

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie
Zentrum für experimentelle Medizin

Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher

Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle im Endothel und Mesothel

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Jamila Arianne Meret Kliege
aus Barcelona

Hamburg, 2021

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.08.2021

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Udo Schumacher

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Endothel und Mesothel	2
1.2	Peritonealkarzinose	4
1.3	Metastasierungskaskade	6
1.4	Zelladhäsionsmoleküle	9
1.4.1	Superfamilie der Cadherine	9
1.4.2	Familie der Selektine	10
1.4.3	Superfamilie der Integrine	11
1.4.4	Immunoglobulin-Superfamilie	12
1.4.5	Zelladhäsionsmolekül CD44	13
1.5	Hyaluronan	14
1.6	Intermediärfilamente	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Reagenzien	17
2.1.2	Antikörper	18
2.1.3	Puffer, Lösungen und Medien	18
2.1.4	Geräte und Verbrauchsmaterial	19
2.1.5	Software	19
2.1.6	Untersuchungsmaterial	19
2.2	Methoden	21
2.2.1	Anfertigung von Paraffinschnitten	21
2.2.2	Deparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte	21
2.2.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	21
2.2.4	Immunhistochemie	21
2.2.5	Zellkernfärbung mittels Mayers-Hämalaunlösung	26
2.2.6	Mikroskopische Auswertung	27
3	Ergebnisse	28
3.1	E-Selektin	29
3.2	P-Selektin	32
3.3	Integrin β 1	34
3.4	Integrin β 3	37
3.5	Integrin β 4	39
3.6	Zelladhäsionsmolekül L1	41
3.7	Zelladhäsionsmolekül CD44	42
3.8	Hyaluronan	43
3.9	Pan-Zytokeratin	44
3.10	Zytokeratin K8	46
3.11	Zytokeratin K15	48
3.12	Vimentin	50
3.13	Übersicht der verschiedenen Färbungen	54
4	Diskussion	55
4.1	E-Selektin	55
4.2	P-Selektin	58

4.3	Integrin $\beta 1$	59
4.4	Integrin $\beta 3$	61
4.5	Integrin $\beta 4$	61
4.6	Zelladhäsionsmolekül L1	62
4.7	Zelladhäsionsmolekül CD44 und Hyaluronan	62
4.8	Charakterisierung der Endothel- und Mesothelzellen anhand ausgewählter Intermediärfilamente.....	64
5	Zusammenfassung	67
6	Abstract.....	68
7	Abkürzungsverzeichnis	69
8	Literaturverzeichnis	70
9	Danksagung	85
10	Lebenslauf.....	86
11	Eidesstattliche Erklärung.....	87

Fragestellung und Zielsetzung

Das Endothel und das Mesothel haben morphologisch, funktionell und embryologisch viele Gemeinsamkeiten. Embryologisch entwickeln sich beide aus dem Seitenplattenmesoderm. Das Endothel spielt eine entscheidende Rolle bei der hämatogenen Metastasierung, während das Mesothel eine entscheidende Rolle bei der peritonealen Metastasierung spielt. Der essenzielle Schritt bei der Tumormetastasierung ist die Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel bei der hämatogenen Metastasierung bzw. Mesothel bei der peritonealen Metastasierung. Im Rahmen der hämatogenen Metastasierung konnten eine Vielzahl beteiligter Zelladhäsionsmoleküle und ihre Liganden identifiziert werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass Tumorzellen, die das Peritoneum befallen, teilweise gleiche Zelladhäsionsmoleküle wie bei der hämatogenen Metastasierung nutzen. In dieser Arbeit soll deshalb die Frage beantwortet werden, welche Zelladhäsionsmoleküle von Endothel- und Mesothelzellen exprimiert werden und ob Unterschiede hinsichtlich des Expressionsmusters zwischen den beiden Zelltypen bestehen. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob Unterschiede im Expressionsmuster zwischen normalen, akut-entzündlichen, chronisch-entzündlichen und neoplastischen Endothel bzw. Mesothel vorliegen. Zudem werden Endothel- und Mesothelzellen hinsichtlich ihrer exprimierenden Intermediärfilamente charakterisiert um Marker für das Endothel bzw. Mesothel festlegen zu können. Untersucht wurden E- und P-Selektine, Integrin $\beta 1$, $\beta 3$ und $\beta 4$, Zelladhäsionsmolekül L1, Zelladhäsionsmolekül CD44, Hyaluronan sowie die Intermediärfilamente Pan-Zytokeratin, Zytokeratin K8, Zytokeratin K15 und Vimentin.

1 Einleitung

1.1 Endothel und Mesothel

Das Mesoderm, das mittlere Blatt der drei Keimblätter, lässt sich weiter in das paraxiale, das intermediäre und das Seitenplattenmesoderm unterteilen. Aus dem Seitenplattenmesoderm entstehen Bindegewebe, einige Knochen, glatte Muskulatur, seröse Häute, Blutzellen, Blut- und Lymphgefäße und wenige Organe wie Herz, Milz und Nebennierenrinde (Moore et al., 2013).

Endothelzellen und hämatopoetische Zellen scheinen mit dem Hämangioblasten eine gemeinsame Vorläuferzelle zu besitzen, die ihren Ursprung in der Splanchnopleura des Seitenplattenmesoderms hat (Choi et al., 1998). Das Endothel ist Teil des Herz-Kreislauf-Systems. Endothelzellen kleiden die innerste Schicht aller Blutgefäße aus und bilden einen einschichtigen Verband flacher Zellen, die einer Basalmembran aufliegen (Welsch et al., 2014). Luminal besitzen sie eine hohe Glykokalyx (Alphonsus and Rodseth, 2014). Das Endothel kann je nach Gefäßabschnitt und Organlokalisierung kontinuierlich, fenestriert oder diskontinuierlich aufgebaut sein (Welsch et al., 2014). Durch verschiedene Stimuli wie TNF- α und IL-1 werden Endothelzellen vom inaktiven in einen aktiven Zustand gebracht. Im aktivierten Zustand schütten sie Zytokine und Chemokine aus und verändern ihre Ausstattung an Zelladhäsionsmolekülen (Krishnaswamy et al., 1999). Je nach Aktivierungszustand werden somit verschiedene und sogar gegenteilige Prozesse induziert. Abgesehen von ihrer Funktion als semipermeable Membran zwischen Blut und Gewebe wird ihnen eine grundlegende Bedeutung bei den regulatorischen Prozessen der Hämostase und Fibrinolyse zugeschrieben (Pearson, 1999). Endothelzellen können durch Ausschüttung vasoaktiver Substanzen den Gefäßtonus regulieren. Im Rahmen von Entzündungsprozessen sind sie an der Leukozytenrekrutierung und Immunantwort maßgeblich beteiligt (Springer, 1994). Darüber hinaus sind sie durch Differenzierung und Proliferation in der Lage Vaskulogenese und Angiogenese zu betreiben (Yancopoulos et al., 2000).

Die serösen Höhlen, Pleura-, Perikard-, Peritonealhöhle und das Cavum serosum testis, sind mit einer so genannten Serosa ausgekleidet. Die Serosa besitzt ein parietales Blatt, welches die äußere Wand auskleidet, und ein viszerales Blatt, welches die Oberfläche der in den Körperhöhlen befindlichen Organe überzieht. Sie ist durch das Mesothel und dem darunterliegenden submesothelialen Bindegewebe aufgebaut (Welsch et al., 2014). Die Mesothelzellen formen größtenteils einen einschichtigen kontinuierlichen Verband flacher Zellen, deren luminale Oberfläche mit Mikrovilli besetzt ist. Basal liegen sie einer

Einleitung

Basalmembran und einer dünnen Bindegewebsschicht auf. An einigen Stellen wie den Septen der Pleura, an Leber, an Milz, an den Milchflecken (Macula lactea) des Omentum majus und der peritonealen Seite des Diaphragmas haben die Mesothelzellen jedoch eine kubische Form (Mutsaers, 2002). Außerdem konnte in letzteren auch eine Diskontinuität der Mesothelzellschicht beobachtet werden - die so genannten lymphatischen Stomata, die unter anderem für die Absorption von Gewebeflüssigkeit und die Passage von Zellen des Immunsystems in die Peritonealhöhle verantwortlich sind (Wang et al., 2010).

Mesothelzellen entwickeln sich aus dem Seitenplattenmesoderm und enthalten deshalb auch mesenchymale Intermediärfilamente wie Vimentin und Desmin. Bemerkenswert ist jedoch, dass sie auch Zytokeratine exprimieren, die charakteristisch für Epithelzellen sind (LaRocca and Rheinwald, 1984, Ferrandez-Izquierdo et al., 1994). Im Rahmen der Peritonealdialyse konnte beobachtet werden, dass Mesothelzellen im Sinne der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) in der Lage sind, einen Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp einzunehmen, welcher mit einer Abnahme von Zytokeratinen und E-Cadherin einhergeht (Yanez-Mo et al., 2003).

Die glatte Oberfläche des Mesothels ist für ein reibungsarmes Gleiten der intraperitonealen Organe verantwortlich. Zu dieser Funktion scheint die mit Hyaluronan aufgebaute breite perizelluläre Matrix der Mesothelzellen beizutragen (Kramer et al., 2002, Basbug et al., 1998, Lessan et al., 1999). Die Mesothelzellen spielen eine große Rolle bei der Immunregulation. Durch verschiedene Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und PECAM-1 auf ihrer Oberfläche sind sie an der Leukozytenrekrutierung und -migration beteiligt (Zeillemaker et al., 1996, Cannistra et al., 1994, Bittinger et al., 1996). Antigenpräsentation und Aktivierung von Immunzellen gehören ebenfalls zu ihren Aufgaben (Hausmann et al., 2000). Im Rahmen der peritonealen Wundheilung sezernieren Mesothelzellen Mediatoren, die die Zellproliferation, Migration und Synthese von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix anregen (Mutsaers, 2002, Mutsaers et al., 1997). Ein Gleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse in den serösen Höhlen wird durch die mesotheliale Synthese von Gewebelplasminogenaktivator (tPA) und Plasminogenaktivatorinhibitoren (PAI) erreicht (Holmdahl, 1997). Des Weiteren sind Mesothelzellen an der Implantierung von Tumorzellen im Rahmen der Peritonealkarzinose beteiligt.

