1 und 5 Färbungen konzentrieren sich die CEACAM 6 positive Bereiche auf luminalen Strukturen (*1) sowie leicht auf zytoplasmatische Substanzen (*2). In den Übersichten der Wildtyp- (a) und LUC- Gruppe (d.) kann man zudem eine, im Vergleich zur Peripherie, zentral verstärkte rote Anfärbbarkeit feststellen. Diese reichert sich an den luminalen Strukturen der gangartig angeordneten Tumorzellen, den luminalen Randsaum, und an den nekrotischen, intraluminalen Bereichen an. Da im Zentrum der Tumore vermehrt gangartige, apikale Strukturen und intraluminal Bestandteile und Nekrosen sind, ist die Dichte der Rotfärbung dadurch zu erklären. Vergleicht man die Bereiche der blauen Gegenfärbung mit den roten CEACAM 6 positiven Bereichen, sieht man diese vor allen zwischen den Zellen dies weist somit auf das Vorkommen von CEACAM 6 an den Oberflächenmembran und Zell- Zellkontakte hin.

Die CEACAM 6 Färbung der CEACAM- Gruppe (g.-i.) zeigt hauptsächlich eine homogene blaue Gegenfärbung, allerdings auch einige, wenige Areale (*4) mit positivem Nachweis von CEACAM 6, welches man gut an der Übersicht

3. Ergebnisse

erkennt. Die positiven Areale befinden sich hierbei hauptsächlich intraluminal an gangähnlichen Strukturen und werden in der nächsten Abbildung aufgeführt.

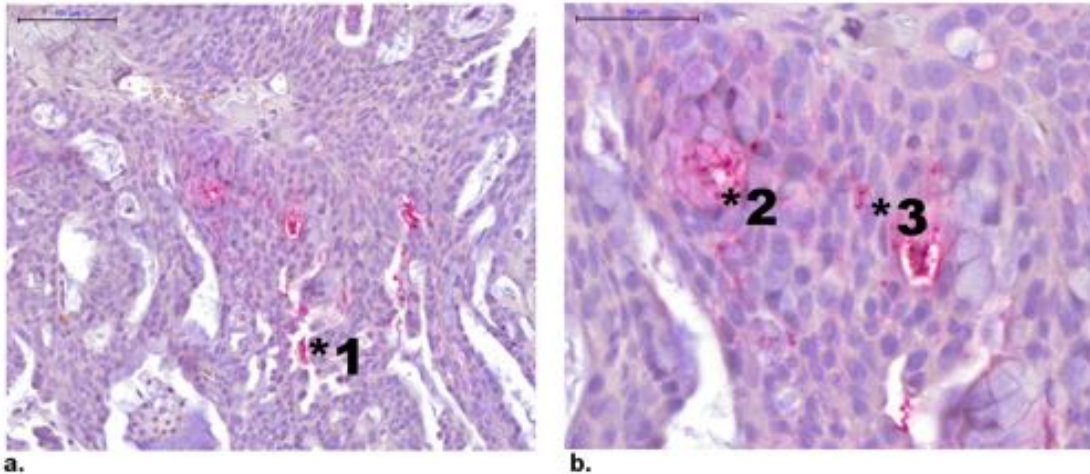


Abb. 13: PaCa 5061, CEACAM Knockdown, CEACAM 6 Färbung

In diesen Abbildungen sieht man humane PaCa 5061 Zellen der CEACAM Knockdowngruppe als subkutanen Primärtumor in pfp-rag2 Mäusen gewachsen in der CEACAM 6 Färbung. Der Fokus in diesen Übersichten liegt auf die partiell auftretenden, roten CEACAM 6 positiven Areale. Man kann hier die vereinzelt, inselartige Areale mit CEACAM 6 positiven Strukturen erkennen, welche sowohl intraluminale, extrazelluläre positive Bereiche (*1) zeigen. Ähnliches konnte man auch bei der CEACAM 1 Färbung bereits beobachten, diese sind eher als unspezifische, nekrotische Zellreste zu werten. Man sieht bei dieser Färbung zusätzlich 3 Bereiche, in denen CEACAM 6 auch im Bereich der Zellkernmembran, vor allem apikal (*2) und teilweise im Bereich der Zellkerne (*3) vorkommt. Dies könnte ein Zeichen einer Reexpression oder nicht vollständigem Knockdown der CEACAM 6 Strukturen bedeuten und wird im Verlauf der Arbeit weiter diskutiert.

3.6.6 Auswertung der Lungenschnitte

Es konnten sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch in keiner der Lungenschnitte Hinweise auf Tumorzellen gefunden werden.

3.7 PCR Auswertung disseminierter Tumorzellen

Das EDTA Blut der Mäuse wurde verwendet, um durch eine PCR- Analyse disseminierte Tumorzellen zu detektieren. Hierbei wurden Nullkontrollen für die Referenzwerte auf jeder PCR Platte verwandt.

In diesem Versuch wurden keine Tumorzellen sicher nachgewiesen. Man kann also keinen weiteren Hinweise auf ein signifikant unterschiedliches metastatisches Verhalten zwischen den Untergruppen des PaCa 5061 Adenokarznoms gewinnen.

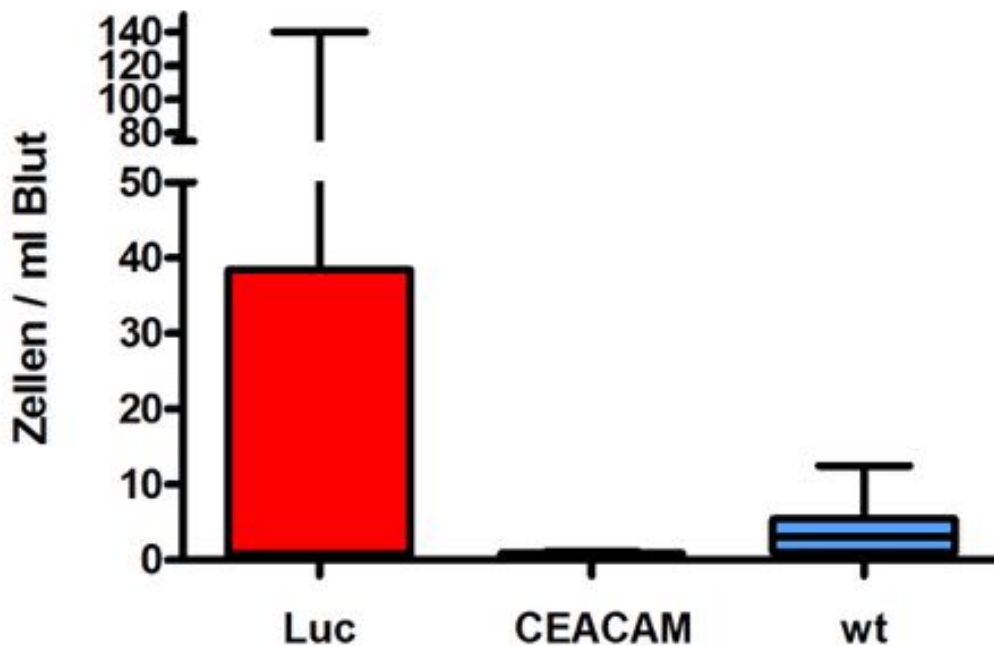


Abb. 14 : PCR- Auswertung disseminierter Tumorzellen:

Dargestellt ist ein Blox-Plot Diagramm, welches quantitativ die humane Tumorzellen pro ml murinen Mausblut der 3 Versuchssgruppen Luc, CEACAM und wt= Wildtyp in einem Kastdiagramm mit Streuung darstellt. Es wurde ein sicherer Nachweis von mehr als 3 Zellen/ ml festgelegt aufgrund der Nullkontrollen auf der PCR Platte. Beim Diagramm sieht man eine sehr große Streuung der Werte, es traten bei 2 Versuchstieren der Luc und 2 der Wildtypgruppe ein Nachweis von humanen Zellen im peripheren Blut auf. Bei CEACAM konnte man keine humanen Zellen im peripheren Blut nachweisen. Man sieht daher bei den 2 Versuchsgruppen eine breitere Streuung als bei CEACAM, wenn man jedoch die Medianwerte der Zellen pro milliliter Blut der Gruppen vergleicht (Luc= 0,84, CEACAM= 0,58 und wt= 2,36- zellen/ml Blut, kann man klar keine Signifikanz zwischen der Luc und Ceacamgruppe nachweisen (P= 0,17 nach Man Whitney Testung) und somit keinen signifikanten Nachweis einer vermehrten peripheren Tumorausssaat zwischen den Gruppen bestätigen.

x: Zellen/ml Blut, y: Versuchsgruppen: Luc, CEACAM und wt= Wildtyp

4. Diskussion

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, wie weit die Expression von CEACAM 1, 5 und 6 einen Einfluss auf den primären und den distanten Tumorwachstum beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas hat. Hierfür wurde ein murines Xenograftmodell, sowie die schon gut etablierte und charakterisierte Zelllinie PaCa 5061 verwendet.

Das Oberflächenmolekül CEACAM ist an vielen der oben genannten Signalwege beteiligt, es spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese, der Signaltransduktion und Interaktion mit dem Zytoskelett, der Zelladhäsion, als Tumorsuppressoren und ist an Modulationen im Immunsystem beteiligt. Im Fall einer malignen Transformation von Zellen sind diese Moleküle häufig überexprimiert- bei Tumoren gastrointestinalen und vor allem epithelialen Ursprunges werden Überexpressionen von CEACAMs beobachtet (Horst und Wagener 2004, Duxburry et al. 2004).

Der vorweg durchgeführte Zell- Proliferationsversuch mit dem Wildtyp PaCa 5061 und den veränderten Zelllinien LUC- und CEACAM- Knockdown konnte die bereits von Kalinina et al. 2010 beschriebene Wachstumsmorphologien und verringerte Wachstumsgeschwindigkeit empirisch bestätigen. Der darauf folgende murinen Xenographversuch konnte regelrecht durchgeführt werden und bestätigte die Trends der in vitro- Versuche. Hierzu wurden in 3 Versuchsgruppen Wildtyp-, LUC- und CEACAM- Zellen subkutan in die Nackenfalte der Mäuse injiziert.

Wie sich hierbei zeigte, kam es zu einer unterschiedlichen Anwachsrate der Tumorzellen im murinen Xenograftmodell. Die unveränderten Zellen zeigten eine Anwachsrate von 100 %, wobei die transfizierten Zellen eine niedrigere Anwachsrate zeigten (70 % und 60 %). Dies ist grundsätzlich nicht ungewöhnlich und hat sich bereits empirisch in anderen Versuchen des Institutes gezeigt, es wird deshalb vermutet, dass ein Eingriff auf die Transkription und Translation innerhalb der Tumorzelle zu einem verminderten Anwachsen im in vivo Tumormodell führen kann. Interessant war, dass es zwischen den transfizierten Kontrollzellen LUC und den CEACAM- Knockdown Zellen keinen signifikanten Unterschied gab.

Das **Gewicht** der Tumore, im Bezug zur Gruppenzugehörigkeit, zeigte keinen signifikanten Unterschied. Trotz aller Sorgfalt perforierten die zystischen Strukturen teilweise bei der Präparation, somit mussten die Tumorgewichte mit und ohne zystischem Inhalt gewogen werden, so dass diese Daten nicht sinnvoll verglichen werden können (siehe 3.4).

4. Diskussion

Es wurden immunhistochemische spezifische **Färbungen** für CEACAM 1,5 und 6 vorgenommen. Färbungen an den in der Maus gewachsener Tumore zeigten, dass die CEACAM- Knockdowns auch nach dem Wachstum stabil blieben, ebenso die unveränderte Überexpression und das Verteilungsmuster von CEACAM in der Wildtyp- und LUC- Gruppe. CEACAM positive Bereiche wurden verstärkt in gangartigen Strukturen, luminalem Randsaum, Membranen und Zell-Zell-Kontaktstellen gefunden, welches die funktionelle Verteilung der CEACAM- Moleküle bezüglich der Adhäsion aufzeigt. Es wurden hoch positive Areale im Bereich von Nekrosen gefunden, welche jedoch extrazellulär und häufig auch im Lumen der gängartigen Tumorbereiche vorzufinden waren und als unspezifische Anfärbung zu werten sind.

Bei den inselartigen, auch intrazellulär vereinzelt gefundenen, positiven Arealen in der CEACAM 6 Färbung muss überlegt werden, ob es durch eine Re- Mutation im Genom zu einer erneuten Re- Expression der CEACAM 6 Oberflächenmoleküle gekommen sein kann. Es kann allerdings darin begründet sein, dass die Zelllinien Knockdowns darstellen und keine totalen Knockouts sind und somit Restresiduen darstellen, die in vereinzeln den Zellen übrig geblieben sind.

Der bereits in den Zellversuchen zu sehende, langsamere **Tumorwachstum** der CEACAM- Gruppe, konnte sich im murinen Xenograftmodel deutlich bestätigen. Die Kaplan-Meier Überlebensanalyse zeigte einen Unterschied der Überlebensdauer der Mäuse (siehe Abb. 4). Folglich kann man von einem Überlebensvorteil der CEACAM Knockdown Gruppe im Bezug auf die Wildtyp- und LUC- Gruppe sprechen. Das Blockieren von CEACAM in Adenokarzinomen des Pankreas würde somit ein verlangsamtes, primäres Tumorwachstum erzeugen.

Die Auswertung der Lungenpräparate zeigte keinen einzigen Fund von **Metastasen**. Die quantitative PCR- Auswertung der Blutproben zur Detektion von Tumorzellen erwies sich ebenso als hinweislos, da die Ergebnisse nicht signifikant waren. Somit kann man keine Aussage bezüglich der Metastasierungs- Neigung und des distanten Tumorwachstums in diesem Versuch tätigen. Die Frage bleibt jedoch, wieso eine Zelllinie mit hoher metastatischer Neigung in allen 3 Zellgruppen keine solche ausgebildet hat. Das hier gewählte Versuchsmodell lässt in Bezug auf die Verlängerung des Abbruchzeitraums keinen weiteren Spielraum zum Schutz der Tiere zu, ansonsten hätte man überlegen können, dass der distante Tumorwachstum im späteren Zeitpunkt des Versuches eintreffen würde und man dieses weiter untersuchen könnte.

4. Diskussion

Auf der Suche nach neuen **Früherkennungen von Karzinomen** rücken Tumormarker in den Fokus, welche sich jedoch bisher aufgrund der geringen Spezifität nicht zum Screening eignen. Das Oberflächenmolekül CEACAM könnte als Biomarker zur Früherkennung dienen und eine wichtige Rolle in der zukünftigen Therapie von gastrointestinalen Karzinomen, insbesondere dem Pankreaskarzinom, spielen. Man könnte präzisere Ergebnisse mit prognostischer Relevanz bei Hinzunahme von weiteren Faktoren zum etablierten Tumormarker CA 19-9 für Pankreaskarzinome erreichen.

Hierzu zeigt sich im Paper von Ni et al. 2005 eine Korrelation bezüglich der Höhe der Expression der Tumormarker und der Überlebensdauer. Es lassen sich somit Rückschlüsse auf die Aggressivität des Tumors ziehen. Hierbei wurde gezeigt, dass je mehr Tumormarker (CEA, CA 19-9 und CA 242) positiv waren und je höher das Level der Expression, desto kürzer wurde die Überlebensdauer und somit desto schlechter die Prognose des Patienten.

Es zeigte sich, dass CEACAM 1 durchaus Potential eines diagnostischen Markers beim Pankreaskarzinom hat, da es in Kombination mit CA 19-9 signifikant spezifischer auf ein malignes Pankreasgeschehen hinweist (Simeone et al. 2007, Liang et al 2009). Die Verbesserung der Spezifität des Tumormarkers CA 19-9 konnte ebenso durch die Hinzunahme von SAA (Serum Amyloid A) und Haptoglobin erreicht werden (Firpo et al. 2009). Bei entzündlichen Prozessen, wie chronischer Pankreatitis, dominierten sie jedoch nicht im Bezug auf die Spezifität des Testergebnisses (Grote et al. 2007). Als Früherkennungsscreening sind diese Marker, unter anderem auch CEACAM 1, daher noch nicht verwendbar.

Bei den endokrinen Tumoren des Pankreas mit erhöhter CEACAM 1- Expression konnten Korrelationen zwischen der Überexpression, einem erhöht aggressivem Verhalten und erhöhter Invasivität der Tumore gefunden werden (Serra et al. 2009). CEACAM 1 könnte hier für ein genaueres Verlaufscreening dienen und einen prognostischen Hinweis auf die Aggressivität des Tumors geben. Dies müsste auch in Bezug auf die exokrinen Adenokarzinome des Pankreas untersucht werden.

CEACAM 6 wurde ebenso als Tumormarker in Betracht gezogen und im Bezug auf den Einfluss des Hormonrezeptorstatus des Mammakarzinoms und somit Erfolg einer Targettherapie mit Tamoxifen, einem Östrogenrezeptorblocker, untersucht. Die Daten weisen darauf hin, dass CEACAM 6 einen Einfluss auf die endokrine Resistenz dieser Tumoren hat (Maraga et al. 2008). Somit könnte CEACAM 6 ein weiterer Prädiktor des klinischen Verlaufs und dem Ansprechen der Targettherapie mit Tamoxifen sein. Eine

4. Diskussion

gezielte Targettherapie der CEACAM 6 Rezeptoren sollte hier in Erwägung gezogen werden, um eine Verbesserung der derzeitigen Chemotherapie zu erreichen.

In weiteren Studien verglich man high- grade Adenokarzinome des Pankreas mit low-grade PanIn-Läsionen auf die Expression von CEACAM 6 hin. Hierbei zeigte sich deutlich, dass CEACAM 6 vermehrt in high-grade Tumoren zu messen war und ein Fehlen von CEACAM 6 mit einem geringeren Auftreten von Metastasen, einem längeren Überleben und einem niedrigeren Krankheitsstadium einher ging, CEACAM 6 eignet sich als Prognosefaktor und bleibt auch als mögliche Option einer Targettherapie für das Adenokarzinom des Pankreas interessant (Duxbury et al. 2005).

Ein weiterer Ansatz der Diagnostik von Tumoren bietet derzeit die sogenannte Immunsignatur, welche auch am Pankreaskarzinom in den ersten Versuchen erfolgreich getestet wurde. Hierbei werden durch Microarray- Untersuchung eine Massen-Antigen- Untersuchung von Patientenseren durchgeführt, welche sich bei den erkrankten Personen tumorspezifisch unterschieden und eine Testgenauigkeit zwischen 95-98% aufwiesen (Stafford et al. 2014). Hierzu soll es in Zukunft noch weitere klinische Studien geben, da dieses Verfahren sowohl für die Diagnostik als auch für das Screening des Pankreaskarzinoms eine interessante neue Methode bietet. Man könnte sich überlegen, ob die Immunsignatur als Früherkennung in Kombination von bereits etablierten Tumorfaktoren des Pankreaskarzinoms, wie CA 19-9, CA 242 und CEA, und der Hinzunahme von weiteren Faktoren, wie CEACAM 1 und 6, zu einer verbesserten Spezifität und Sensitivität von Screeninguntersuchungen des Pankreaskarzinoms führen könnte. Die hohe Sterblichkeit bei Pankreaskarzinomen liegt unter anderem auch an der meist sehr späten Ersterkennung und des meist fortgeschrittenen Stadiums der Erkrankung. Um zukünftig bessere Gesamtüberlebensergebnisse zu erzielen, sollte sowohl an einer Verbesserung der Therapie, als auch an einer effektiven Früherkennung gearbeitet werden. Minimalinvasive Untersuchung, wie beispielsweise eine Blutuntersuchung mit hoher, verbesserter Spezifität und Sensibilität sind hierzu gute Ansatzpunkte.

In einer weiteren Studie wurden bei kurativen Ansätzen die präoperativen CEA, also CEACAM 5, und CA 19-9 Serumspiegel abgenommen und mit den postoperativen Verläufen verglichen. Hierbei korrelierten hohe Serumwerte mit einer schlechten Prognose, insbesondere beim Tumorstadium pT 3/4 des duktales Adenokarzinom des Pankreas. Auch wenn CEACAM 5 und CA 19-9 nicht für ein Screening des Pankreaskarzinoms geeignet sind, sollte überlegt werden, ob es einen klinischen Nutzen durch die Bestimmung der Serumwerte vor kurativen Ansätzen mit Operationen

4. Diskussion

geben könnte, um eine verbesserte Risikoabschätzung der Verläufe zu bekommen. Dies könnte auch bei strittiger OP- Indikation zur Entscheidungsfindung verhelfen. (Distler et al 2013)

Ähnlich wie in der Mammakarzinomtherapie werden beim Pankreaskarzinom neue Ansätze der Chemotherapie in der Immunotherapie, oder auch gezielte Therapie genannt, dringend gesucht. Es gilt mit gezielten, tumorspezifischen Rezeptorblockern additiv zur Chemotherapie die Progression, Wachstum und Metastasierung zu verhindern und das Überleben zu verlängern. In einer Studie zum Adenokarzinom der Lunge wurde die Mutationsrate der EGFR- Rezeptoren, und somit deren Sensitivität und Ansprechen auf EGFR- Blocker, mit dem Rezeptorstatus von CEACAM (CEACAM 6 und 3) verglichen. Man vermutet einen Bezug zwischen EGFR- Mutationen und Expressionsmuster von CEACAM der Adenokarzinomzellen (Kobayashi et al. 2012). Wenn also durch CEACAMs eine Modulation des EGF- Rezeptors veranlassen würden, hätten CEACAM- Moleküle einen Einfluss auf die Wirkung der EGFR- Blocker, diese könnten in die bestehenden Chemotherapien als erweiterte, gezielte Therapie ergänzt werden und die Überlebensdauer durch besseres Therapieansprechen positiv beeinflussen. Dies könnte in Zukunft nicht nur für das Adenokarzinom der Lunge, sondern auch für das Adenokarzinom des Pankreas und deren Ansprechen auf EGFR- Targettherapien interessant werden, und sollte in weiteren Studien näher betrachtet werden. Beispielsweise verglichen Studien von Moore et al 2007 die Gemcitabine- Monotherapie mit der Kombinationstherapie aus **Gemcitabine und Erlotinib** (HER1/EGFR) in einer randomisierten Doppelblind- Phase III Studien. Erlotinib ist ein selektiver Tyrosinkinaseblocker, welcher den EGF- Rezeptor der Tumorzellen blockiert und somit de Tumorwachstum verhindern soll. In der Studie konnte ein Vorteil im Gesamtüberleben, im 1-Jahres- Überleben und der progressionsfreien Zeit gesehen werden (Moore et al. 2007). Erlotinib ist in Deutschland seit 2007 für metastasiertes Pankreaskarzinom zugelassen. Für die Zukunft sollte man die Therapie anhand des Rezeptorstatus von EGFR in Erwägung ziehen, dazu sollte man auch noch genauere Studien mit hochpositivem Rezeptorstatus überlegen. Man könnte das Expressionsmuster von EGFR mit dem Rezeptorstaus von CEACAM vergleichen, um hilfreiche Erkenntnisse einer potentiell effizienteren Targettherapie für das Pankreaskarzinom zu gewinnen, wobei EGFR und CEACAM als Target fungieren könnten.

Zusätzlich wurden bereits erste präklinische **Verträglichkeitsstudien** von CEACAM 6 Antikörpern, ADC, Antibody drug conjugate, durchgeführt, welche die ersten Erfolge bei CEACAM 6 positiven Tumoren zeigte. In Tierversuchen mit nicht-

4. Diskussion

menschenähnlichen Primaten zeigte sich eine ADC- und Dosis- abhängige Toxizität gegenüber Granulozyten und dessen Vorläuferzellen, welches jedoch als leichte Knochenmarksdepression eingestuft wurde und reversibel war. Es wurden weitere Studien für CEACAM 6 als mögliche Targettherapie des Pankreaskarzinoms empfohlen (Strickland et al. 2009). Das Nebenwirkungsprofil- zumindest bei CEACAM 6 ADCs- scheint in ersten Studien tolerabel zu sein und macht diese neue Form der Targettherapie immer interessanter.

Duxbury untersuchte zudem bereits im Jahr 2004 die Invasivität der Pankreastumoren und konnte Bezüge zwischen der Überexpression von CEACAM 6 und dem Aktivitätsgrad der c-SRC- Tyrosinkinase Transduktionswege (Protoonkogen SRC) herstellen. Hierbei wurde eine Modulation dieser Transduktionswege durch CEACAM 6 als Ursache in Erwägung gezogen. Weitere Studien könnten diesen Einfluss von CEACAM 6 auf den Signalweg eines Protoonkogens weiter ergründen (Duxbury et al. 2004).