1.2 Peritonealkarzinose

Bei der Peritonealkarzinose handelt es sich um den tumorösen Befall des Peritoneums. Dabei kann zwischen der primären Neoplasie, dem malignen peritonealen Mesotheliom, und sekundären Tumorabsiedlungen unterschieden werden. Die Inzidenz des malignen peritonealen Mesotheliom fällt dabei mit 0,2-3 Fällen pro eine Million Einwohner in Industriestaaten sehr gering aus (Boffetta, 2007), wohingegen metastatische Absiedlungen maligner Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltraktes (vor allem Kolorektal-, Dünndarm-, Appendix-, Magen- und Pankreaskarzinome) und pelviner Organe (vor allem Ovarialkarzinome) weitaus häufiger vorkommen (Ceelen, 2007).

Die Prognose der Patienten mit Peritonealkarzinose ist insgesamt schlecht, variiert aber je nach Tumorentität. Beim kolorektalen Karzinom konnte bei 5-15% der Patienten bei Erstdiagnose eine peritoneale Karzinose festgestellt werden (Jayne et al., 2002, Kecmanovic et al., 2005). Das mediane Überleben nach kompletter Zytoreduktion gefolgt von hyperthermer intraperitonealer Chemotherapie (HIPEC) und systemischer Chemotherapie lag bei 22,4 Monaten (Verwaal et al., 2003). Eine Peritonealkarzinose zeigte sich auch bei 10-20% der Patienten bei Erstdiagnose eines Magenkarzinoms, wobei das mediane Überleben nach Zytoreduktion und HIPEC mit 7,9 Monaten schlechter als beim kolorektalen Karzinom ausfiel (Roviello et al., 2011, Gill et al., 2011). In einer multizentrischen prospektiven Studie lag die mittlere Überlebenszeit bei Patienten mit einer Peritonealkarzinose nicht-gynäkologischer Malignome bei nur sechs Monaten (Sadeghi et al., 2000). Das Ovarialkarzinom wird aufgrund seines symptomarmen Verlaufs zu 75% in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und ist deshalb am häufigsten mit einer Peritonealkarzinose vergesellschaftet. Die 5-Jahresüberlebensrate der Patienten mit einer fortgeschrittenen Erkrankung liegt trotz optimaler Zytoreduktion und Chemotherapie bei unter 30% (Giuntoli et al., 2009). 2013 wurden in Deutschland insgesamt über 60.000 Neuerkrankungen für das kolorektale Karzinom, über 15.000 für das Magenkarzinom und über 7.000 neue Fälle für das Ovarialkarzinom registriert (Robert Koch-Institut, 2016).

Da das Vorhandensein einer Peritonealkarzinose die Überlebenschancen so maßgeblich verringert, ist es von großem Interesse die molekularen Mechanismen, die für die Peritonealkarzinose ursächlich sind, zu verstehen. Am Anfang der Metastasierung müssen sich Tumorzellen aus dem primären Tumorzellverband lösen und auswandern. Im weiteren Schritt findet die Adhäsion an das Mesothel statt um danach in die Subserosa einzudringen und dort eine Tochtermetastase zu bilden (Ceelen and Bracke, 2009).

Einleitung

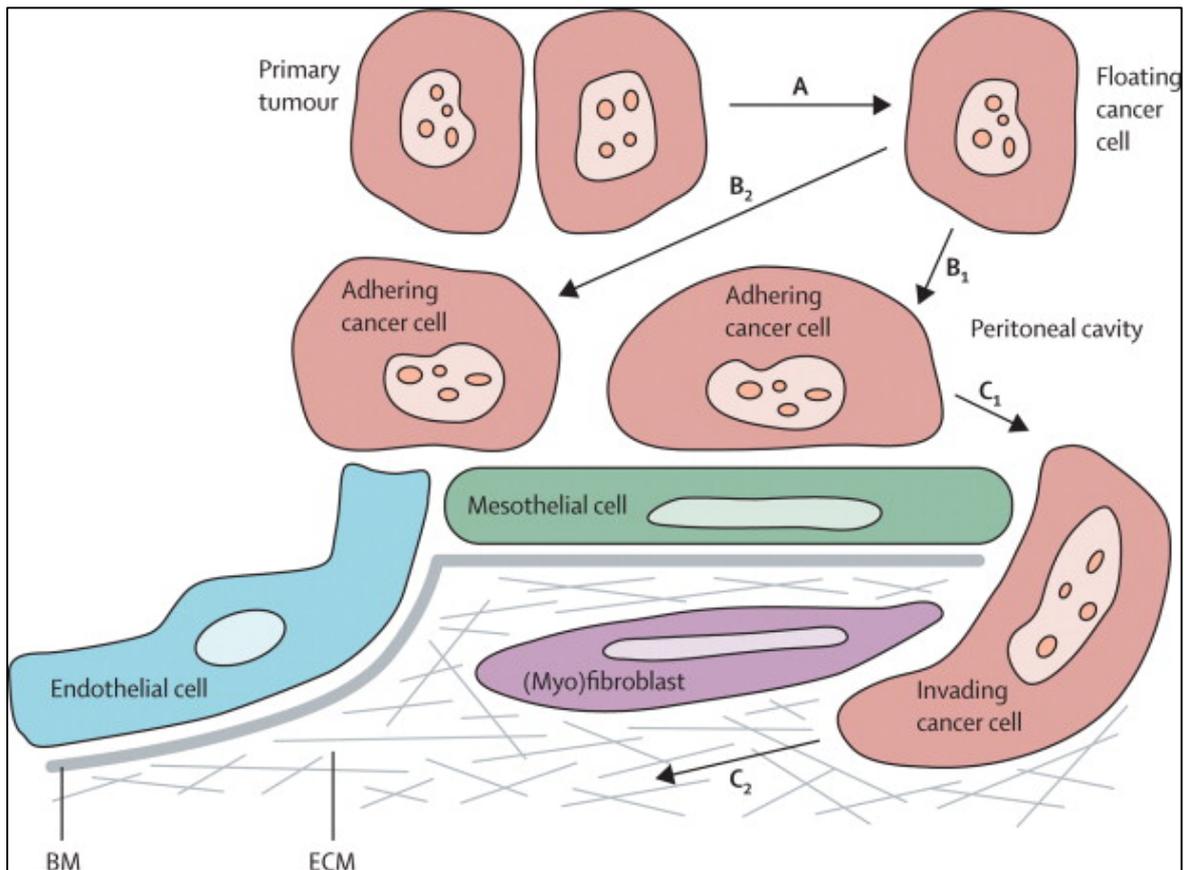


Abbildung 1.1.: Entstehung der Peritonealkarzinose nach Ceelen and Bracke (2009). (A) Ablösung der Tumorzellen aus dem Primärtumor mit der Entstehung freier Tumorzellen in der peritonealen Höhle. (B) Adhäsion an Mesothel- oder Endothelzellen. (C) Invasion des Stromas durch die Mesothelschicht.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, ähnlich wie die Immunzellen, die lymphatischen Stomata zur Tumordissemination zu nutzen (Kusamura et al., 2010). In den Milchflecken sammeln sich Immunzellen, Blut- und Lymphgefäße und auch lymphatische Stomata sind dort zu finden. Es konnte oftmals gezeigt werden, dass die Milchflecken an der Tumorzellimplantation intraperitonealer Karzinome beteiligt sind (Liu et al., 2016). Die malignen Zellen können per continuitatem, durch Tumorzellverschleppung mit dem Aszites oder während der Resektion des Primärtumors das Peritoneum erreichen (Stewart et al., 2005).

Die Ablösung der Tumorzellen findet wahrscheinlich spontan statt. Dieser Mechanismus wird bei Malignomen begünstigt, die die Serosa invadieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Invasion der Serosa mit einer schlechteren Prognose assoziiert war (Baskaranathan et al., 2004, Stewart et al., 2007). Auf molekularer Ebene sind auch bestimmte interzelluläre Zelladhäsionsmoleküle wie das E-Cadherin an diesem Prozess beteiligt (Kokenyesi et al., 2003). Darüber hinaus ist eine spontane Perforation des Kolons oder die unabsichtliche Tumorzellverschleppung während der Resektion, prognostisch ungünstig (McArdle et al., 2006).

Einleitung

Den nächsten entscheidenden Schritt stellt die Adhäsion freier Tumorzellen an das Mesothel und der darunterliegenden Extrazellulärmatrix dar. Diese wird durch verschiedene Zelladhäsionsmoleküle vermittelt, die unter anderem auch für die Interaktion von Tumorzellen mit Endothelzellen von Bedeutung sind. Es konnte gezeigt werden, dass Mesothelzellen die zu der Immunglobulin-Superfamilie gehörenden Proteine VCAM-1, ICAM-1 und PECAM-1 (Bittinger et al., 1996), das E-Selektin (Klein et al., 1995, Gebauer et al., 2013) und das Zelladhäsionsmolekül CD44 (Muller and Yoshida, 1995) exprimieren. Das auf mehreren Karzinomzelllinien intraperitonealer Malignome befindliche CD43 (Sialophorin) war *in vitro* für die Adhäsion an Mesothelzellen verantwortlich. Als Ligand diente das ICAM-1. (Ziprin et al., 2004). Das Transmembranprotein CD44 auf Ovarialkarzinomzellen und sein Ligand Hyaluronan waren *in vitro* und *in vivo* maßgeblich an der Adhäsion beteiligt (Cannistra et al., 1993, Strobel et al., 1997, Casey and Skubitz, 2000). Die E- und P-Selektine scheinen bei der Anheftung an das Peritoneum auch eine Rolle zu spielen. Die intraperitoneale Injektion einer Pankreaskarzinomzelllinie in E- und P-Selektin-defiziente Mäuse verringerte maßgeblich die peritonealen Absiedlungen im Vergleich zu Wildtypmäusen (Gebauer et al., 2013). An Stellen, wo das Mesothel diskontinuierlich aufgebaut ist, wird die Adhäsion der Tumorzellen an frei liegende Bestandteile der Extrazellulärmatrix größtenteils durch Integrinheterodimere vermittelt, die die β 1-Untereinheit besitzen (Takatsuki et al., 2004, Casey and Skubitz, 2000, Kawamura et al., 2001). Durch die Synthese mehrerer β 1-Integrin-Bindungspartner sind peritoneale Mesothelzellen an der Integrin-vermittelten Adhäsion beteiligt (Lissan et al., 1999). Die Adhäsion der Tumorzellen an das Mesothel wird durch die Heraufregulierung von Zelladhäsionsmolekülen verstärkt. Als Induktoren konnten mehrere inflammatorische Mediatoren, beispielsweise IL-1 β und TNF- α , identifiziert werden (van Grevenstein et al., 2006, van Rossen et al., 2001, Ziprin et al., 2003).