Analog ist die SRC- Kinase- Aktivität mit einer Chemoresistenz auf Gemcitabine, der Erstlinientherapie für Pankreaskarzinome, in Verbindung zu setzen (Duxbury et al. 2003). Wenn durch eine Modulation von CEACAM 6 ein direkter Einfluss auf diesen Signalweg ausgeübt werden könnte, wäre eine Modulation und Verbesserung einer Chemotherapie mit Gemcitabine möglich. Dies sollte in weiteren Studien genauer betrachtet werden. Man könnte auch über therapeutische Konsequenzen eines positiven CEACAM 6 Status der aktuellen Therapie nachdenken: Wenn ein positiver CEACAM 6 Status ein Hinweis auf eine Chemoresistenz der Erstlinientherapie Gemcitabine wäre, sollte eine Therapie mit 5-FU trotz des höheren Nebenwirkungsprofils direkt begonnen werden, um eine längere Überlebenszeit zu erreichen.

In diversen Studien zur Targettherapie des Pankreaskarzinoms wurden die Hinzunahme des VEGF- Antagonisten, Bevacizumab, überprüft. Beispielfhaft dienen hier Studien zur Monotherapie mit Gemcitabine im Vergleich zur Gemcitabine und Bevacizumab. Hierbei konnte bisher keine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens der 2 Versuchsgruppen detektiert werden. (Kindler et al. 2007a, Kindler et al. 2007b, Evans et al. 1997, Vervenne et al 2008, Bayraktar et Rocha- Lima 2010).

Im Falle von erhöhter CEACAM 1 Expression konnten deutliche Zusammenhänge der tumorindizierten Neoangiogenese bei Prostata und Harnblasentumoren gefunden werden (Tilki et al. 2006, Tilki et al. 2007). In einem in vivo und in vitro Versuch von Ergün und Kollegen wurde ebenso ein starker Einfluss von CEACAM 1 auf VEGF und folgend eine verstärkte Mikroangiogenese festgestellt (Ergün et al. 2010). Dieses kann

4. Diskussion

ein Erklärungsansatz sein, wieso CEACAM positive Tumore aggressiver sind und, wie in diesem in vivo Versuch, mit einer verkürzten Überlebenszeit einher gehen, Die Zusammenhänge auf der Angiogenesewirkung von CEACAMs sollten speziellerer auf das Pankreaskarzinom hin untersucht werden. Man könnte sich überlegen, ob hochexpressive CEACAM 1 Tumore eine verstärkte VEGF- Beeinflussung bewirken. Dieses könnte man entweder zur Abschätzung der Effektivität einer VEGF- Targettherapie verwenden oder CEACAM 1 als zusätzlichen Angriffspunkt einer neuen Targettherapie auch bei Pankreaskarzinomen in Betracht ziehen.

Es gibt jedoch noch weitere Punkte, weswegen CEACAM 1 als potentielles Ziel einer Immunotherapie beim Pankreaskarzinom dienen könnte. Es zeigte sich ebenso als Zytoskelettmodulator, Schuhmann und Kollegen zeigten hierbei eine Interaktion von CEACAM 1 mit Aktin und Tropomyosin, welches zu einer verstärkten Invasivität von Malignomen führen könnte (Schuhmann et al. 2001).

Ebenso hemme CEACAM 1 die natürlichen Killerzellen und zytotoxischen Immunzellen, welches zu einer verringerten, zellulären Immunantwort gegen die Tumorzellen führt und somit eine schnellere Tumorprogression bedeuten könnte. (Markel et al. 2002).

Hochexpressive CEACAM 1 Werte zeigten bei anderen Tumoren, wie dem kleinzelligen Bronchialkarzinom und dem endokrinen Pankreaskarzinom, eine schlechtere Prognose (Serra et al. 2009, Thöm et al. 2009) und postulieren einen hohen Einflussfaktor in der Malignität, dies macht CEACAM 1 als Target zur zusätzlichen Immunotherapie bei hochexpressiven Malignomen, wie dem Pankreaskarzinom, immer attraktiver. Ebenso könnte die Höhe der CEACAM 1- Expression als prädiktiver Maßstab der Überlebensdauer dienen. Dies müsste jedoch in weiteren Studien untersucht werden.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die derzeitigen therapeutischen Möglichkeiten beim Pankreaskarzinom nach wie vor mehr als ausbaufähig sind. In den hier vorliegenden Versuchen zeigte sich, dass CEACAM nicht nur in vitro, sondern auch in vivo einen Einfluss auf den Tumorwachstum hat. Dies ist damit zu begründen, dass CEACAM eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion, der Angiogenese, Signaltransduktionen und auch als Tumorsuppressorgen funktioniert. Man könnte erwägen, CEACAM als zusätzlichen Tumormarker für mehr Spezifität der Erstdiagnostik eines malignen Pankreaskarzinoms hinzuzunehmen, als Prädiktor der Malignität, ebenso als Verlaufsparemeter der Therapie, einer Therapieoptimierung der Erstlinientherapie in Bezug auf Resistenzwirkung von Gemcitabine durch eine

4. Diskussion

CEACAM- modulierte Src- Kinase- Aktivität, und einer zukünftige gezielteren Therapie. Weitere Versuche könnten sich spezifischer den einzelnen CEACAM 1, 5, 6 Knockdownzellen widmen, da in einer Targettherapie die monoklonalen Antikörper genauer auf den Rezeptor generiert werden könnten. Ebenso würde man die genauen Einflüsse der einzelnen CEACAM- Rezeptoren und deren Gewichtung in Metastasierungsrate, Tumorwachstum, Angiogenese und Überlebenslänge besser verstehen und ein spezifischeres Nebenwirkungsprofil der monoklonalen Rezeptorblocker erkennen. Insgesamt bleibt CEACAM als vielversprechendes Molekül bei der Onkogenese verschiedenster Tumore zukünftig interessant. Durch das bessere Verstehen der genauen Signaltransduktion und Verständnis über die Interaktionen der Adhäsion, Angiogenese und Tumoronkogenfunktion könnten neue Angriffspunkte entstehen, um die primäre und distante Tumorgenese diverser Tumoren zu hemmen, eine gezielte Immunotherapie zu entwickeln oder eine Sensitivität auf bereits vorhandene Chemo- und Targettherapien zu ergründen, um vorhandene Therapeutika spezifischer und effizienter einsetzen zu können.

5. Zusammenfassungen

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Zelladhäsionsmoleküle der CEACAM Familie könnten ein vielversprechendes Ziel als Biomarker zur Früherkennung und eine wichtige Rolle in der zukünftigen Therapie von gastrointestinalen Karzinomen, insbesondere des Pankreaskarzinoms, spielen. Das Pankreaskarzinom ist nach wie vor ein Tumor mit äußerst schlechter Prognose wegen der mangelnden Früherkennung, der schnellen Metastaseneigung und dem aggressiven Tumorwachstum.

In unserem Projekt wurde der Einfluss der Zelloberflächenmoleküle CEACAM 1, 5 und 6 auf das Tumorwachstum, Tumormorphologie und Metastasierungsverhalten beim Adenokarzinom des Pankreas in einem Xenograftmodell untersucht. Dazu nahmen wir repräsentativ die humane Pankreaskarzinomzelllinie PaCa 5061.

Wir verglichen hiervon jeweils 3 Gruppen:

- Wildtyp PaCa 5061
- LUC PaCa 5061, transfektionsdeterminante Kontrollgruppe
- CEACAM Knockdown PaCa 5061, mit stark reduziertem bis fehlendem CEACAM 1, 5 und 6

Bereits bei in vitro Zellversuchen zeigte sich das verlangsamte Wachstum der CEACAM Knockdowns (CEACAM- Klon) im Vergleich zur Wildtyp 5061 und der Transfektions- Kontrolle LUC.

In dem in vivo Mausmodell mit pfp-rag2 Mäusen wurde das Zellwachstum, das Tumorgewicht, die Überlebenszeit und die Metastaseneigung der 3 Zellgruppen des Pankreaskarzinoms miteinander verglichen. Hierzu wurden 30 Mäusen Tumorzellen subkutan in die Nackenfalte injiziert - jeweils 10 Mäuse pro Versuchsgruppe. Die Versuchstiere wurden regelmäßig unter Beachtung der Richtlinien der UKCCR, für das Wohlergehen von Tieren in Neoplasie- Experimenten, kontrolliert.

Für die Auswertung wurden nur Versuchstiere mit stetigem Tumorwachstum mit einbezogen, hierzu wurden die Tumore, Lunge und das Blut entnommen, ebenso wurde der Versuchsendpunkt und Überlebenszeit, Tumorgewicht und Anwachsrate bestimmt. Die Tumore und die Lunge wurden fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten, entparaffiniert und mit 4 verschiedenen Methoden gefärbt: H.E. , CEACAM 1, CEACAM 5 und CEACAM 6. Das Blut wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR zur Detektierung von Micro- Metastasen untersucht.

Es zeigte sich, dass die Gesamtüberlebenszeit der CEACAM- Knockdown Gruppe signifikant erhöht war im Vergleich zu den Kontrollgruppen LUC und Wildtyp. Bei der

5. Zusammenfassungen

Auswertung der histologischen Präparate konnten wir den Erfolg des CEACAM-Knockdown durch die Färbung mit CEACAM 1, 5 und 6 bestätigen. Die Anwachsrate der Tumore war bei dem Wildtyp am besten. Das Tumorgewicht konnte nicht verglichen werden, da auf Grund der erschwerten Präparation sich teilweise der zystische Inhalt vor der Messung entleerte. Ein signifikanter Unterschied der Metastasierungsneigung konnte nicht gezeigt werden, da keine Metastasen in den Lungenschnitten zu finden waren und im Blut ebenso kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen detektiert werden konnten.

CEACAM hat bereits eine bedeutende Rolle bei anderen gastrointestinalen Tumoren gezeigt. Das Pankreaskarzinom bleibt ein sehr aggressiver Tumor, welches an der Morphologie, an der mangelnden Früherkennung und frühen Metastasierungsneigung liegt. CEACAM könnte ein interessanter Aspekt in Bezug auf das Screening, die Prognose der Erkrankung und zuletzt auch als potentielle Angriffsstelle einer gezielten Targettherapie fungieren. Durch den klaren Überlebensvorteil der CEACAM- Gruppe sollte man weitere Studien mit größeren Fallzahlen in Erwägung ziehen und im darauf folgenden Schritt ein mögliches Nebenwirkungsprofil einer solchen Targettherapie aufstellen. In ersten präklinischen Studien mit nicht humanen Primaten konnte dies bereits bei ADCs, Antibody drug conjugates, für CEACAM 6 gezeigt werden, es trat eine Granulozytopenie und eine Verminderung der granulozytären Vorläuferzellen als Nebenwirkung auf, welche jedoch reversible waren und als milde Knochenmarksdepression gewertet wurde. Aus den Ergebnissen der Studie von Strickland et al. 2009 werden weitere Studien gefordert, welche eine ADC- basierten Therapieansatz bei hochexpressiven CEACAM 6 Tumoren, wie dem Pankreaskarzinom, fordert um CEACAM 6 als potentielle Targettherapie mit einem geringen Nebenwirkungsprofil klinisch zukünftig zu nutzen.

5.2 English Summary

Cell adhesion molecules of the CEACAM family could be an interesting target for future therapies and as a predictive biomarker in gastrointestinal and pancreatic tumours.

The pancreatic carcinoma remains a tumour with a very bad prognosis due to a lack of screening opportunities, the fast metastatic spreading as well as aggressive growth of the tumour as such.

We want to show the influence of the cell adhesion molecule CEACAM 1,5 and 6 on tumour growth, -morphology and metastatic behaviour of the pancreatic adenocarcinoma.

In doing so we took the human pancreatic carcinoma- cells PaCa 5061- as a representative of the pancreatic adenocarcinoma, in a xenographic mouse- model and compared 3 groups:

- Wildtype PaCa 5061, unmodified cells
- LUC PaCa 5061, a transfection- detergent control group
- CEACAM Knockdown PaCa 5061, with highly reduced till missing expression of CEACAM 1,5 and 6 molecules

We found slower growths in vitro cell-experiments comparing CEACAM Knockdown PaCa 5061 cells with the wildtype 5061 and the control group LUC 5061.

In our following experiment we compared cell growths, tumor weights, survival time and metastatic tendencies of all 3 cell groups in an in vivo mouse experiment. In doing so we injected tumour cells in the subcutis of the neck of 30 pfp-rag 2 mice- 10 mice each trial group. The mice were regularly monitored under the UKCCR regulations, which secure the well-being of animals in neoplastic experiments.

During the experiment we limited our selection to tumours with steady growth only and analysed them. In doing so we examined the tumours, the lungs and blood of the mice, further we looked at the tumour take rate, tumour weights and survival time.

The tumours and lungs were fixated, bedded in paraffin, cut, deparaffinised and coloured in 4 different ways: H.E., CAECAM1, CEACAM 5, CEACAM 6.

The blood was analysed with a quantitative PCR- method, to detect micro-metastasis

The overall survival rate of the CEACAM Knockdown group was significantly higher than that of the control groups LUC and the wildtype group. The immunohistological analysis of the histological slides confirmed the CEACAM Knockdown.

We showed that the all time survival rate of the CEACAM- Knockdown group was significantly higher compared to the control groups LUC and wildtype.

The analysis of the histological supplements confirmed the successful Knockdown of

5. Zusammenfassungen

CEACAM 1,5, and 6 in the Knockdown group. Wildtype had the best tumour- take rate with 10 out of 10 tumours; the tumour weight could be further accessed.

Due to the difficulties involved in the preparation of the tumours, the cysts occasionally perforated, so some weights had to be measured without the total amount of fluid and the results are not comparable.

There was no significant difference in metastatic behaviour between the trial groups, there was no metastasis found in the lungs, nor were there significant differences of the PCR of the blood searching or micro- metastasis.

CEACAM could already show a significant influence in other gastrointestinal tumours. Pancreatic adenocarcinomas remain very aggressive tumours; CEACAM could be an interesting object for future screening, prognosis and as a goal in additional immunotherapy. Our results show a benefit due to longer survival rates in tumours without CEACAM 1,5 and 6 molecules. Therefore it should take further studies with larger case numbers and starting preclinical drug tests to determine future use. The first antibody drug conjugate (ADC) tests for CEACAM 6 in primate apes have shown good results with low side effects such as mild and reversible bone marrow depressions. These are the first steps in a promising future.

6. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
%ig	prozentig
°C	Grad Celsius
®	registered trade mark oder registered trademark
<	kleiner als
>	größer als
1966 Puffer	Ansatz für 200 ml: 180 ml Aqua dest. + 20 ml Target Retrieval Solution Puffer
3D	dreidimensional
5-FU	5-Fluoruracil, auch Fluorouracil
A- Zellen	Alphazellen des Pankreas, Produktion von Glukagon
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ADC	Antibody drug conjugate
AG	Arbeitsgemeinschaft
AJCC	American Joint Comitee on Cancer
Amp.	Ampicillin
ant.	anterior
aqua dem.	demineralisiertes Wasser
aqua dest.	destilliertes Wasser
ASS	Aspirin
Aufl.	Auflage
AWMF-	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlich, medizinischen Fachgesellschaften
B- Zellen	Immunzellen der humoralen Zellabwehr, z.B. B- Lymphozyten
B- Zellen, oder β- Zellen	Betazellen des Pankreas, Produktion von Insulin
bar	Druckeinheit
BEV	Bevacizumab
bFGF	basic fibroblast growth factor
Bp	Basenpaar
BRCA2	BReast CAncer Gen 2, auf dem menschlichen Chromosom 13
Bzw.	Beziehungsweise
c- Src	zusammengesetztes Akronym aus cellular und sarcoma,

6. Abkürzungsverzeichnis

	Tyrosinkinase Src
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CA- 242	Tumormarker für das Pankreaskarzinom
ca.	circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cap	Capecitabine
CD 11b	Humanes CD (Cluster of Differentiation) Antigen 11b, Vorkommen auf Leukozyten, Funktion Zelladhäsion und Vermittlung von Phagozytose
CD 11b	β 2- Integrin, oder CD 18
CD 18	Humanes CD (Cluster of Differentiation) Antigen 18
CD 18	β 2 Intefrin, oder CD 11b
CD 2	Humanes CD (Cluster of Differentiation) Antigen 2, oder SRBC, T11, Vorkommen auf T- Zellen und NK- Zellen, Funktion Adhäsion, T-Zell- Aktivierung
CD 31	Humanes CD (Cluster of Differentiation) Antigen 31, Vorkommen auf Endothelzellen
CD 4	Humanes CD (Cluster of Differentiation) Antigen 4, Vorkommen auf T- Helferzellen, Bindung mit MHC 2
CD 66	carcinoembryonic Antigen, CEA, Biliary glycoprotein I, BGP-1, CECAM
CD 66a	CEACAM 1-L
CD 66b	CEACAM 3
CD 66c	CEACAM 6
CD 66d	CEACAM 8
CD 8	Humanes CD (Cluster of Differentiation) Antigen 31, Vorkommen auf Endothelzellen, Leu2, MAL, p32, Vorkommen auf zytotoxischen T- Zellen, Funktion Bindung von MHC 1
CDKN2A	cyclin dependent kinase Inhibitor 2A, siehe auch p16
cDNA	Humanes CD (Cluster of Differentiation) Antigen 4, Vorkommen auf T- Helferzellen, Bindung mit MHC 2
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CEA	CEACAM
CEACAM	auch CD 66
CEACAM 1L	CD66a
CEACAM 3	CD66b

6. Abkürzungsverzeichnis

CEACAM 6	CD 66c
CEACAM 8	CD 8
Child	Child- Pugh Stadien A-C, Einteilung der Leberzirrhose
cis-	Die cis-trans-Isomerie, (Z)-(E)-Isomerie, bezeichnet in der Chemie eine spezielle Form der Konfigurationsisomerie
cm	Zentimeter
cm²	Quadratcentimeter
CT	Computertomographie
D- Zellen	Gamma- Zellen des Pankreas, Produktion von Somatostatin
D.	Duktus
d.h.	das heißt
db	Dezibel
DKB	Deutsche Krebs Gesellschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC4	Deleted in pancreatic carcinoma, locus 4, siehe auch SMAD4
Dr. med.	Doktor der Medizin, akademischer Grad
Dr. rer. nat.	Doktor der Naturwissenschaft, akademischer Grad
DTBS	Dulbeccos Phosphat bufferes Saline, Puffersystem für Zellkulturen
E- Selektine	Glykoproteine in den Plasmamembranen bestimmter eukaryotischer Zellen, E-Selektine sind an der Plasmamembran von Endothelzellen zu finden
E-Cadherine	englisch: calcium adhering, abhängige transmembrane Glykoproteine aus der Gruppe der Adhäsionsproteine
E. coli	Escherichia coli
EC	Enterochromaffin
ECOG - Performance Status	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epithelial Growth Rezeptor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
et	und
et al.	und andere
et al.	Lateinisch, u.a. und andere
F-Aktin	Fibrilläres Aktin

6. Abkürzungsverzeichnis

F(ab')₂	Als F(ab) ₂ -Fragment, F(ab) ₂ -Antikörper, wird das antigenbindende Fragment eines Antikörpers bezeichnet, welches durch Spaltung mit dem Enzym Pepsin gewonnen werden kann
FAMMM	Familiäres Muttermal und Melanom Syndrom
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fetales Kälber- Serum, fetal calf serum
FDR	Fixed dose rate
FGF	Fibroblasten- Wachstumsfaktor
FPC	Familiäres Pankreaskarzinom
FU	5- Fluorouracil
g	Gramm
g- Aktin	globuläres Aktin
G-Aktin	globuläres Aktin
GEM	Gemcitabine
GemOX	Gemcitabine + Oxaliplatin
Ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GmbH & Co.	Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie
KG	Kommanditgesellschaft
GPI- Anker	glycosylphosphatidylinositol Anker
GTPasen	Rho-guanosin- Triphosphatasen
GVO	Gentechnisch veränderte Organismen (GVO), auch Gentechnisch modifizierter Organismus, englisch: genetically modified organism (GMO)
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
H₂O	Wasser
H₂O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HER1	EGFR- Rezeptor
HER1	Human epidermal growth factor receptor 1
HNPCC	Hereditäre non polyposis Kolorektales Karzinom, Lynch Syndrom
i.d.R.	In der Regel
ICAMs	interzelluläre Zelladhäsionsmoleküle
Ig-	Immunglobulin
IgC	Ig ähnliche domaine C

6. Abkürzungsverzeichnis

IgV	Ig ähnliche domaine V
In situ	Lateinisch: am Ort
Inc.	Incorporation (business)
inkl.	inklusive
IR	Insulinrezeptor
IRINOGEN	Irinotecan + Gemcitabine, Exatecan: Exatecan mesylate
Iso	Isotyp
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
IVC racks	IVC Käfige, spezielle Käfige für die Haltung immunsupremierter Mäuse
JAMs	junktionalen Zelladhäsionsmolekülen
K-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
KH₂PO₄	Monokaliumphosphat (Kaliumdihydrogenphosphat)
l	Liter
Lig.	Ligament, Band
LUC Gruppe	Transfektionsdeterminante LUC Gruppe
Lux	Einheit, abgeleitete Größe, Beleuchtungsstärke
LWK	Lendenwirbelkörper
M	Molar
m²	Quadratmeter
Mewo	Zelllinie eines malignen Melanoms
mg	Milligramm
mg/m²	Milligramm pro Quadratmeter
Mic 1	Macrophage inhibitory cytokin 1
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
Mo	Monate
MRCP	Magnetresonanz- Cholangiopankreatikographie, MR-Cholangiopankreatikographie
MRCP	Magnetresonanz Cholangiopankreaticographie
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
N	Newton (Einheit)

6. Abkürzungsverzeichnis

N.	Nervus
n.s.	Nicht signifikant
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
NCAMs	Neurale Zelladhäsionsmoleküle , nerve cell adhesion molecules
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NEC	Neuroendokrines Karzinom
NET	Neuroendokriner Tumor
NK- Zellen	Natürliche Killerzellen
NII.	Nodi
NR	Not reported, kein Ansprechen
ORR	Overall response rate,
OS	Overall Survival, Gesamtüberleben
P	p- Wert, Signifikanzwert
p16	CDK-Inhibitor 2A, cyclin dependent kinase inhibitor 2A
p27Kip	Tumorsupressorgen, cyclin-dependent kinase (cdk) inhibierende p27, auch Kip1
p53	Tumorsupressorgen
PaCa 5061	Primärkultur des Adenokarzinoms des Pankreaskopfes, 2008 am UKE etabliert
PanIN	Pankreatisch intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEFG-Schema:	Cisplatin, Epirubicin, 5- Fluorouracil und Gemcitabine.
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
pfp/rag 2 Mäuse	auch C57BL/6 pfp/rag2 Mäuse, diese Mäuse zeichnen sich dadurch aus, dass sowohl das pfp- Gen als auch das rag2- Gen ausgeschaltet sind. Die Anzahl der Natürlichen Killerzellen, NK-Zellen, verringert sich durch das Fehlen des pfp- Gens und das Fehlen der reifen T- und B- Lymphozyten wird durch das fehlende rag2- Gen erreicht.
PFS	Progressions Free Survival, Progressionsfreie Zeit
pH	pH- Wert
pmol	picomol
Post.	posterior

6. Abkürzungsverzeichnis

PP- Zellen	PP- Zellen des Pankreas, Produktion von pankreatischem Polypeptid
Prof.	Professor
PSG	Pregnancy spezific glykoprotein
R.	Ramus
R0- Resektion	Tumor Entfernung im Gesunden mit ausreichendem Sicherheitsabstand
R1- Resektion	Tumorentfernung nicht komplett, Sicherheitsabstand der Exzidationsränder gewährt keine vollständige Entfernung des Tumors
R2- Resektion	Restverbleib des Tumors in situ
RB	Retinoblastom Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolution per Minute – Umdrehung per Minute
RPMI- 1640	Zellkulturmedium
Rr.	Rami
s	Sekunde
s.	siehe
S.	Seite
s.o.	siehe oben
SAA	Serum Amyloid A
SCID	severe combined immunodeficiency
SD	Stable disease, stabiler Krankheitszustand
SD	Standartabweichung
SEM	Standartabweichung des Mittelwertes, standard error of the mean
SEM	Standartfehler
SER 503	Serin 503
shRNA	small hairpin RNA, short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SMAD4	Tumorsupressorgen oder DPC4, Proteine, die an der Regulation der Transkription bestimmter Gene beteiligt sind
Src- Kinasen	Tyrosinkinassen
Stent	Gefäßstütze
SYBR Green	Start- Komponente für die light cycler 480 PCR mit Taq- DNA- Polymerase
T- Zellen	Immunzellen der zellulären Abwehr
Tab.	Tabelle