1.3 Metastasierungskaskade

Die disseminierte Krebserkrankung stellt trotz jahrzehntelanger Krebsforschung nach wie vor für Forscher und Ärzte einer der größten Herausforderungen dar. Die Prognose des an einem malignen Tumor erkrankten Patienten hängt vom metastatischen Potenzial der Tumorzellen ab, da die disseminierte Krebserkrankung in der Regel die Todesursache darstellt (Valastyan and Weinberg, 2011). Für die Entstehung einer Tumormetastase müssen Tumorzellen jeden einzelnen Schritt der komplexen Metastasierungskaskade durchlaufen.

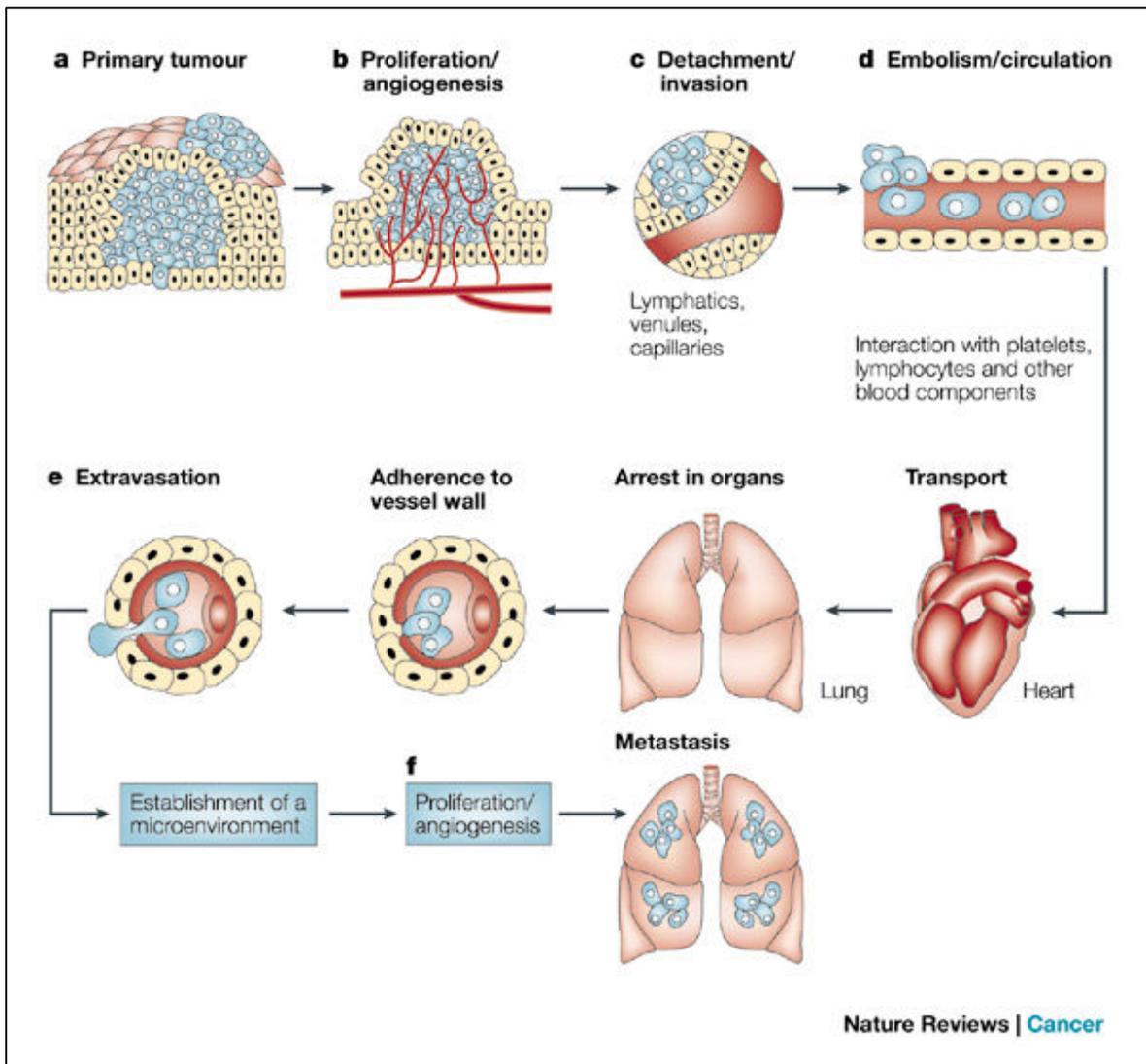


Abbildung 1.2.: Die Tumorzell-Metastasierungskaskade nach Fidler (2003). Zu den Einzelheiten siehe Text.

Zunächst kommt es zur Proliferation der Tumorzellen durch autokrine Stimulation durch Wachstumsfaktoren. Wachstumsfaktorrezeptoren auf Tumorzellen sind häufig überexprimiert, sodass schon geringe Mengen die Tumorzellen zur Proliferation anregen (Fedi et al., 1997).

Die Tumorzellen sind zum weiteren Wachstum in der Lage, Gefäßbildung (Angiogenese) zu induzieren, um ihren Sauerstoff- und Nährstoffbedarf zu decken. Unter hypoxischen Bedingungen im Kern der Tumormasse kommt es unter anderem zur Stimulierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) und somit zur Aktivierung Angiogenese-Induktoren und einer Reihe weiterer Gene, die zur Anpassung der Zelle an eine mangelnde Sauerstoffversorgung und zur Verhinderung der Apoptose zuständig sind (Harris, 2002). Inhibitoren der Angiogenese werden herunterreguliert, sodass die Endothelzellen zur Proliferation angeregt werden, durch Chemokine an den Ort der

Einleitung

Tumormasse migrieren und dort ein neues Gefäßsystem bilden, welches den Tumor versorgt (Blood and Zetter, 1990).

Im nächsten Schritt müssen invasive Tumorzellen den Zellverband des Primärtumors verlassen und die Basalmembran durchbrechen. Dieser Prozess wird als epithelial-mesenchymale Transition bezeichnet, wobei es zur Transformation von stark differenzierten Epithelzellen in Mesenchymzell-ähnliche invasiv wachsende Tumorzellen kommt (Christofori, 2006). Dabei kommt es zum Verlust der Zellpolarität und zur Herabregulierung epithelialer Proteine, wie des E-Cadherins, aber auch der Occludine und Proteine der Cateninfamilie. Cadherine und Catenine spielen dabei eine große Rolle bei der Regulation und Aufrechterhaltung von Zellverbänden über Zell-Zell-Kontakte. Zellen, die die epithelial-mesenchymale Transition durchlaufen haben, sind zur Zellmigration fähig und induzieren mesenchymale Proteine wie N-Cadherin, Vimentin, Laminin oder verschiedene Proteinasen (Thiery and Sleeman, 2006). Die Invasion der Tumorzellen beinhaltet auch die Anheftung der Tumorzellen an die Basalmembran, die durch Integrine und Zelladhäsionsmoleküle vermittelt wird (Aplin et al., 1998). Nach der Anheftung kommt es durch extrazelluläre Proteinase wie die Matrixmetalloproteinase, die Cysteinproteasen oder auch Faktoren des Plasminogen-Aktivator-Systems zur proteolytischen Auflösung der Basalmembran-Bestandteile und des darunterliegenden interstitiellen Stromas, die als Extrazellulärmatrix zusammengefasst werden (Coussens and Werb, 1996, Chambers and Matrisian, 1997).

Nachdem die Tumorzellen die ersten grundlegenden Schritte der Invasion bewältigt haben, gelingt es ihnen durch den Mechanismus der Intravasation in den Blutkreislauf zu gelangen. Innerhalb des Gefäßsystems überleben nur weniger als ein Prozent der Tumorzellen, da sie u.a. mechanischen Scherkräften und der Erkennung durch Immunzellen ausgesetzt sind (Molloy and van 't Veer, 2008). Tumorzellen scheinen durch einen Komplex mit Thrombozyten und die Interaktion mit Leukozyten und Endothelzellen einen Überlebensvorteil im Blutsystem zu erhalten, da hierdurch die Tumorzellen maskiert werden und nicht durch Zellen des Immunsystems erkannt werden (Blood and Zetter, 1990).

Bevor die Tumorzellen den Blutkreislauf wieder verlassen können, um Fernmetastasen zu bilden, müssen sie durch verschiedene Zelladhäsionsmoleküle an das Endothel binden. Dabei liegen ähnliche Mechanismen wie bei der Leukozytenmigration im Rahmen der Wundheilung und Entzündungsreaktion zugrunde. Die an diesem Prozess beteiligten Adhäsionsmoleküle sind hauptsächlich drei größeren Proteinsuperfamilien zuzuordnen: den Selektinen, den Integrinen und den Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie.

Proinflammatorische Mediatoren werden am Ort der Entzündung freigesetzt, wodurch verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert werden, die die Heraufregulierung der genannten Adhäsionsmoleküle bewirken. Die E- und P-Selektine sind für den ersten Kontakt und das Rollen der Leukozyten entlang der Endothelzellen verantwortlich. Durch das Zusammenspiel von Chemokin-vermittelten und Selektin-vermittelten Signalübertragungswegen kommt es zur Expression bzw. Aktivierung von Integrinen auf Leukozyten und Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie auf Endothelzellen und somit zur Ausbildung stärkerer Bindungen zwischen den beiden Zelltypen (Hynes, 1992, Smith, 2008, Ley, 2002, Springer, 1994).

Nach der Extravasation kommt es zur Proliferation der Tumorzellen und zur Ausbildung von Tochtergeschwülsten. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, in Apoptose zu gehen oder bis zum Zeitpunkt einer Aktivierung ruhend im Gewebe zu verbleiben (Chambers et al., 2002).

Bei den einzelnen Metastasierungsschritten stehen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen im Mittelpunkt, die durch Zelladhäsionsmoleküle vermittelt werden, weshalb im nächsten Teil auf diese genauer eingegangen wird.