6. Abkürzungsverzeichnis

Taq	Bakterium thermus aquaticus
Taq- DNA- Polymerase	hitze stabile DNA Polymerase (bis 70°C) des Taq- Bakteriums
TBE	TBE- Puffer, TRIS- Borat- EDTA- Puffer
TBS- Ansatz	Tris-buffered Saline- Ansatz für die PCR zur Detektierung und Lagerung von Proteinen und Immunkomplexen in der PCR oder Westernblotverfahren
TBS-T	Lösung, welche auf den TBS- Puffer basiert, wird zum detektieren von Immunkomplexen und Antikörpern im Rahmen von PCR oder Westernblotverfahren verwendet
™	trademark symbol
TNM	Klassifikation maligner Tumoren zur Ausdehnung des Primärtumors (T), des Lymphknotenbefalls (N) und Metastasen (M)
trans-	Die cis-trans-Isomerie, (Z)-(E)-Isomerie, bezeichnet in der Chemie eine spezielle Form der Konfigurationsisomerie.
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
u.a.	und anderer
UICC	Union internationale contre le cancer,
UKCCR	United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research
UKE	Uniklinikum Eppendorf
V.	Vena
V.a.	Verdacht auf
VCAMs	Vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIP	Vasoaktive intestinale Peptide
VIPom	Neoplasie des Pankreas von den neuroendokrinen Zellen ausgehend
Vv.	Venae
Watt	Einheit für Leistung
WHO	World health organisation, Welt Gesundheitsorganisation
wt	wildtyp
WT 5061	Wildtyp PaCa 5061 Zellen
WT Gruppe	Wildtyp Paca 5061 Gruppe
x-Achse	waagerechte Achse des Graphen
XTT	Proliferationskitt

6. Abkürzungsverzeichnis

y- Achse	senkrechte Achse des Graphen, $f(x)$
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
μl	Mikroliter

7. Literaturverzeichnis

- Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC, Brambs HJ, Feuerbach S, Grabenbauer G, Hahn S, Heinemann V, Hohenberger W, Langrehr JM, Lutz MP, Micke O, Neuhaus H, Neuhaus P, Oettle H, Schlag PM, Schmid R, Schmiegel W, Schlottmann K, Werner J, Wiedenmann B, Kopp I. (2007) Carcinoma of the pancreas: summary of guidelines 2007, issued jointly by 15 German specialist medical societies, Dtsch Med Wochenschr. Aug;132(33):1696-700. R
- Al Moustafa AE, Yen L, Benlimame N, Alaoui-Jamali MA (2002) Regulation of E-cadherin/catenin complex patterns by epidermal growth factor receptor modulation in human lung cancer cells. Lung Cancer 37:49-56
- Alais S, Allioli N, Pujades C, Duband JI, Vaininio O, Imhof BA, Dunon D (2001) HEMCAM/CD146 downregulates cell surface expression of beta 1 Integrins. J Cell Sci 114.1847-1859
- Aumüller G., Aust G., Doll A., Engele J., Mense S., Wurzingler L. J.: Duale Reihe Anatomie, S. 670- 682, Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage 2010
- Bamberger AM, Kappes H, Methner C, Rieck G, Brümmer J, Wagener C, Löning T, Milde-Langosch K (2002) Expression of the adhesion molecule CEACAM1 (CD 66a, BGP, C-Cam) in breast cancer is associated with the expression of the tumor-suppressor gene Rb, Rb2 and p27. Virchows Arch 440:139-144
- Bamberger AM, Riethdorf L, Nollau P, Naumann M, Erdmann L, Götze J, Brümmer J, Schulte HM, Wagener C, Löning T (1998) Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer. Am J Pathol 152:1401-1406
- Bamberger AM, Sudahl S, Löninger T., Wagener C, Bamberger CM, Drakakis P, Coutifaris C, Makrigiannakis A (2000) The adhesion molecule CEACAM1 (CD66a, C-Cam, BGP) is specifically expressed by the extravillous intermediate trophoblast. Am J Pathol 152:1401-1406
- Bates PA, Luo J, Sternberg MJ (1992) A predicted three-dimensional structure for the carcinoembryonic antigen (CEA) FEBS Lett 301:207-214
- Baum O, Troll S, Hixson DC (1996) The long and short isoform of cell-CAM 105 show variant-specific modifications in adult rat organs, Biochem Biophys Res Commun 227:775-781
- Bayraktar S, Rocha-Lima CM (2010) Advanced or metastatic pancreatic cancer: molecular targeted therapies, Mt Sinai J Med. 2010 Nov-Dec;77(6):606-19. doi: 10.1002/msj.20217.

7. Literaturverzeichnis

- Beachemin N, Benchimol S, Cournoyer D, Fuks A, Stanners CP (1987) Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen. *Mol Cell Biol.* 7:3221-3230
- Beauchmin N, Draber P, Dveksler G, Gold P, Gray- Owen S, Grunert F, Hammarsröm S, Holmes KV, Karlsson A, Kuroki M, Lin S-H, Lucka L, Najjar SM, Neumaier M, Öbrink B, Shively JE, Skubitz KM, Stanners CP, Thomas P, Thompson JA, Virji M, von Kleist S, Wagner C, Watts S, Zimmermann W (1999) Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res* 252:243-249
- Birchmeier W, Behrens J (1994) Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198:11-26
- Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H: Pathologie, S.838- 842, Urban und Fischer Verlag 4. Auflage 2008
- Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, WHO Classification of Tumours of the Digestive System, (S. 280- 337) International Agency of Research on Cancer 4 th Edition, Lyon 2010
- Botling J, Oberg F, Nilsson K (1995) CD49f (alpha 6 integrin) and CD66e (BGP) are specially induced by retinoids during human monocytic differentiation. *Leukemia* 9:2034-2041
- Boulton IC, Gray-Owen SD (2002) Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat Immunol* 3:229-236
- Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM (1996) The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 213:123-161
- Brümmendorf T, Lemmon V (2001) Immunoglobulin superfamily receptors: cis-interactions, intracellular adapters and alternative splicing regulate adhesion, *Curr Opin Cell Biol* 13:611-618
- Brümmer J, Ebrahimnejad A, Flayeh R, Schumacher U, Löninger T, Bamberger AM, Wagner C (2001) cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with Integrin beta (3). *Am J Pathol* 159:537-546
- Brümmer J, Neumaier M, Göpfert C, Wagener C (1995) Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* 11:1649-1655
- Bryzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, Plow EF (2000) A mechanism for modulation of cellular response to VEGF: activation of integrins. *Mol Cell* 6:851-860

7. Literaturverzeichnis

- Busch C, Hanssen TA, Wageneer C, Öbrink B (2002) Down. regulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with loss of cell polarity, increased proliferation rate, and Gleason grade 3 to 4 transition. *Hum Pathol* 33:290-298
- Callery, M P, et al., (2009) Pretreatment assessment of resectable and borderline resectable pancreatic cancer: expert consensus statement. *Ann Surg Oncol*, 2009. **16**(7): p. 1727-33.
- Canto, M I, et al., (2004) Screening for pancreatic neoplasia in high-risk individuals: an EUS-based approach. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2004. **2**(7): p. 606-21.
- Canto, M I, et al., (2006) Screening for early pancreatic neoplasia in high-risk individuals: a prospective controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006. **4**(6): p. 766-81; quiz 665.
- Carlson TR, Feng Y, Masionpierre PC, Mrksich M, Morla AO (2001) Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. *J Biol Chem* 276:26526-26525
- Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257
- Cavallaro U, Niedermeyer J, Fuxa M, Christofori G (2001) N-CAM modulates tumor-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nat Cell Biol* 3:650-657
- Chen CJ, Lin TT, Shively JE (1996) Role of interferon regulatory factor-1 in the induction of biliary glycoprotein (cell CAM-1) by interferon gamma, *J Biol Chem* 271:28181-28188
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49:507-521
- Da Silva-Azevedo L, Reutter W (1999) The long isoform of the cell adhesion molecule C-CAM binds to actin. *Biochem Biophys Res Commun* 256:404-408
- Daniels E, Letourneau S, Turbide C, Kuprina N, Rudinskaya T, Vazova AC, Holmes KV, Dveksler GS, Beauchemin N (1996) Biliary glykoprotein 1 expression during embryogenesis: correlation with events of epithelial differentiation, mesenchymal-epithelial interactions, absorption, and myogenesis. *Dev Dyn* 206:272-290
- Dejana E, Spagnuolo R, Bazzoni G (2001) Interendothelial junctions and their role on the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. *Thromb Haemost* 86:308-315
- Distler M, Pilarsky E, Kersting S, Grützmann R. (2013) Preoperative CEA and CA 19-9 are prognostic markers for survival after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas - a retrospective tumor marker prognostic study, *Int J Surg*. 2013;11(10):1067-72.

7. Literaturverzeichnis

- Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. (2004) CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and in vivo metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells *Oncogene*. 2004 Jan 15;23(2):465-73.
- Duxbury, M, Matros E, Clancy T, Bailey,G, Doff M, Zinner M, Ashley, S , Maitra,A Redston,M, Whang E (2005) CEACAM6 Is a Novel Biomarker in Pancreatic Adenocarcinoma and PanIN Lesions *Ann Surg*. Mar 2005; 241(3): 491–496
- Duxbury, M. MA, MRCS, Hiromichi Ito, MD, Michael J Zinner, MD (FACS), Stanley W Ashley, MD (FACS), Edward E Whang, MD (FACS) (2003) siRNA directed against c-Src enhances pancreatic adenocarcinoma cell gemcitabine chemosensitivity Abstract presented at the American College of Surgeons 89th Annual Clinical Congress Surgical Forum, Chicago, IL, October 2003
- Ebrahimnejad A, Flayeh R, Unteregger G, Wagner C, Brümmer J (2000) Cell adhesion molecule CEACAM1 associates with paxillin in granulocytes and epithelial and endothelial cells. *Exp. Cell Res* 260:365-373
- Edlund M, Wikström K, Toomik, R, Ek P, Öbrink B (1998) Characterization of protein kinase C-mediated phosphorylation of the short cytoplasmatic domain isoform of C-Cam. *FEBS Lett* 425:166-170
- Elghetany MT (2002) Surface antigen changes during normal neutrophilic development a critical review. *Blood Cells Mil Dis* 28:260-274
- Ergün S, Kilic N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Götze J, Wurmbach JH, Horst A, Weil J, Fernando M, Wagener C (2000) CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor- *Mol Cell* 5:311-320
- Estera VT, Chen DT, Luo W, Hixson DC, Lin SH (2001) Signal transduction by the CEACAM 1 tumor suppressor. Phosphorylation of serine 503 is required for growth-inhibitory activity. *J Biol Chem* 276: 15547-15553
- Evans DB, Abbruzzese JL, Rich TA. Cancer of the pancreas. In: De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA., editors. (1997) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5th ed. Philadelphia, PA, Lippincott
- Fauci, A., Dietel, M, Harrison T., *Harrisons Innere Medizin Band 2*, S. 723-731, ABW Verlag Berlin, 17. Auflage, 2009
- Ferrero E, Ferrero ME, Pardi R, Zocchi MR (1995) The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contribute to endothelial barrier function. *FEBS Lett* 374:323-326

7. Literaturverzeichnis

- Firpo M, Gay D, Granger S, Scaife C, DiSario J, Boucher K, Mulvihill S (2009) Improved Diagnosis of Pancreatic Adenocarcinoma Using Haptoglobin and Serum Amyloid A in a Panel Screen, *World Journal of Surgery*, April 2009, Volume 33, Issue 4, pp 716-722
- Folkman J, D'Amore PA (1996) Blood vessel formation: what is the molecular basis? *Cell* 87:1153-1155
- Fournes B, Farrah J, Olson M, Lamarche-Vane N, Beauchemin N (2003) Distinct Rho GTPase activities regulate epithelial cell localization of the adhesion molecule CEACAM1 : involvement of CEACAM 1 transmembrane domain. *Mol Cell Biol* 23:7291-7304
- Fournes B, Sadekova S, Turbide C, Letourneau S, Beauchemin N (2001) The CEACAM 1-L Ser503 residue is crucial for inhibition of colon cancer cell tumorigenicity. *Oncogene* 20:219-230
- Frängsmyr L, Baranov V, Prall F, Yeung MM, Wagner C, Hammarström S (1995) Cell and region-specific expression of biliary glycoprotein and its messenger RNA in normal human colonic mucosa. *Cancer Res* 55:2963-2967
- Fukushima K, Ohkura T, Kanai M, Kuroki M, Matsuoka Y, Kobata A, Yamashita K (1995) Carbohydrate structures of a normal counterpart of the carcinoembryonic antigen produced by colon epithelial cells of normal adults, *Glycobiology* 5:105-115
- Gebauer, F., Wicklein, D., Horst, J., Sundermann, P., Maar, H., Streichert, T., Tachezy, M., Izbicki, J., Bockhorn, M., Schumacher U. (2014) Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecules (CEACAM) 1, 5 and 6 as Biomarkers in Pancreatic Cancer, *Plos One*, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113023>
- Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W (2000) In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95:3106-3112
- Giardiello, F.M., et al., (2000) *Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(6): p. 1447-53.
- Gold P, Freedman SO (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 122:467-481
- Greicius G, Severinson E, Beauchemin N, Öbrink B, Singer BB (2003) CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *J Leukoc Biol* 74:126-134
- Grote, Tobias, Logsdon, Craig D, (2007) Progress on molecular markers of pancreatic cancer, *Current Opinion in Gastroenterology* Vol 35: issue 5, 506

7. Literaturverzeichnis

- Hajra KM, Fearon ER (2002) Cadherin and catenin alteration in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 34:255-268
- Hammarström S (1999) The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 9:67-81
- Han E, Phan D, Lo P, Poy MN, Behringer R, Najjar SM, Lin SH (2001) Differences in tissue-specific and embryonic expression of mouse CEACAM1 and CEACAM 2 genes. *Biochem J* 355:417-423
- Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of angiogenic switch during angiogenesis. *Cell*. 86:353
- Hanenberg H, Baumann M, Quentin I, Nagel G, Grosse-Wilde H, von Kleist S, Gobel U, Burdach S, Grunert F (1994) Expression of the CEA gene family members NCA-50/90 and NCA-160 (CD66) in childhood acute lymphoblastic leukemias (ALLs) and in cell lines of B- cell origin. *Leukemia* 8:2127-2133
- Hansson M, Blikstad I, Öbrink B (1989) Cell surface location and molecular properties of cell-CAM 105 in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 181:63-74
- Hazan RB, Norton L (1998) The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J. Biol Chem* 273:9078-9084
- Herold G. und Mitarbeiter, *Innere Medizin*, S 489-490, Auflage 2010, Gerd Herold, Köln
- Herrmann R, Bodoky G, Ruhstaller T, Glimelius B, Saletti P, Bajetta E, Schueller J, Bernhard J, Dietrich D, Scheithauer W. (2005) Gemcitabine (G) plus Capecitabine (C) versus alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer. A randomized phase III study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) and the Central European Cooperative Oncology Group (CECOG) *J Clin Oncol*. 2005;23 Suppl 1:310s (abstract LBA4010).
- Hixson CD McEntire KD, Öbrink B (1985) Alteration in expression of hepatocyte cell adhesion molecule by transplantable hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 45:3742-3749
- Honig M, Peter HH, Janscheff P, Grunnert F (1999) Synovial PMN shown a coordinated up regulation of CD66 molecules. *J Leukos Biol* 66:429-436
- Horst AK, Wagener C. (2004) CEA-Related CAMs. *Handb Exp Pharmacol*. 2004;(165):283-341. doi: 10.1007/978-3-540-68170-0_10.
- Hsieh IT, Luo W, Song W, Wang Y, Kleinermann DI, Van NT, Lin SH (1995) Tumor suppressive role of an androgen-regulated epithelial cell adhesion molecule (C-Cam) in prostate carcinoma cell revealed by sense and antisense approaches. *Cancer Res* 55:190-197
- <http://www.carcinoembryonic-antigen.de/>

7. Literaturverzeichnis

<http://www.krebsgesellschaft.de/krebshaeufigkeit,11267.html>

http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenrebs_node.html

Huang J, Simpson JF, Glackin C, Riethhorf, Wagener C, Shively JE (1998) Expression of biliary glycoprotein (CD66a) in normal and malignant breast epithelial cells. *Anticancer Res* 18:3203-3212

Hunter I, Sigmundsson K, Beauchemin N, Öbrink B (1998) The cell adhesion molecule C-Cam is a substrate for tissue transglutaminase *FEBS Lett* 425:141-144

Ilantzis C, Jothy S, Alpert LC, Draber B, Stanners CP (1997) Cell-surface levels of human carcinoembryonic antigen are inversely correlated with colonocytes differentiation in colon carcinogenesis. *Lab Invest* 76:703-716

Izzi I, Turbide C, Houde C, Kunath T, Beauchemin N (1999) cis- Determinants in the cytoplasmic domain of CEACAM 1 responsible for its tumor inhibitory function. *Oncogene* 18:5563-5572

Juliano RL (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton function of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:283-323

Kalinina T, Cenap G, Thielges S, Möller-Krull M, Murgas Penas E, Wicklein D, Streichert T, Schumacher U, Kalinin V, Simon R, Otto B, Dierlamm J, Schwarzenbach H, Effenbach K, Bockhorn M, Izbicki J, Yekebas E (2010) Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung. *BMC Cancer* 10:295

Kammerer R, Hahn S, Singer BB, Luo JS, von Kleist S (1998) Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure expression and involvement in T cell activation. *Eur J Immunol*: 28:3664-3674

Kammerer R, Stober D, Singer BB, Öbrink B, Reimann J (2001) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T- stimulation. *J Immunol* 166:6537-6544

Kannicht C., Lucka I, Nuck R, Reutter W, Gohlke M (1999) N-glycosylation of the carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule, C-CAM, from rat liver: detection and oversialylated bi- and triantennary structures. *Glycobiology* 9:897-906

Kerr MA, Stocks SC (1992) The role of CD15-(Le(X))-related carbohydrate in neutrophil adhesion. *Histochem J* 24:811-826

7. Literaturverzeichnis

- Khan WN, Hammarström S, Ramos T (1993) Expression of antigens of carcinoembryonic antigen family on B cell lymphomas and Epstein barr virus immortalized B cell lines. *Int Immunol* 5:265-270
- Kim J, Kaye FL, Henslee JG, Shively JE, Park JG, Lai SL, Linnolia RI, Mulshine JL, Gazdar AF (1992) Expression of carcinoembryonic antigen and related genes in lung and gastrointestinal cancer. *Int J Cancer* 52:718
- Kindler H. L. , Niedzwiecki D. , Hollis D. , Oraefo E. , Schrag D. , Hurwitz H. , McLeod H.L., Mulcahy M.F. , Schilsky R. , Goldberg M.R. Cancer and Leukemia Group B (2007a) A double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of gemcitabine (G) plus bevacizumab (B) versus gemcitabine plus placebo (P) in patients (pts) with advanced pancreatic cancer (PC): A preliminary analysis of Cancer and Leukemia Group B (CALGB, *Journal of Oncology*, 2007 Vol 2, No 18, suppl 4508
- Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, Oraefo E, Schrag D, Hurwitz H, McLeod HL, Mulcahy MF, Schilsky RL, Goldberg RM. (2007b) A double-blind placebo-controlled, randomized phase III trial of gemcitabine plus bevacizumab versus gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: A preliminary analysis of Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 80303. *ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium, 2007: Abstract 108*
- Kingugasa T, Kuroki M, Takeo H, Matsuo Y, Ohshima K, Yamashita, Shirakusa T, Matsuoka Y (1998) Expression of four CEA family antigens (CEA, NCA, BGP and CGM2) in normal and cancerous gastric epithelial cells: up-regulation of BGP and CGM2 in carcinomas. *Int J Cancer* 76:148-153
- Kirschner J, Chen CJ, Liu P, Huang J, Shively JE (2003a) CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D model of mammary morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:521-526
- Kirschner J, Schuman D, Shively JE (2003b) CEACAM1, a cell-cell adhesion molecule, directly associates with annexin II in a 3D model of mammary morphogenesis. *J. Biol Chem* M309115200
- Klein MI, Mc Ghee SA; BAranian J, Stevens L, Hefta SA (1996) Role of nonspecific cross reacting antigen, a CD66 cluster antigen, in activation of human granulocytes. *Infect Immun* 64:4574-4579
- Kleinermann DI, Dinnery CP, Zhang WW, Kin SH, Van NT, Hsieh JT (1996) Suppression of human bladder cancer growth by increased expression of C-CAM1 gene in an orthotopic model. *Cancer Res* 56:3431-3435

7. Literaturverzeichnis

- Kleiner mann DI, Zhang WW, Lin SH, Nguyen TV, von Eschenbach AC, Hsieh JT (1995b) Application of a tumor suppressor (C-CAM1)-expressing recombinant adenovirus in androgen-independent human prostate cancer therapy: a preclinical study. *Cancer Res* 55:2831-2836
- Kleiner mann DJ, Troncoso P, Lin SH, Pisters LL, Sherwood ER, Brooks T, von Eschenbach AC, Hsieh JT (1995a) Consistent expression of an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) during human prostate development and loss of expression in prostate cancer: implication as a tumor suppressor. *Cancer Res* 55:1212-1220
- Kobayashi M, Miki Y, Ebina M, Abe K, Mori K, Narumi S, Suzuki T, Sato I, Maemondo M, Endo C, Inoue A, Kumamoto H, Kondo T, Yamada-Okabe H, Nukiwa T, Sasano H. (2012) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules as surrogate markers for EGFR inhibitor sensitivity in human lung adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2012 Nov 6;107(10):1745-53. doi: 10.1038/bjc.2012.422. Epub 2012 Oct 25.
- Korstrewa D, Brockhaus M, D'Arcy A, Dale GE, Nelboeck P, Schmid G, Mueller F, Bazzoni G, Dejana E, Bartfai T, Winkler FK, Henning M (2001) X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via novel dimerization motif. *EMBO J* 20:4391-4398
- 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, Nikibakht H, Peters A, Kugler C, Jasuewics Y, Edler L, Brümmer J, Schumacher U, Hossfeld DK (2002) Expression of CEACAM 1 in adenocarcinoma of lung: a factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol* 20: 4279-4284
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2013 : S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, 2013, AWMF Registernummer: 032-010OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> 1. Überarbeitung von Adler et al 2006, hinzukommende Autoren: Arnold, D., Büchler, M., Budach, V. Esposito, I, Fietkau, R., Follmann, M., Friess, H., Galle, P., Geißler, M., Glanemann, M, Gress, T, Heinemann, V., Hohenberger, W., Hopt, U., Izbicki, J. Klar, E., Kleeberg, J. Kleeff, J., Klöppel, G. Kopp, I., Kullmann, F., Langer, T., Langrehr, J., Lerch, M., Lühr, M, Lüttges, J. Lutz, M, Mayerle, J, Michl, P, Möller, P, Molls, M. Münter, M, Nothacker, M, Oettle, H. Porzner, M. Post, S, Reinacher-Schick, A., Röcken, C. Roeb, E. Saeger, H., Schmid, R., Schmiegel, W. Schoenberg, M., Seufferlein, T., Siveke, J, Stuschke, M., Tannapfel, A., Uhl, W., Unverzagt, S., van Oorschot, B, Vashist, Y., Wagener, C., Werner, J., Wylegalla, C., Yekebas, E, Zimpel T.
- Liang, J., Kimchi, E., Staveley-O'Carroll, K., Tan, D. (2009) Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Carcinoma, *Int J Clin Exp Pathol*. 2009