1.4 Zelladhäsionsmoleküle

Die meisten Zelladhäsionsmoleküle können aufgrund ihrer Sequenz- und Strukturhomologie in vier Protein-Superfamilien unterteilt werden. Zu diesen gehören die Cadherine, die Selektine, die Integrine und die Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie (Bogenrieder and Herlyn, 2003).

1.4.1 Superfamilie der Cadherine

Als Cadherine werden eine große Gruppe heterogener Proteine beschrieben, die beim Menschen mit über 80 Mitgliedern vertreten ist. Weiter kann man sie in die klassischen Cadherine, desmosomalen Cadherine, Protocadherine, 7-Transmembranproteine, Rezeptor-Tyrosinkinase RET und Cadherin-ähnliche Signalproteine unterteilen (Yagi and Takeichi, 2000). Sie stellen mit einer Ausnahme Transmembranproteine dar, die durch mindestens fünf extrazelluläre Cadherin-Domänen charakterisiert werden. Eine grundlegende Funktion wird ihnen in der Aufrechterhaltung und Stabilisierung von Zellverbänden über Zell-Zell-Kontakte zugesprochen. Klassischerweise gehen sie Calcium-abhängig zumeist homophile Verbindungen mit benachbarten Cadherinen ein. Des Weiteren

werden über Cadherinbindung intrazelluläre Signaltransduktionswege aktiviert, die für die Organisation des Zytoskeletts, Zell-Zyklus-Regulierung und Zelldifferenzierung von Bedeutung sind (Angst et al., 2001, Niessen et al., 2011). Außerdem sind sie an Prozessen der Metastasierung beteiligt. So scheint eine veränderte Cadherinexpression der Tumorzellen für ihre Fähigkeit zur Migration bedeutsam zu sein (Cavallaro and Christofori, 2004).

1.4.2 Familie der Selektine

Die Selektine gehören zu den calciumabhängigen (C-Typ) Lektinen. Man kann die Selektine weiter in L-(leucocyte)-, P-(platelet) und E-(endothelial)-Selektine unterteilen.

Im Gegensatz zum L-Selektin werden die P- und E-Selektine erst auf einen bestimmten Reiz hin auf der Zelloberfläche der Endothelzellen exprimiert. Das P-Selektin wird in den α -Granula der Thrombozyten und den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert (McEver et al., 1989). Durch den Stimulus von Entzündungsmediatoren wie Thrombin oder Histamin wird es innerhalb von zehn Minuten auf der Zelloberfläche exprimiert, wobei nach 30 bis 60 Minuten das Protein durch Endozytose wieder von der Oberfläche verschwindet (Geng et al., 1990, Vestweber and Blanks, 1999).

Das E-Selektin wird durch Zytokine wie TNF- α , IL-1 oder bakterielle Lipopolysaccharide auf der Zelloberfläche von Endothelzellen exprimiert (Bevilacqua et al., 1987, Pober et al., 1987). Die maximale Proteinexpression wird drei bis vier Stunden nach dem Stimulus erreicht (Bevilacqua 1989).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Zelladhäsionsmolekülen, die an Proteine binden, gehen Selektine durch ihre Lektindomäne mit Kohlenhydratstrukturen calciumabhängig eine Bindung ein. Die Grundform dieser Liganden ist die Tetrasaccharidstruktur sialyl-Lewis^x (sLe^x) oder ihre Isomerstruktur sialyl-Lewis^a (sL^a) (Berg et al., 1991). Das PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) ist ein wichtiger Ligand auf Leukozyten, an den alle drei Selektine binden können, wobei die Bindungsaffinität von mehreren posttranslationalen Modifikationen abhängig ist (Abadier and Ley, 2017). Ein weiterer Ligand für E-Selektin stellt der ESL-1 (E-selectin ligand-1) dar (Stegmaier et al., 1995). Weiterhin können die E- und P-Selektine an eine spezifische glykosylierte Isoform des CD44 binden, die aus humanen hämatopoetischen Stammzellen isoliert werden konnte und deshalb auch als HCELL (hematopoietic cell E-/L-selectin ligand) bezeichnet wird (Sackstein, 2004).

Im Rahmen der Leukozytenrekrutierung sind Selektine für das „Rollen“ der Leukozyten entlang des Endothels zuständig (Bird et al., 1997). Es ist anzunehmen, dass sich

Tumorzellen diesen Mechanismus während der Extravasation zu Nutze machen. Für die Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel konnte das E-Selektin identifiziert werden (Kannagi et al., 2004, Witz, 2006). Darüber hinaus konnte durch die Blockierung des E-Selektins die Metastasenbildung eingeschränkt werden (Khatib et al., 2002, Kobayashi et al., 2000). Eine hohe Expression der Grundstruktur der Selektinliganden, sialyl Lewis^x und sialyl Lewis^a, auf Karzinomzellen konnte mit einer hohen Metastasierungsrate und einer schlechteren Prognose assoziiert werden (Magnani, 2004, Thurin and Kieber-Emmons, 2002).

1.4.3 Superfamilie der Integrine

Integrine spielen bei der Interaktion und den Informationsaustausch zwischen verschiedenen Zelltypen und der Extrazellulärmatrix sowie als Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle eine grundlegende Rolle (Barczyk et al., 2010). Sie bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind, und stellen somit heterodimere Transmembranproteine dar. Bekannt sind acht β - und 18 α -Untereinheiten, die zu 24 verschiedene Rezeptoren kombiniert werden können, die unterschiedliche Bindungseigenschaften besitzen (van der Flier and Sonnenberg, 2001).

So kommt es durch Ligandenbindung zu einer Vielzahl Integrin-vermittelter intrazellulärer Signaltransduktionswege, die einen Einfluss auf Zellproliferation, Zellwanderung, Verhinderung der Apoptose und Zelldifferenzierung haben. Abgesehen vom beschriebenen „outside-in“ Signalweg, existiert auch ein „inside-out“ Mechanismus, worüber die Aktivität der Integrinfunktion reguliert wird. Integrine können im inaktiven Zustand auf der Zelloberfläche vorhanden sein und erst durch ein Stimulus ihre Bindungsfähigkeit ausbauen (Hynes, 2002).

Als Integrin-Liganden dienen eine große Anzahl an Molekülen der Extrazellulärmatrix. Viele Integrin-Liganden-Paare und auch deren gemeinsame Erkennungssequenzen konnten über die Jahre identifiziert werden (Barczyk et al., 2010). So ist für die Bindung an Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin und Fibrinogen das Tripeptid RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) als gemeinsame Erkennungssequenz von Bedeutung (Humphries et al., 2006). Als Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle können sie über Proteine der Immunglobulin-Superfamilie mit anderen Zellen interagieren (Hemler, 1999). Das Integrin $\beta 1$ bildet mit den α -Untereinheiten 1-11 und αV mehrere Heterodimere. Als Kollagenrezeptoren dienen die Integrin-Heterodimere $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ und $\alpha 11\beta 1$, als Fibronectinrezeptoren die Integrine $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$ und $\alpha V\beta 1$, als Thrombospondinrezeptoren die Integrine $\alpha 2\beta 1$,

Einleitung

$\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 4\beta 1$ und als Lamininrezeptoren fungieren die Integrine $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ und $\alpha 10\beta 1$. Mit $\alpha 4$ und $\alpha 9$ bildet es einen Rezeptor für VCAM-1. Die Integrinuntereinheit $\beta 3$ findet sich in den Integrin-Heterodimeren $\alpha V\beta 3$ und $\alpha IIb\beta 3$ wieder. Das $\alpha IIb\beta 3$, welches auch als Glykoprotein IIb/IIIa bekannt ist, und das $\alpha V\beta 3$ fungieren unter anderem als Rezeptoren für Fibrinogen, Vitronektin, Fibronektin und von-Willebrand-Faktor. Das Integrin $\beta 4$ bildet allein mit der $\alpha 6$ -Untereinheit ein Komplex und dient als Rezeptor für Laminin (Humphries et al., 2006).

Eine grundlegende Bedeutung wird ihnen auch im Rahmen der Metastasierungsprozesse zugeschrieben. So konnten in mehreren Studien mehrere Integrin-Heterodimere identifiziert werden, deren Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert waren (Desgrosellier and Cheresch, 2010).

1.4.4 Immunglobulin-Superfamilie

Die Proteine der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) sind an vielen verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt. Vertreter dieser Proteinfamilie lassen sich durch eine oder mehrere Immunglobulin-Domänen in der extrazellulären Domäne charakterisieren, die alle eine ähnliche Faltblattstruktur aufweisen. Diese besteht aus zwei übereinanderliegenden β -Faltblättern aus je zwei β -Strängen, die in antiparalleler Richtung angeordnet sind (Williams and Barclay, 1988). Die meisten Mitglieder sind Membranproteine, die mit gleichen (homophilen) und/oder mit unterschiedlichen (heterophilen) Molekültypen interagieren. Dabei können sie Moleküle auf derselben (cis) oder auf benachbarten (trans) Zellen binden (Brummendorf and Rathjen, 1996).

Eine ganze Reihe von Mitgliedern der IgSF sind an Prozessen des Immunsystems beteiligt. Bei der Adhäsion der Leukozyten an das Endothel im Rahmen von Entzündungsprozessen gehen die Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, die sich auf dem Endothel befinden, eine starke Bindung mit den Leukozyten-Integrinen $\beta 2$ ein (Hemler, 1999).

Für die Entwicklung des Nervensystems sind mehrere Mitglieder der IgSF verantwortlich, dabei ist das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM (neural cell adhesion molecule) als Hauptvertreter zu nennen (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Ein weiteres neurales Zelladhäsionsmolekül stellt das L1CAM (L1 cell adhesion molecule) dar, welches zum einen homophile und zum anderen mit weiteren neuronalen IgSF-Proteinen oder mit Integrinen heterophile Verbindungen eingehen kann (Brummendorf et al., 1998). Über seinen zytoplasmatischen Teil unterhält es Kontakte zu Proteinen des Zytoskeletts (Loers and

Einleitung

Schachner, 2007, Herron et al., 2009). Das L1CAM ist typischerweise ein Membranprotein, kann aber auch durch proteolytische Abspaltung als lösliches Molekül vorliegen (Beer et al., 1999). Obwohl es den neuronalen Zelladhäsionsmolekülen zugeschrieben wird, konnte eine Expression unter anderem auch im Oberflächenepithel des Ovars (Zecchini et al., 2008), in den Sammelrohren der Niere (Debiec et al., 1998) und in mehreren Zelltypen des Immunsystems gezeigt werden (Pancook et al., 1997, Maddaluno et al., 2009). Des Weiteren konnte die Expression des L1CAM in mehreren Tumorentitäten unter anderem beim malignen Melanom, Magenkarzinom, Ovarialkarzinom, Endometriumkarzinom, Mammakarzinom, Pankreaskarzinom, Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, Nierenzellkarzinom und beim kolorektalen Karzinom bestätigt werden. Dabei war die Expression des L1CAM fast ausschließlich mit einer Tumorprogression und Metastasenbildung und somit mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Thies et al., 2002, Fogel et al., 2003, Schroder et al., 2009, Ben et al., 2010, Tischler et al., 2011, Doberstein et al., 2011, Fang et al., 2010, Chen et al., 2013).

1.4.5 Zelladhäsionsmolekül CD44

Das an der Zelloberfläche lokalisierte Glykoprotein CD44 ist an den Prozessen des Zellwachstums, der Zelladhäsion, der Leukozytenaktivierung, der Zelldifferenzierung und der Zellmigration beteiligt (Dimitroff et al., 2001, Lesley et al., 1993, DeGrendele et al., 1997, Gunthert et al., 1998, Ponta et al., 2003). Für diese Funktionen sind verschiedene Isoformen des CD44 verantwortlich. Durch alternatives Spleißen der prä-mRNA, die aus 20 Exons besteht und von denen die mittleren 10 Exone variabel sind, entstehen so verschiedene Spleißvarianten, die mit CD44v kenntlich gemacht werden. Das kleinste und ubiquitär im gesunden Organismus vertretene Molekül unter ihnen ist das CD44s (die Standardisoform des CD44), das nur Exon 1-5 und Exon 16-20 exprimiert (Screaton et al., 1992). Die aminoternale extrazelluläre Domäne beinhaltet zwei Aminosäuresequenzen, die für die Bindung an Hyaluronan, dem Hauptbindungspartner, verantwortlich sind (Sherman et al., 1994). Dabei scheint die Bindungsaffinität von verschiedenen Spleißvarianten und zellspezifischen posttranslationalen Modifikationen abhängig zu sein (Skelton et al., 1998, Borland et al., 1998).

Die Expression mehrerer Spleißvarianten des CD44 konnte auf unterschiedlichen Tumorentitäten bestätigt werden, wobei die Expression zwischen den verschiedenen Tumorentitäten stark schwankte (Fox et al., 1994, Kuppner et al., 1992, Kargi et al., 1997). Weiterhin konnte die Expression des CD44 mit einer schlechteren Prognose assoziiert

werden, so z.B. beim kolorektalen Karzinom (Wielenga et al., 1993), beim Chondrosarkom (Heyse et al., 2010), beim Pankreaskarzinom (Seiter et al., 1993) und beim Non-Hodgkin-Lymphom (Stauder et al., 1995). Im Gegensatz dazu korrelierte die Abwesenheit des CD44 bei manchen Tumorentitäten wie beim Neuroblastom und Prostatakarzinom mit einer schlechteren Prognose (Shtivelman and Bishop, 1991, De Marzo et al., 1998). Es konnte sogar gezeigt werden, dass eine Überexpression des CD44 auf Prostatakarzinomzellen deren metastatisches Potenzial unterdrückte (Gao et al., 1997).

1.5 Hyaluronan

Hyaluronan ist eine wichtige Komponente der Extrazellulärmatrix und kommt ubiquitär in vielen Gewebearten vor. Das unverzweigte, nicht-sulfatierte Glykosaminoglykan ist aus alternierenden Disaccharideinheiten β -D-Glucuronsäure und N-Acetyl-Glucosamin-Monomeren zusammengesetzt (Toole, 1990). Hyaluronan wird anders als andere Glykosaminoglykane, deren Synthese im rauen endoplasmatischen Retikulum stattfindet, an der Innenseite der Plasmamembran von drei membranständigen Hyaluronsynthetasen (HAS1-3) synthetisiert (Itano and Kimata, 2002). Von dort wird es noch während der Synthese aus der Zelle ausgeschleust und entweder an die Zelloberfläche oder in den Extrazellulärraum hin befördert (Weigel et al., 1997). Die Metabolisierung des Hyaluronan erfolgt enzymatisch durch Hyaluronidasen oder nicht-enzymatisch durch freie Radikale (Stern et al., 2007).

Das Glykosaminoglykan besitzt mehrere Bindungspartner, die als Hyaladherine zusammengefasst werden (Day and Prestwich, 2002). Über bestimmte Rezeptoren wie das Glykoprotein CD44, RHAMM (receptor for hyaluronan mediated motility), LYVE 1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1), HARE (hyaluronan receptor for endocytosis) und die TLR 2 und 4 (toll like receptors 2 and 4) werden intrazelluläre Signalwege aktiviert (Vigetti et al., 2014).

Hyaluronan hat im menschlichen Organismus viele verschiedene Funktionen. Es geht mit Proteoglykanen und anderen Komponenten der Extrazellulärmatrix Bindungen ein und trägt so zur Struktur und Zusammenhalt der extrazellulären und perizellulären Matrix bei, die auch Glykokalyx genannt wird (Toole, 2001). Durch seine Struktur ist es in der Lage große Mengen an Wasser zu binden und so die Zellmigration und Proliferation zu erleichtern (Moustakas and Heldin, 2014). Darüber hinaus spielt es eine große Rolle bei der Embryonalentwicklung und Wundheilung und ist auch an pathologischen Prozessen der

Tumorprogression, Metastasenbildung und Angiogenese beteiligt (Erickson and Stern, 2012).

Hyaluronan konnte im Tumorstroma oder in den Tumorzellen selbst verschiedener Tumorentitäten gefunden werden. Dabei konnte eine vermehrte Hyaluronan-Färbung im Tumorstroma des Mammakarzinoms, des nicht-kleinzelligen Lungenadenokarzinoms und des Schilddrüsenkarzinoms mit dem verkürzten Überleben assoziiert werden (Auvinen et al., 2000, Pirinen et al., 2001, Bohm et al., 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Hyaluronan zusätzlich im Parenchym des Mammakarzinoms, des Magenkarzinoms und des kolorektalen Karzinoms mit einem verkürzten Überleben in Verbindung stand (Auvinen et al., 2000, Ropponen et al., 1998, Setala et al., 1999).

1.6 Intermediärfilamente

Das Zytoskelett besteht im Wesentlichen aus Mikrotubuli, Aktin- und Intermediärfilamenten. Intermediärfilamente sind für das Stützgerüst der Zelle und die Integrität im Zellverband verantwortlich (Welsch et al., 2014). Insgesamt werden fünf Haupttypen unterschieden. Zum Typ I und II gehören die sauren und die basischen Zytokeratine, unter Typ III werden Vimentin, Desmin, GFAP (glial fibrillary acidic protein) und Peripherin zusammengefasst, Typ IV sind die Neurofilamente und Typ V beinhaltet das im Zellkern befindliche Laminin A-C (Fuchs and Weber, 1994).

Vimentin ist ein weit verbreitetes Intermediärfilament und charakteristisch für Zellen und Gewebe mesenchymalen Ursprungs wie Fibroblasten, Endothelzellen, Leukozyten und Mesothelzellen (Welsch et al., 2014). Einige epitheliale Tumore wie das duktales Mammakarzinom und das Prostatakarzinom zeigten jedoch auch eine Expression des Vimentins (Domagala et al., 1990, Zhao et al., 2008). Eine Überexpression konnte sogar in einigen Tumoren mit einem höheren Metastasierungspotenzial bzw. einer schlechteren Prognose assoziiert werden (Wei et al., 2008, Al-Saad et al., 2008). Ein Grund hierfür könnte die Beteiligung des Vimentins an der epithelial-mesenchymalen Transition von Tumorzellen sein (Liu et al., 2015).

Zytokeratine machen unter den Intermediärfilamenten die größte Gruppe aus. Mittlerweile sind zu den ursprünglich 20 von Moll et al. klassifizierten epithelialen Zytokeratinen, ausgenommen die Haarfollikel spezifischen Keratine, sieben weitere hinzugekommen. Davon gehören die Zytokeratine K9 bis K20 den sauren Typ I und die Zytokeratine K1 bis K8 den neutral-basischen Typ II Zytokeratinen an (Moll et al., 1982, Moll et al., 1990, Schweizer et al., 2006). Jede Epithelart ist durch ein spezifisches

Einleitung

Zytokeratinexpressionsmuster charakterisiert, wobei jede Epithelzelle mindestens ein Zytokeratinpaar aus Typ I und II enthält. Je nach Differenzierungsstadium einer Epithelzelle kann sich auch das Expressionsmuster ändern (Chu and Weiss, 2002).

Die Zytokeratine K8 und K18 werden hauptsächlich zusammen exprimiert und stellen die Hauptzytokeratine einschichtiger Epithelien dar (Franke et al., 1981, Moll et al., 1982, Owens and Lane, 2003). Spezifisch für die Basalzellen der Epidermis und anderen mehrschichtigen Plattenepithelien ist das Zytokeratin K15 (Moll et al., 1993, Lloyd et al., 1995, Waseem et al., 1999). Gewebe mesenchymalen Ursprungs exprimieren typischerweise keine Zytokeratine, jedoch konnte als Ausnahme in Endothelzellen das Zytokeratin K1 gefunden werden (Remotti et al., 2001, Mahdi et al., 2001).

Das Expressionsmuster bleibt zumeist bei maligner Transformation der Epithelzellen bestehen, so dass Zytokeratine zur Diagnostik verschiedener Tumorentitäten eingesetzt werden. Dies ist hauptsächlich bei undifferenzierten Tumoren und bei Metastasen mit unbekanntem Primärtumor notwendig. Die Zytokeratine K7, K20, K14 und K5/6 haben bei der Unterscheidung verschiedener Tumore den höchsten Aussagewert (Oshima, 2007, Chu and Weiss, 2002).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Tabelle 2.1.: Verwendete Reagenzien mit Herstellerangaben

Reagenz	Hersteller	Katalog-Nummer
Salzsäure 2,0 mol/l (2,0 N)	Chemsolute	860.1000
Trizma base	Sigma Life Science	T1503
Natriumchlorid 150 mMol	J.T. Baker	4924-05
Tween 20	Sigma	P1379-1L
Natriumnitrit	Sigma	S-2232
Neufuchsin	Sigma	N2250-5G
Naphthol-AS	Merck	201-969-4
Dimethylformamid	Sigma	D4551-250ML
Levamisol	Sigma	L-9756
EDTA	Sigma	ED2SS
Eukitt	O. Kindler	
Aquatex	Merck	108562
Mayers Hämalaunlösung	Merck	HX69708049
Antibody Diluent with Background Reducing Components	Dako	S3022
Antibody Diluent	Medac diagnostika	B1-31C
Modifizierter Citratpuffer Target Retrieval Solution (10x) pH 6,0	Dako	S1699
1 % Bovine Serum Albumin	GE Healthcare, PAA Laboratories	K35-001
Rabbit Serum (Normal) 1:10 TBS	Dako	X0902
Proteinase K	Dako	S3004
Proteinase, bacterial Type XXIV	Sigma-Aldrich	P8038-1G
Harnstofflösung (Urea solution)	Sigma-Aldrich	U4883
Fast Enzyme	Zytomed	ZUC059-015
Vectastain ABC KIT Alkaline Phosphatase-Standard	Vector Laboratories	AK-5000
Permanent Red Substrate Chromogen	Dako	K0640
Dako Real TM Detection System, Alkaline Phosphatase/Red, Rabbit/Mouse	Dako	K5005

Material und Methoden

2.1.2 Antikörper

Tabelle 2.2.: Verwendete Antikörper und Isotypenkontrollen mit Herstellerangaben

Zellmarker	Reagenz	Produkt-information	Konzentration/ Antikörperver- dünnungs- medium	Sekundär-Antikörper	ISOS
Pan-ZK	Maus monoklonal, IgG1 und IgG2a	Sigma (C2562)	1:50, Dako (S3022)	Biotinylierte Kaninchen-anti-Maus Ig, Dako (E0464)	Maus IgG, Sigma (I5381-1MG)
K8	Maus monoklonal, IgG1	Santa Cruz (sc-8020)	1:35, Dako (S3022)	Biotinylierte Kaninchen-anti-Maus Ig Dako (E0464)	Maus IgG1, Dako (X0931)
K15	Kaninchen polyklonal, IgG	Sigma-Aldrich (HPA023910)	1:1700, Dako (S3022)	Biotinylierte Ziege-anti-Kaninchen Ig Dako (E0432)	Kaninchen IgG, Dako (X0903)
Vimentin	Maus monoklonal, IgG2a	Dako (M7020)	1:150, Dako (S3022)	Biotinylierte Kaninchen-anti-Maus Ig Dako (E0464)	Maus IgG2a, Dako, (X0943)
CD44	Maus monoklonal, IgG2b	BD Biosciences (550392)	1:6400, Dako (S3022)	Biotinylierte Kaninchen-anti-Maus Ig Dako (E0464)	Maus IgG2b, Dako (X0944)
L1CAM	Maus monoklonal	Klon L1-11A	1:1000, Dako (S3022)	Biotinylierte Ziege-anti-Maus Ig, Dako (E0433)	Maus IgG1, Dako (X0931)
HABP	Hyaluronan-bindendes Protein, Nasenknorpel-Rind, biotinyliert	Calbiochem (385911)	1:75, Dako (S3022)	-	Antikörperverdünungsmedium, Dako (S3022)
ITGB1	Maus monoklonal, IgG1	Abcam, (ab3167)	1:100, Medac Diagnostika (B1-31C)	Biotinylierte Ziege-anti-Maus Ig, Dako (E0433)	Maus IgG1, Dako (X0931)
ITGB3	Maus monoklonal, IgG1	Dako (M0753)	1:100, Medac Diagnostika (B1-31C)	Biotinylierte Ziege-anti-Maus Ig, Dako (E0433)	Maus IgG1, Dako (X0931)
ITGB4	Ratte monoklonal, IgG2b	Abcam (ab110167)	1:25, Medac Diagnostika (B1-31C)	Kaninchen-anti-Ratte Biotin, Jackson Immuno Research (312065-048)	Ratte IgG2b, Antigenix (CN230020)
CD62E	Kaninchen polyklonal, IgG	Abcam (ab189819)	1:400, Dako (S3022)	LINK Biotinylierte Sekundär-Antikörper, Dako Real K5005	Kaninchen IgG, Dako (X0903)
CD62P	Maus monoklonal, IgG1	Abcam (ab6632)	1:500, Medac Diagnostika (B1-31C)	Biotinylierte Ziege-anti-Maus Ig, Dako (E0433)	Maus IgG1, Dako (X0931)

2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 2.3.: Verwendete Pufferlösungen

TBS (Tris-buffered Saline) für 10 L	60,57 g 50 mMol Trizma base 87,09 g 150 mMol NaCl ca. 200 ml 2N HCl bei pH 7,6 einstellen
TBST-Puffer (Tris-buffered Saline mit Tween-20)	2 ml Tween-20 (0,1 %) 2 L TBS
Entwicklungsgemisch pro Küvette	400 mg Natriumnitrit 10 ml Aqua dest. 400 µl Neufuchsin 5 % in 2N HCl 200 ml Trispuffer pH 8,24 40 mg Naphthol-AS 1000 µl Dimethylformamid 260 µl Tween 80 mg Levamisol
Proteinase K Puffer	3 g Trizma base 15 ml 2,0 mol/l HCl

2.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.4.: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben

Geräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller
Kühlschränke und Tiefkühler	Comfort, Liebherr, Bosch
Zentrifugen	Biozym
Wärmeplatte	Medax
Wasserbad	Medax
Mikrowelle	Sharp
Dampfkochtopf	Noratel IMED power supply
Wärmeschrank	Melag
Pipetten	Eppendorf
Mikroskop	Zeiss AxioPlan 2
Schüttler	NeoLab
Färbeautomat	Thermo Electron Corporation
Digitalkamera	Axiocam MRc5 Zeiss
Pipettenspitzen	Eppendorf
Objekträger	Histobond, Marienfeld
Deckgläser	Menzel-Gläser, Roth

2.1.5 Software

Tabelle 2.5.: Verwendete Software mit Herstellerangaben

Software	Hersteller
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software
AxioVision Release Imaging Software 4.6.3. SP1	Zeiss
Excel 2008 Version 12.0	Microsoft

2.1.6 Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Andreas Gocht (Praxis für Pathologie, Lübeck) zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden 29 Gewebeproben untersucht, die Endothelzellen und Mesothelzellen im gleichen Präparat enthalten. Es wurden verschiedene Organe bzw. Gewebe untersucht: Appendix (8); Omentum majus (6); Bauchwandperitoneum (6); Tube (2); Ovar (2); Periorchium (2); Intestinum tenue (1); Zökum (1) und perikolisches Fettgewebe (1). Die der Resektion zugrunde liegenden Diagnosen sind der Tabelle 2.6. zu entnehmen. Die Mehrheit der Patienten war weiblich (18 weiblich; 11 männlich). Das Alter der Patienten lag zwischen 9 und 87 Jahren. Es gab von den Gewebeproben Nummer 7, 8, 9, 14, 15, 18, 19, 21 und 22 zwei in Paraffin eingebettete Gewebelöcke und von der Nummer 29 sogar vier dergleichen. Diese wurden einzeln untersucht und am Ende der Mittelwert ermittelt.

Material und Methoden

Tabelle 2.6.: Verwendetes Untersuchungsmaterial mit klinischen Parametern

Nr.	Alter (Jahren)	Geschlecht	Lokalisation	Diagnose	Gewebe
1	63	weiblich	Tube	Regelrechte Tube	normal
2	61	männlich	Bauchwandperitoneum	Bruchsack Hernie	normal
3	43	weiblich	Tube	Regelrechte Tube, Corpus luteum-Zyste des Ovars	normal
4	49	weiblich	Ovar	Corpus luteum-Zyste	normal
5	65	männlich	Periorchium	Hydrozele	normal
6	9	weiblich	Appendix	Geringe chronische Appendizitis	chronisch-entzündlich
7	16	weiblich	Appendix	Geringe chronische Appendizitis	chronisch-entzündlich
8	70	weiblich	Appendix	Geringe chronische Appendizitis	chronisch-entzündlich
9	30	männlich	Appendix	Geringe chronische Appendizitis	chronisch-entzündlich
10	31	weiblich	Appendix	Geringe chronische Appendizitis	chronisch-entzündlich
11	62	weiblich	Appendix	Geringe chronische Appendizitis	chronisch-entzündlich
12	22	weiblich	Appendix	Geringe chronische Appendizitis	chronisch-entzündlich
13	56	männlich	Bauchwandperitoneum	Bruchsack mit chronisch-granulierender Peritonitis	chronisch-entzündlich
14	61	männlich	Bauchwandperitoneum	Bruchsack mit chronisch-vernarbender Peritonitis	chronisch-entzündlich
15	51	weiblich	Bauchwandperitoneum	Bruchsack mit chronisch-vernarbender Peritonitis	chronisch-entzündlich
16	52	männlich	Bauchwandperitoneum	Bruchsack mit chronisch-granulierender Peritonitis	chronisch-entzündlich
17	34	männlich	Bauchwandperitoneum	Chronisch-vernarbende Peritonitis bei epigastrischer Hernie	chronisch-entzündlich
18	71	männlich	Periorchium	Chronisch-vernarbende Periorchitis	chronisch-entzündlich
19	77	weiblich	Intestinum tenue	Fibrinöse Peritonitis bei enterokutaner Fistel	akut-entzündlich
20	77	männlich	Omentum majus	Bridenileus	akut-entzündlich
21	18	weiblich	Appendix	Ulzero-phlegmonöse Appendizitis und lokale fibrinöse Serositis	akut-entzündlich
22	41	weiblich	Omentum majus	Netzmetastasen eines Dottersacktumors des Ovars	neoplastisch-maligne
23	60	weiblich	Omentum majus	Netzmetastasen eines endometrioiden Ovarialkarzinoms (G2)	neoplastisch-maligne
24	60	weiblich	Omentum majus	Mesothelzellhyperplasie bei diffusem Adenokarzinom des Magens (G3) mit Infiltration der Subserosa	neoplastisch-maligne
25	71	männlich	Caecum	Peritonitis mit Mesothelzellhyperplasien bei Caecumkarzinom (G1) mit Infiltration des perikolischen Fettgewebes und der Subserosa	neoplastisch-maligne
26	83	weiblich	Omentum majus	Netzmetastasen eines serösen Zystadenokarzinoms des Ovars (G2)	neoplastisch-maligne
27	87	männlich	Perikolisches Fettgewebe	Adenokarzinom des Kolons	neoplastisch-maligne
28	69	weiblich	Omentum majus	Klarzelliges Adenokarzinom der Zervix	neoplastisch-maligne
29	56	weiblich	Ovar	Seröses Zystadenom	neoplastisch-benigne

2.2 Methoden

2.2.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde auf -20 °C gekühlt. Anhand des Schlittenmikrotoms wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die mittels eines Pinsels aufgenommen, dann in ein Becken mit kaltem destilliertem Wasser und anschließend in ein 40 °C erwärmtes Wasserbad zur Faltenentfernung überführt wurden. Die Schnitte wurden auf silanbeschichtete Objektträger gezogen und auf eine 37 °C beheizte Wärmeplatte zum Trocknen für mindestens 30 min gelegt. Zu guter Letzt wurden die Schnitte zur Trocknung und besseren Haftung an die Objektträger über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank gelagert. Für alle Versuche wurden frisch hergestellte Paraffinschnitte verwendet. Diese wurden bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.2 Deparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte

Bevor die immunhistochemischen Färbungen sowie die Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt werden konnten, mussten die Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydriert werden. Dazu wurden die Gewebeschnitte zunächst für zweimal 5 min in Xylol, danach in einer absteigenden Alkoholreihe (zweimal für 5 min in 100%igem Ethanol, 5 min in 96%igem Ethanol, 5 min in 70%igem Ethanol, 5 min in 50%igem Ethanol) und abschließend in Aqua dest. überführt.

2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur histologischen Beurteilung der Gewebe wurden die Schnitte einer Hämatoxylin-Färbung unterzogen. Dafür wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe wie oben beschrieben erst einmal entparaffiniert und danach mit Hämalaun und Eosin gefärbt (3 min in Hämalaun, 2 min in Aqua dest., 5 min in Leitungswasser, 3 min in Eosin, 30 min in Aqua dest.). Nach der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (15 min in 70%igem Ethanol, zweimal 30 min in 96%igem Ethanol, zweimal für 5 min in 100%igem Ethanol, dreimal 5 min in Xylol) wurden die gefärbten Gewebeschnitte mit Eukitt eingedeckelt.

2.2.4 Immunhistochemie

Während die Primär-Antikörper und die Isotypenkontrolle mit entsprechenden Antikörperverdünnungsmedien verdünnt wurden, wurde für die Verdünnung aller anderen

Antikörper und Seren, wenn nicht anders erläutert, TBS verwendet. Alle Versuche fanden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur statt. Die Inkubationen fanden damit die Schnitte nicht austrockneten in einer feuchten Kammer statt.

2.2.4.1 Färbung E-Selektin

Nach dem Waschen in Aqua dest. erfolgte eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung der Schnitte im Wasserbad bei 99 °C. Hierbei wurden die Proben 20 min in einem modifizierten Citratpuffer bei pH 6 erhitzt. Nach 30-minütigem Abkühlen dieser Schnitte wurden diese in TBST und TBS gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation der Gewebeschnitte für 30 min mit dem anti-CD62E Antikörper. Die Präparate wurden dann ein zweites Mal gespült und mit dem auf das indirekte Streptavidin-Biotin-Verfahren beruhende Detection System Kit weiter behandelt. Hierzu wurden die Gewebeschnitte in einem ersten Schritt für 15 min mit der Lösung A des Kits inkubiert. Diese Lösung beinhaltet biotinylierte Ziege-anti-Maus- und Ziege-anti-Kaninchen-Ig, die an den Primär-Antikörper binden. Nach dem Waschvorgang wurden die Präparate in einem zweiten Schritt mit der Lösung B, die an alkalischer Phosphatase konjugiertes Streptavidin enthält, für 15 min inkubiert. Das Streptavidin bindet an das Biotin des Sekundär-Antikörpers der Lösung A. Im Anschluss wurde gespült und ein Farbsignal erzeugt, indem die Schnitte für 20 min mit der Substratarbeitslösung, die kurz vor Gebrauch nach den Gebrauchsanweisungen des Herstellers zusammengesetzt wurde, inkubiert wurden. Im Anschluss daran wurden die Schnitte um die Farbreaktion zu stoppen für 5 min unter fließendes Leitungswasser gehalten und danach für 2 min in Aqua dest. überführt. Als letzter Schritt folgte die Färbung mit Hämalaun. Die Negativkontrolle wurde mit dem IgG-Isotypenkontrollantikörper inkubiert.

2.2.4.2 Färbung P-Selektin

Entparaffinierte und rehydrierte Schnitte wurden in einem modifizierten Citratpuffer im Dampfkochtopf bei 121 °C über 10 min vorbehandelt und im Anschluss für 30 min auf dem Schüttler abgekühlt und danach gewaschen. Als nächstes wurde der anti-CD62P Antikörper aufgetragen. Die nächsten Schritte sind mit der ITGB1-Färbung identisch. Die Negativkontrolle wurde mit dem IgG1-Isotypenkontrollantikörper inkubiert.

2.2.4.3 Färbung Integrin β 1

Im ersten Schritt wurden die Schnitte enzymatisch mittels Fast-Enzyme zur proteolytischen Epitopdemaskierung vorbehandelt. Dabei wurden die Schnitte für 5 min inkubiert und anschließend dreimal kurz in Aqua dest. gespült. Nach zweimal 5 min spülen mit TBST und 5 min mit TBS wurde der anti-ITGB1 Antikörper aufgetragen. Nach dem Waschvorgang auf dem Schüttler wurden die Präparate mit dem sekundären biotinylierten Ziege-anti-Maus Antikörper für 30 min inkubiert. Nach weiteren Spülen folgte die Inkubation mit dem ABC-Alkalische Phosphatase Kit für 30 min. Wie vom Hersteller empfohlen, wurde das Avidinreagenz sowie das biotinylierte Enzym eine halbe Stunde vor der Verwendung angesetzt. Nachdem ein letztes Mal gespült worden ist, folgte die Entwicklung mit Permanent Red für 20 min. Die Farbreaktion wurde zum Stoppen gebracht, in dem die Schnitte für 3 min unter fließendes Leitungswasser gehalten und danach für 2 min in Aqua dest. überführt worden sind. Zu guter Letzt folgte die Hämalaun-Zellkernfärbung. Die Negativkontrolle wurde mit dem IgG1-Isotypenkontrollantikörper inkubiert.

2.2.4.4 Färbung Integrin β 3

Im ersten Schritt wurde eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung im Wasserbad für 20 min bei 99°C im modifizierten Citratpuffer durchgeführt und danach für jeweils 5 min in Aqua dest. und TBS gespült, um direkt im Anschluss die Gewebeschnitte für 7 min mit Proteinase K zu behandeln. Dabei wurden wie vom Hersteller empfohlen 20 μ l Proteinase K in 1 ml 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer gemischt. Nach dem Waschvorgang wurden die Gewebeschnitte mit dem Primär-Antikörper anti-CD61 inkubiert. Die nächsten Schritte sind mit denen von der ITGB1-Färbung identisch. Die Negativkontrolle wurde mit dem IgG1-Isotypenkontrollantikörper inkubiert.

2.2.4.5 Färbung Integrin β 4

Die Schnitte wurden zunächst einer Hitzebehandlung im modifizierten Citratpuffer bei 121°C über 10 min im Schnellkochtopf unterzogen, um die Antigene freizulegen. Es wurde darauf geachtet, dass die Schnitte von genügend Puffer umgeben waren und im Anschluss langsam abkühlen konnten. Nachdem die Schnitte 15 min im Puffer abgekühlt waren, wurde zweimal über 5 min mit TBST und einmal 5 min mit TBS gespült. Unspezifische Bindungen wurden durch 30-minütige Inkubation mit Kaninchennormalserum in einer Verdünnung

1:10 blockiert. Nachdem durch Schrägstellung der Objektträger das Serum abgelaufen war, konnte der anti-ITGB4 Antikörper für eine Stunde aufgetragen werden. Die nächsten Schritte sind mit der Färbung von ITGB1 identisch, abgesehen davon, dass der sekundäre Antikörper Kaninchen-anti-Ratte verwendet wurde. Die Negativkontrolle wurde mit dem IgG2b-Isotypenkontrollantikörper inkubiert.

2.2.4.6 Färbung L1CAM

Der monoklonale Antikörper gegen L1 (Klon L1-11A) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. D. P. Altevogt, Deutsches Krebszentrum Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Zur Vorbehandlung wurden die Schnitte in einem EDTA-Puffer (0,37g EDTA/L, pH 8,0) in der Mikrowelle wärmebehandelt. Dabei wurden diese erst bei 1000 Watt zum Kochen gebracht und im Anschluss dreimal für 5 min bei 500 Watt weiterbehandelt. Nach 20-minütigen Abkühlen wurde die Hälfte des Puffers durch kalten ersetzt und noch weitere 10 min abgewartet. Es folgte der Waschgang für zweimal 5 min in TBS und daraufhin die Inkubation mit einem Ziegennormalserum im Verhältnis 1:10 für 30 min zur Blockierung unspezifischer Bindungen. Im Anschluss wurde der anti-L1CAM Antikörper über Nacht bei 4°C aufgetragen. Die nächsten Schritte sind mit dem Protokoll der ITGB1-Färbung identisch, wobei die Waschgänge ausschließlich für dreimal 5 min mit TBS durchgeführt wurden. Die Negativkontrolle wurde mit dem IgG1-Isotypenkontrollantikörper inkubiert.

2.2.4.7 Färbung CD44

Die Gewebeschnitte wurden zur hitzeinduzierten Antigendemaskierung im Wasserbad bei 60 °C über Nacht im modifizierten Citratpuffer vorbehandelt. Diese wurden am nächsten Tag 40 min zum Abkühlen auf den Schüttler gestellt, wobei nach 20 min die Hälfte des Puffers durch Aqua dest. ersetzt wurde. Die nächsten Schritte wurden nach dem K8-Färbeprotokoll fertiggestellt, wobei die Waschvorgänge nach dem Schema, zweimal für 5 min in TBST und einmal für 5 min in TBS, durchgeführt worden sind. Außerdem wurde die Farbentwicklung zum Stoppen gebraucht, indem die Objektträger für 10 min anstatt für 5 min unter fließendes Leitungswasser gehalten wurden. Die Negativkontrolle wurde mit dem IgG2b-Isotypenkontrollantikörper inkubiert.

2.2.4.8 Färbung Hyaluronan

Zuerst erfolgte die Hitzeinduktion der Gewebeschnitte im Wasserbad bei 60 °C über Nacht, wobei die Küvetten mit dem modifizierten Citratpuffer befüllt waren. Am nächsten Tag ließ man die Schnitte über 40 min auf dem Schüttler abkühlen, wobei nach 20 min die Hälfte des Puffers durch kaltes Aqua dest. ersetzt wurde. Anschließend wurden die immunhistochemischen Schritte nach dem Protokoll für die K8-Färbung durchgeführt, wobei das Kaninchenserum durch Rinderalbumin ersetzt und als Ersatz für ein Primär-Antikörper, das hyaluronan-bindende-Protein, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Außerdem musste bei dieser Färbung auch kein Sekundär-Antikörper verwendet werden, da das hyaluronan-bindende Protein biotinyliert war, sodass dieser Schritt wegfiel. Die Negativkontrolle wurde mit dem Antikörperverdünnungsmedium von Dako inkubiert.

2.2.4.9 Färbung Panzytokeratin

Die Vorbehandlung der Gewebeschnitte erfolgte in 0,06 g gelöste Proteinase in 150 ml TBS über 7 min bei 37 °C im Wasserbad. Im Anschluss kam es durch die Hinzugabe von Leitungswasser über 5 min zur Beendigung der Reaktion. Alle nachfolgenden Schritte waren mit dem K8-Färbeprotokoll identisch. Die Negativkontrolle wurde mit dem IgG-Isotypenkontrollantikörper inkubiert.

2.2.4.10 Färbung Zytokeratin K8

Die Gewebeschnitte durchliefen eine Hitzedemaskierung im Wasserbad bei 37 °C für 10 min, wobei die Küvetten mit einer Proteinase-TBS-Lösung, 0,08 g Proteinase in 200 ml TBS, befüllt waren. Die Reaktion kam durch das Hinzugeben von Leitungswasser über 10 min zum Erliegen. Nach anschließenden 5-minütigen Spülen der Schnitte in Aqua dest. wurden diese für zweimal 5 min auf dem Schüttler mit TBS gespült. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurden die Schnitte mit Kaninchenserum in einem Verdünnungsverhältnis von 1:10 für 30 min inkubiert. Nachdem durch Schrägstellung der Objektträger das Serum abgelaufen war, konnte der anti-K8 Antikörper über Nacht bei 4 °C aufgetragen werden. Nach dem Waschvorgang wurde der Sekundär-Antikörper Kaninchen-anti-Maus für 30 min aufgetragen. Es folgte der Waschgang und die Inkubation des ABC-Alkalische Phosphatase Kits über 30 min. Nach dem Spülen wurde die Aktivität des

Enzymkomplexes von Avidin mit der alkalischen Phosphatase durch die Verwendung von Neufuchsin als Chromogen und Naphthol-AS als Kopplungskomponente des Farbstoffs visualisiert. Dabei wurden 400 µl Natriumnitrit in 10 ml Aqua dest. gelöst und mit 400 µl Neufuchsin und 400 ml TBS gemischt. Im Anschluss wurden 40 mg Naphthol-AS in 1000 µl Dimethylformamid gelöst und der Lösung hinzugegeben. Zusätzlich wurde zur Blockierung endogener alkalischer Phosphataseaktivität 80 mg Levamisol und als letztes 260 µl Tween hinzugefügt und vorsichtig geschwenkt. Die Entwicklung fand über 30 min im Dunklen statt. Die Reaktion wurde unter fließendes Leitungswasser für 5 min gestoppt. Die Schnitte wurden im Anschluss über 2 min in Aqua dest. gegeben und dann mit Hämalaun gegengefärbt. Die Negativkontrolle wurde mit dem IgG1-Isotypenkontrollantikörper inkubiert.

2.2.4.11 Färbung Zytokeratin K15

Entparaffinierte und rehydrierte Schnitte wurden in einem modifizierten Citratpuffer im Dampfkochtopf bei 121 °C über 4 min gekocht und danach für weitere 40 min dort belassen bis sie auf 90 °C runtergekühlt waren. Alle weiteren Schritte wurden nach dem Protokoll des Zytokeratins K8 durchgeführt, wobei der Primär-Antikörper bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert wurde und der Sekundär-Antikörper Ziege-anti-Kaninchen verwendet wurde. Die Negativkontrolle wurde mit dem IgG-Isotypenkontrollantikörper inkubiert.

2.2.4.12 Färbung Vimentin

Zur Antigendemaskierung wurden die Gewebeschnitte in einer Harnstofflösung im Wasserbad bei 60 °C über Nacht vorbehandelt. Am nächsten Tag wurden diese für 10 min unter fließendes Leitungswasser gehalten. Alle anderen Schritte waren mit dem K8-Färbeprotokoll identisch. Die Negativkontrolle wurde mit dem IgG2a-Isotypenkontrollantikörper inkubiert.

2.2.5 Zellkernfärbung mittels Mayers-Hämalaunlösung

Die Gewebeschnitte wurden in frisch filtriertem Mayers Hämalaunlösung (1:1 Aqua dest.) für 3 sec. inkubiert. Zur Bläuung des Hämalauns wurden die Schnitte für 5 min unter fließendes Leitungswasser gehalten und im Anschluss für 2 min in Aqua dest. überführt. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe (15 min in 70%igem Ethanol, zweimal

30 min in 96%igem Ethanol, zweimal 5 min in 100%igem Ethanol, dreimal 5 min in Xylol) dehydriert und mit Eukitt oder Aquatex eingedeckelt.

2.2.6 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde am Mikroskop vorgenommen. Die Mesothelzellen wurden im gesamten Schnitt untersucht. Für die Beurteilung der Endothelzellen wurden fünf Ausschnitte, auf denen Endothelzellen zu sehen waren, auf dem Schnitt zufällig ausgesucht und diese einzeln in einer 20-fachen Vergrößerung beurteilt und daraufhin der Mittelwert ermittelt. Aufgrund dieser Gegebenheiten sind die Zahlen im Ergebnisteil größtenteils sehr genau. Beurteilt wurde zum einen die Intensität der Färbung, die von schwach (+/1) über mittelgradig (++/2) bis zu stark (+++/3) reichte, und zum anderen der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen von 25%, 50 %, 75% und 100%. Eine Intensität von <0,5 und ein prozentualer Anteil von <10% wurden als negativ gewertet. Mit der Digitalkamera wurden repräsentative Areale aufgenommen und mit dem dazugehörigen Computerprogramm sichtbar gemacht.

3 Ergebnisse

Die Tabelle 4.1. erlaubt einen Überblick über die Expression der untersuchten Proteine im Endothel und Mesothel.

Tabelle 4.1.: Protein-Expression im Endothel und Mesothel. n = normal; c-e = chronisch-entzündlich; a-e = akut-entzündlich; neo = neoplastisch

Protein	Keine Expression	Positive Expression	Protein	Keine Expression	Positive Expression
CD62E			Pan-ZK		
Endothel (n=29)	0	29 (100%)	Endothel (n=29)	18 (62%)	11 (38%)
n (n=5)	0	5 (100%)	n (n=5)	2 (40%)	3 (60%)
c-e (n=13)	0	13 (100%)	c-e (n=13)	7 (54%)	6 (46%)
a-e (n=3)	0	3 (100%)	a-e (n=3)	3 (100%)	0
neo (n=8)	0	8 (100%)	neo (n=8)	6 (75%)	2 (25%)
Mesothel (n=29)	0	29 (100%)	Mesothel (n=29)	0	29 (100%)
n (n=5)	0	5 (100%)	n (n=5)	0	5 (100%)
c-e (n=13)	0	13 (100%)	c-e (n=13)	0	13 (100%)
a-e (n=3)	0	3 (100%)	a-e (n=3)	0	3 (100%)
neo (n=8)	0	8 (100%)	neo (n=8)	0	8 (100%)
CD62P			K8		
Endothel (n=28)	1 (4%)	27 (96%)	Endothel (n=29)	29 (100%)	0
n (n=5)	0	5 (100%)	Mesothel (n=29)	0	29 (100%)
c-e (n=13)	0	13 (100%)	n (n=5)	0	5 (100%)
a-e (n=2)	0	2 (100%)	c-e (n=13)	0	13 (100%)
neo (n=8)	1 (13%)	7 (88%)	a-e (n=3)	0	3 (100%)
Mesothel (n=28)	28 (100%)	0	neo (n=8)	0	8 (100%)
ITGB1			K15		
Endothel (n=29)	19 (66%)	10 (34%)	Endothel (n=29)	25 (86%)	4 (14%)
n (n=5)	2 (40%)	3 (60%)	n (n=5)	4 (80%)	1 (20%)
c-e (n=13)	10 (77%)	3 (23%)	c-e (n=13)	10 (77%)	3 (23%)
a-e (n=3)	2 (67%)	1 (33%)	a-e (n=3)	3 (100%)	0
neo (n=8)	5 (63%)	3 (38%)	neo (n=8)	8 (100%)	0
Mesothel (n=29)	21 (72%)	8 (28%)	Mesothel (n=26)	8 (31%)	18 (69%)
n (n=5)	2 (40%)	3 (60%)	n (n=5)	0	5 (100%)
c-e (n=13)	9 (69%)	4 (31%)	c-e (n=13)	4 (31%)	9 (69%)
a-e (n=3)	3 (100%)	0	a-e (n=1)	0	1 (100%)
neo (n=8)	7 (88%)	1 (13%)	neo (n=7)	4 (57%)	3 (43%)
ITGB3			Vimentin		
Endothel (n=28)	20 (71%)	8 (29%)	Endothel (n=28)	3 (11%)	25 (89%)
n (n=5)	1 (20%)	4 (80%)	n (n=5)	0	5 (100%)
c-e (n=13)	10 (77%)	3 (23%)	c-e (n=12)	2 (17%)	10 (83%)
a-e (n=3)	3 (100%)	0	a-e (n=3)	0	3 (100%)
neo (n=7)	6 (86%)	1 (14%)	neo (n=8)	1 (13%)	7 (88%)
Mesothel (n=24)	12 (50%)	12 (50%)	Mesothel (n=28)	8 (29%)	20 (71%)
n (n=5)	0	5 (100%)	n (n=5)	1 (20%)