7. Literaturverzeichnis

- Lim, W, et al., (2004) Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers. *Gastroenterology*, 2004. **126**(7): p. 1788-94.
- Louvet C, Labianca R, Hammel P, Lledo G, Zampino MG, André T, Zaniboni A, Ducreux M, Aitini E, Taïeb J, et al. (2005) Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J Clin Oncol*. 2005;23:3509–3516.
- Lüllmann-Rauch R.: *Histologie*, S. 402-407, 2. Auflage Thieme Verlag Stuttgart, Aufl. 2006
- Luo W, Tupolsky M, Earley K, Wood CG, Wilson DR, Logothetis CJ, Lin SH (1999) Tumor-suppressive activity of CD66a in prostate cancer. *Cancer Gene Ther* 6:313-321
- Luo W, Wood CG, Early K, Hung M-C, Lin S-H (1997) Suppression of tumorigenicity of breast cancer cells by an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM-1): the adhesion and growth suppression are mediated by different domains- *Oncogene* 14:1697-1704
- Lynch, H T et al., (2002) Phenotypic variation in eight extended CDKN2A germline mutation familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma-prone families: the familial atypical mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer*, 2002. **94**(1): p. 84-96
- Mackay DJ, Hall A (1998) Rho GTPases. *J Biol Chem* 273:20685-20688
- Mahaseth H, Brutcher E, Kauh J, Hawk N, Kim S, Chen Z, Kooby DA, Maithel SK, Landry J, El-Rayes BF, (2013) Modified FOLFIRINOX regimen with improved safety and maintained efficacy in pancreatic adenocarcinoma, *Pancreas*. 2013 Nov;42(8):1311-5
- Mahrenholz AM, Yeh CH, Shively Je, Hefta SA (1993) Microsequence and mass spectral analysis of nonspecific cross-reaction antigen 160, a CD15-positive neutrophil membrane glycoprotein. *Biol Chem* 268:13015-13018
- Majuri MI, Hakkarainen M, Paavonen T, renkonen R (1994) Carcinoembryonic antigen is expressed on endothelial cells. A putative mediator of tumor cell extravasation and metastasis. *Apmis* 102:432-438
- Makarovskiy AN, Pu VS, Lo P, Earley K, Paglia M, Hixson DC, Lin SH (1999) Expression and androgen regulation of C-CAM cell adhesion molecule isoforms in rat dorsal and ventral prostate. *Oncogene* 18:3252-3260
- Martin M, Romero X, de la Fuente MA, Tovar V, Zapter N, Esplugues F, Pizcueta P, Bosch J, Engel P (2001) CD 84 function as a homophilic adhesion molecule and enhance IFN

7. Literaturverzeichnis

- Maraga L1, Cummings M, Peter MB, Shaaban AM, Horgan K, Hanby AM, Speirs V. (2008) Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 6 predicts breast cancer recurrence following adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res.* 2008 Jan 15
- Markel G, Lieberman N, Katz G. „CD66a Interactions Between Human Melanoma and NK Cells: A Novel Class I MHC-Independent Inhibitory Mechanism of Cytotoxicity .“ *J Immunol* 168 (2002): 2803-10
- Möller MJ, Kammerer R, Grunert F, von Kleist S (1996) Biliary glycoprotein (BGP) expression on T- cells and on a natural-killer-cell sub-population. *Int J Cancer* 65:740-745
- Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2007) Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol.* 2007 May 20;25(15):1960-6. Epub 2007 Apr 23. PM:17452677
- Moore MJ, Hamm J, Dancey J, Eisenberg PD, Dagenais M, Fields A, Hagan K, Greenberg B, Colwell B, Zee B, et al. (2003) Comparison of gemcitabine versus the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in patients with advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol.* 2003;21:3296–3302.
- Müller M und Mitarbeiter, *Chirurgie für Studium und Praxis* 2010 / 2011, S. 269-271, 10. Auflage, Medizinischer Verlags und Informationsdiens Breisach 2010
- Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM (1996) Structural basis of calcium- induced E-Cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380:360-364
- Najjar SM, Boisclair YR, Nabih ZT, Philippe N, Imai Y, Suzuki Y, Suh DS, Ooi GT (1996) Cloning and characterisation of a functional promoter of the rat pp120 gene, encoding a substrate of the insulin receptor tyrosine kinase *J Biol Chem* 271:8809-8817
- Nap M, Hammarström M-L, Börner O, Hammarström S, Wagener C, Handt S, Schreyer M, Mach J-P, Buchegger F, von Kleist S, Grunert F, Seguin P, Fuks A, Holm R, Lamerz R (1992) Specificity and affinity of monoclonal antibodies against CEA, *Cancer Res* 52:2329-2339
- Neoptolemos, J P, et al.,(2004) A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 2004. **350**(12): p. 1200-10.

7. Literaturverzeichnis

- Neoptolemos, J P et al., (2010) Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2010. **304**(10): p. 1073
- Neumaier M, Paulutat S, Chan A, Mattaes P, Wagener C (1993) Biliary glycoprotein, a potential human adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10744-10748
- Ni XG, Bai XF, Mao YL, Shao YF, Wu JX, Shan Y, Wang CF, Wang J, Tian YT, Liu Q, Xu DK, Zhao P (2005) The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2005 Mar;31(2):164-9
- Nollau P, Scheller H, Kona-Horstmann M, Rhde S, Hagenmüller F, Wagener C, Neumaier M (1997) Expression of CD 66a (human C-CAM) and other members of the carcino-embryonic antigen gene family of adhesion molecules in human colorectal adenomas. *Cancer Res* 57:2354-2357
- Öbrink B (1997) CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Struct Biol* 9:616-626
- Öbrink B, Sawa H, Scheffrahn I, Singer BB, Sigmundsson K, Sundberg U, Heymann R, Beauchemin N, Wenig G, Ram P, Iyengar R (2002) Computational analysis of isoform-specific signal regulation by CEACAM1-A cell adhesion molecule expression in PC12 cells. *Ann NY Acad Sci* 971:597-607
- Odin P, Tingström A, Öbrink B (1986) Chemical characterisation of cell- CAM 105, a cell-adhesion molecule isolated from rat liver membranes *Biochem J* 236:559-568
- Oettle, H., et al., (2007) Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2007. **297**(3): p. 267-77.
- Ohwada A, Takahashi H, Nagaoka I, Kira S (1994) Biliary glycoprotein mRNA expression is increased in primary lung cancer, especially in squamous cell carcinoma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:214-220
- Oikawa S, Inuzuka C, Kuroki M, Arakawa F, Masuoka V, Kosaki G, Nakazato H (1991) A specific heterotypic cell adhesion activity between members of carcinoembryonic antigen family. W272 and NCA, is mediated by N-domains. *J Biol Chem* 266:7995-8001
- Oikawa S, Nakazato H, Kosaki G (1987) Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 142:511-518

7. Literaturverzeichnis

- Oken M M, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP (1982) Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 5:649-655
- Pallen CJ, Tong PH (1991) Elevation of membrane tyrosine phosphatase activity in density-dependent growth-arrested fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6996-7000
- Paxton RJ, Mooser G, Pande H, Lee TD, Shively JE (1987) Sequence analysis of CEA: identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergenes. *Proc Natl. Acad Sci U S A* 84:920-924
- Phan D, Sui X, Chen DT, Najjar SM, Jenster G, Lin SH (2001) Androgen regulation of the cell-cell adhesion molecule 1 (Cecam1) gene. *Mol Cell Endocrinol* 184:115-123
- Philipps SA, Perrotti N, Taylor SI (1987) Rat liver membranes contain a 120 kDA glycoprotein which serves as a substrate for the tyrosine kinase of the receptors for insulin and epidermal growth factor. *FEBS Lett* 212:141-144
- Poplin E, Feng Y, Berlin J, Rothenberg ML, Hochster H, Mitchell E, Alberts S, O'Dwyer P, Haller D, Catalano P, et al. (2009) Phase III, randomized study of gemcitabine and oxaliplatin versus gemcitabine (fixed-dose rate infusion) compared with gemcitabine (30-minute infusion) in patients with pancreatic carcinoma E6201: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2009;27:3778–3785.
- Prall F, Nollau P, Neumaier M, Haubeck H-D, Drzeniek Z, Helmchen U, Lönning T, Wagner C (1996) CD66a (BGP), an adhesion molecule of the CEA family, is expressed in epithelium, endothelium and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 44:35-41
- Pu YS, Luo W, Lu HH, Greenberg NM, Lin SH, Gingrich JR (1999) Differential expression of C-CAM cell adhesion molecule in prostate carcinogenesis in a transgenic mouse model. *J Urol* 162:892-896
- Rao Y, Zhao X, Siu CH (1994) Mechanism of homophilic binding mediated by the neural cell adhesion molecule NCAM. Evidence for isologous interaction. *J Biol Chem* 269:27540-27548
- Rebstock S, Lucas K, Weiss M, Thompson J, Zimmermann W (1993) Spatiotemporal expression of pregnancy specific glycoprotein gene mCGM1 in rat placenta. *Dev Dyn* 198:171-181
- Riehdorf L, Lisboa BW, Henkel U, Naumann M, Wagener C, Lönning T (1997) Differential expression of CD66a (BGP), a cell adhesion molecule of carcinoembryonic antigen family, in benign premalignant, and malignant lesion of the human mammary gland. *J Histochem Cytochem* 45:957-963

7. Literaturverzeichnis

- Robitaille J, Izzi L, Daniels E, Zelus B, Holmes KV, Beauchemin N (1999) Comparison of expression patterns and cell adhesion properties of the mouse biliary glycoproteins Bbgp1 and Bbgp2. *Eur J Biochem* 264:534-544
- Rosenberg M, Nedellec P, Jothy S, Fleischer D, Turbide C, Beauchemin N (1993) The expression of mouse biliary glycoprotein, a carcinoembryonic antigen-related gene, is downregulated in malignant mouse tissue. *Cancer Res* 55:4938-4945
- Ruchaud-Sparagano MH, Stocks SC, Turley H, Dransfield I (1997) Activation of neutrophil function via CD66: differential effects upon beta 2 integrin mediated adhesion. *Br J Haematol* 98:612-620
- Ruggiero T, Olivero M, Follenzi A, Naldini I, Calogero R, Di Renzo MF (2003) Deletion in a (T)8 microsatellite abrogates expression regulation by 3'UTR. *Nucleic Acids Res* 31:6561-6569
- Rulyak, S.J., et al., (2003) Characterization of the neoplastic phenotype in the familial atypical multiple-mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer*, 2003. **98**(4): p. 798-804.
- Sadekova S, Lamarche-Vane N, Li X, Beauchemin N (2000) The CEACAM1-L glycoprotein associates with actin cytoskeleton and localizes to cell-cell contact through activation of Rho like GTPases. *Mol Biol Cell* 11:65-77
- Sanders DS, Kerr MA (1999) Lewis blood group and CEA related antigens; coexpressed cell-cell adhesion molecules with roles in the biological progression and dissemination of tumours. *Mol Pathol* 52:174-178
- Sawa H, Kamada H, Sato H, Sando S, Kondo A, Ukita H, Saito I, Edlund M, Öbrink B (1994) C-CAM expression in the developing rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 78:35-43
- Schözel S, Zimmermann W, Schwarzkopf G, Grunert F, Rogaczewski B, Thompson J (2000) Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyposis and early adenomas. *Am J Pathol* 156:595-605
- Schrewe H, Thompson J, Bona M, Hefta LJ, Mruya A, Hassauer M, Shively JE, von Kleist S, Zimmermann W (1990) Cloning of the complete gene of carcinoembryonic antigen for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type specific expression. *Mol Cell Biol* 10:2738-2748
- Schumann D, Chen CJ, Kaplan B, Shively JE (2001) Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton proteins actin and tropomyosin. *J Biol Chem* 276:47421-47433

7. Literaturverzeichnis

- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K : Prometheus Lernatlas der Anatomie Hals und Innere Organe, S. 214- 217 und S. 336 , Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage 2005
- Serra S1, Asa SL, Bamberger AM, Wagener C, Chetty R(2009) CEACAM1 expression in pancreatic endocrine tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2009 Jul;17(4):286
- Sharpio L, Fannon Am, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Mals-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA (1995) Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374:327-337
- Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, and Alt FW. (1992) RAG-2-Deficient Mice Lack Mature Lymphocytes Owing to Inability to Initiate V(D)J Rearrangement, *Cell*, 68: 855-867
- Simeone, D., Ji, Baoan Banerjee, Mousumi, Arumugam, Thiruvengadam, Li, Dawei, Anderson, Michelle A., Bamberger, Ann Marie , Greenson, Joel, Brand, Randal E., Ramachandran, ViJaya, Logsdon, Craig D.,(2007) CEACAM1, a Novel Serum Biomarker for Pancreatic Cancer, *Pancreas: 2007 - Volume 34 - Issue 4 - pp 436-443*
- Singer BB, Scheffrahn I, Öbrink B (2000) The tumor growth inhibiting cell adhesion molecule CEACAM 1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation
- Skubitz KM, Campbell KD, Ahmed K, Skubitz AP (1995) CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J Immunol* 155:5382-5390
- Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP (1996) CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J Leukoc Biol* 60:106-117
- Skubitz KM, Ducker TP, Goueli SA (1992) CD66 monoclonal antibodies recognize a phosphotyrosine containing pretein bearing a CEA cross-reacting antigen on the surface of human neutrophils. *J Immunol* 148:852-860
- St. Croix B, Sheehan C, Rak JW, Florence VA, Slingerland JM, Kerbel RS (1998) E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (KIP1). *J Cell Biol* 142:557-571
- Stafford P, , Zbigniew Cichacz, Neal W. Woodbury, and Stephen Albert Johnston (2014) Immunosignature system for diagnosis of cancer , *PNAS* July 29, 2014 vol. 111 no. 30, E3072–E3080, doi: 10.1073/pnas.1409432111
- Stanners C (1998) Cell adhesion and communication mediated by the CEA family: basic and clinical principles. Harwood Academic, Amsterdam, pp 57–71

7. Literaturverzeichnis

- Stocks CS, Kerr MA (1993) Neutrophil NCA-160 (CD66) is a major protein carrier of selectin binding carbohydrate groups LewisX and sialyl lewisX. *Biochem Biophys Res Commun* 195:478-483
- Stocks Sc, Albrechtsen M, Kerr MA (1996) Expression of the CD15 differentiation antigen (3-fucosyl- N-acetyl-lactosamine, LeX) on putative neutrophil adhesion molecules CR3 and NCA-160. *Biochem J* 268:275-280
- Stocks SC, Kerr MA, Hasslett C, Dransfield I (1995) CD66- dependent neutrophil activation: a possible mechanism for vascular selectin- mediated regulation of neutrophil adhesion. *J Leukocyte Biol* 58:40-48
- Strickland LA1, Ross J, Williams S, Ross S, Romero M, Spencer S, Erickson R, Sutcliffe J, Verbeke C, Polakis P, van Bruggen N, Koeppen H. (2009) Preclinical evaluation of carcinoembryonic cell adhesion molecule (CEACAM) 6 as potential therapy target for pancreatic adenocarcinoma. *J Pathol.* 2009 Jul;218(3):380-90. doi: 10.1002/path.2545.
- Stuart DI, Jones EY (1995) Recognition at the cell surface: recent structural insights- *Curr Opin Struct Biol* 5:735-743
- Sun QH, DeLisser HM, Zukowski MM, Paddock C, Albelda SM, Newman PJ (1996) Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate homophilic binding and modulate receptor affinity *J Biol Chem* 271:11090-11098
- Sundberg U, Öbrink B (2002) CEACAM 1 isoforms with different cytoplasmic domains show different localization, organization and adhesive properties in polarized epithelial cells. *J Cell Sci* 115:1273-1284
- Svalander PC, Odin P, Nilsson BO, Öbrink B (1990) Expression of cellCAM-105 in the apical surface of rat uterine epithelium in controlled by ovarian steroid hormones. *J Reprod Fertil* 88:213-221
- Takahashi H, Okai Y, Paxton RJ, Hefta LJJ, Shively JE (1993) Differential regulation of Ceam and BGP by γ -IFN. *Cancer Res* 53:1612-1619
- Tan K, Zelsus BD, Meijers R, Liu JH, Bergelson JM, Duke N, Zhang R, Joachimiak A, Holmes KV, Wang JH (2002) Crystal structure of murine sCEACAM1a(1,4): a coronar-virus receptor in the CEA family. *EmBO J* 21:2076-2086
- Tanaka K, Hinoda Y, Takahashi H, Sakamoto H, Nakajima YM, Imai K (1997) Decreased expression of biliary glycoprotein in epatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 74:15-19

7. Literaturverzeichnis

- Taylor A, Sohn M.D., Charles J, Yeo M.D., John L. Cameron M.D., Leonidas Koniaris M.D., Sunjay Kaushal M.D., Ross A. Abrams M.D., Patricia K. Sauter A.C.N.P., JoAnn Coleman A.C.N.P., Ralph H. Hruban M.D., Keith D. Lillemoe M.D. (2000) Resected adenocarcinoma of the pancreas— 616 patients: Results, outcomes, and prognostic indicators, *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2000, Vol 4, I 6, pp 567-579
- Thies A, Mol I, Berger J, Wagner C, Brümmer J, Schulze JH, Brunner, G, Schumacher U (2002) CEACAM 1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J Clin Oncol* 20:2530-2536
- Thöm I, Schult-Kronefeld O, Burkholder I et al. (2009) „Expression of CEACAM-1 in Pulmonary Adenocarcinomas and their Metastases.“ *Anticancer Res* 29, Nr. 1 (2009): 249-254.
- Tilki, Irmak, Oliveira-Ferrer, Hauschild, Miethe, Atakaya, Hammerer, Friedrich, Schuch, Galalae, Stief, Kilic, Huland, Ergun, CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer (2006) *Oncogene* 25, 4965–4974. doi:10.1038/sj.onc.1209514; published online 27 March 2006
- Tilki D, Oliveira-Ferrer L, Kilic N, Friedrich MG, Stief CG, Ergun S, One molecule, two faces. Epithelial loss of cell adhesion molecule CEACAM1 activates angiogenesis in bladder and prostate cancer], (2007), *Urologe A. Sep*;46(9):1128
- Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W (1991) Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 5:344-366
- Turbide C, Kunath, T, Daniels E, Beauchemin N (1997) Optimal ratios of biliary glycoprotein isoforms required for inhibition of colonic tumor cell growth. *Cancer Res* 57:2781-2788
- Ueno, H., et al., (2009) A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Br J Cancer*, 2009. **101**(6): p. 908-15.
- Varner JA, Brooks PC, Chersh DA (1995) Review: the Integrin alpha V beta 3: angiogenesis and apoptosis. *Cell Adhes Cimmjun* 3:367-374
- Vervenne W, Bennouna J, Humblet Y, Gill S, Moore MJ, Van Laethem J, Shang A, Cosaert J, Verslype C, Van Cutsem E. (2008) A randomized, double-blind, placebo (P) controlled, multicenter phase III trial to evaluate the efficacy and safety of adding bevacizumab (B) to erlotinib (E) and gemcitabine (G) in patients (pts) with metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2008;26:4507.
- Walsh CM, Matloubian M, Liu C, Ueda R, Kurahara CG, Christensen JL, Huang MTF, Young JD, Ahmed R, and Clark WR. (1994) Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(23): 10854-10858.

- Wang J, Springer TA (1998) Structural specialization of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol Rev* 163:197-215
- Wang L, Lin SH, Wu WG, Kemp BI, 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
- Watt SM, Teixeira AM, Zhou GQ, Doyonnas R, Zhang Y, Grunert F, Blumberg RS, Kuroki M, Skubitz KM, Bates PA (2001) Homophilic adhesion of human CEACAM 1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. *Blood* 98:1469-1479
- Welsch U., Deller T., *Lehrbuch der Histologie*, S. 25-30, Elsevier, Urban und Fischer Verlag, 3. Auflage 2010
- Wicklein, D. (2012) RNAi Technology to Block the Expression of Molecules Relevant to Metastasis: The Cell Adhesion Molecule CEACAM1 as an Instructive Example, *Metastasis Research Protocols*, Volume 878 of the series *Methods in Molecular Biology* pp 241-250
- Williams AF, Barclay AN (1988) The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 6:381-405
- Zimmermann W (2002) Carcinoembryonic antigen. In Creighton T (ed) *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*. John Wiley and Sons, New York, pp 459-462
- Zimmermann W, Ortlieb B, Friedrich R, von Kleist S (1987) Isolation and characterization of cDNA clones encoding the human carcinoembryonic antigen reveal a highly conserved repeating structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2960-2964

8. Danksagung

Ich danke zunächst natürlich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Udo Schumacher, Leiter des Instituts für Anatomie und Experimentelle Morphologie am Uniklinikum Hamburg Eppendorf, für das Angebot des Themas und meines Arbeitsplatzes, das freundliche Bereitstellen der Materialien und seine kritischen Ratschläge. Ich fühlte mich immer willkommen und nett aufgehoben. Der persönliche Bezug, die Arbeitsatmosphäre und Ihr gesamtes Team im Anatomischen Institut waren immer äußerst angenehm. Sie hatten immer ein freundliches Ohr und nahmen sich die Zeit, einem weiterzuhelfen und nach dem neustens Stand zu fragen - immer mit einer persönlichen Anekdote. Vielen Dank dafür!

Ebenso möchte ich meinen Betreuern, Herrn Dr. rer. nat. Daniel Wicklein und Herrn Dr. med. Florian Gebauer herzlichst danken für all die Geduld, den Arbeitsgeist und das Engagement, die konstruktiven Verbesserungsvorschläge, Ideen und Unterstützung in dieser Zeit, ebenso für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens. Danke!

Ich danke auch dem gesamten Team des Anatomischen Instituts, welches mich in meine neuen Methoden und Arbeitsplätze eingearbeitet hat und mir immer bei Fragestellungen weitergeholfen hat, danke vor allem an Christine, Renate, Jenny, Susanne, Carsten, Maïke; ihr habt mir sehr geholfen und wart sehr geduldig mit mir. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Makowski für die organisatorische Unterstützung.

Natürlich danke ich auch meiner ganzen Familie, die mir während des gesamten Zeitraums im Studium eine mentale Stütze war und ohne die mein Studium nie möglich gewesen wäre. Danke, dass ihr mich stetig aufgebaut und liebevoll unterstützt, mitgefiebert und motiviert habt. Ihr seid klasse!

Ebenso meiner zweiten „Familie“, Kommilitonen und freundschaftliche Unterstützung in Form von Lerncamps, Abholung von den Prüfungen, Zwischenpausen in der Bibliothek und aufbauenden Mensapausen während des Studiums: Katja, Philipp, Paul, Samira, Kathi, Bine, Steffi, Benny, Rüdiger; ohne euch und den anderen wäre alles nur halb so schön gewesen.

Im Andenken an Karl- Heinz Dahl, einem sehr inspirierenden, besonderen Mann und eine Erinnerung, wieso Forschung und Fortschritt in der Medizin ein großer Ansporn bleiben sollte.

9. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten	Jennifer Sarah Horst, geboren 04-02-1986 in Lübeck
Schule	1992 - Juli 2005 Grundschule Niendorf Ostsee Ostsee-Gymnasium Timmendorfer Strand Abitur mit der Durchschnittsnote 1,6
Studium	Humanmedizinstudium Uniklinikum Hamburg Eppendorf, Oktober 2006 - Mai 2013 Physikum mit der Note 2,5, Frühjahr 2009 Hammerexamen mit der Note 2,5, Frühjahr 2013
Famulaturen	Hand-, Plastische- und Ästhetische Chirurgie , Schön Klinik Neustadt, 6 Wochen, 2009 Pädiatrie an dem Uniklinikum Hamburg Eppendorf, 6 Wochen, 2011 Zentrale Notaufnahme (Innere/Chirurgie) Agaplesion, Hamburg, 4 Wochen, 2011
Praktisches Jahr	Innere Medizin Kantonspital St. Gallen, Schweiz 02-03/12 (Pneumologie) Kantonspital Luzern, Schweiz 04-05/12 (Allgemeine Innere, Intensivstation + Notaufnahme) Gynäkologie und Geburtshilfe Uniklinikum Hamburg Eppendorf, Hamburg 06-09/12 Chirurgie Groote Schuur Hospital, Kapstadt, Südafrika 10/12-01/13 Endokrine + Onkologische Chirurgie, 2 Monate Plastische Rekonstruktive Medizin und MKG, 2 Monate
Nebentätigkeiten	2008- 2010 Tutorin im Anatomischen Institut Uniklinikum Hamburg Eppendorf 2010- 2012 Operationsassistentin in der Facharztklinik Hamburg
Doktorarbeit	Experimentelle Doktorarbeit zum Pankreaskarzinom in dem Anatomischen Institut Hamburg Eppendorf, 2009-2016
Berufe	Assistenzärztin der Allgemeinmedizin Ab 04/2016 Dres. Lange- Manchot, Klinische Praxen, Hamburg (Allgemeinmedizin) 06/2015 – 11/2015 Asklepios Klinikum Barmbek Hamburg (Unfallchirurgie) 07/2013 – 05/2015 Facharztklinik Hamburg Eppendorf (Orthopädie)

10. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: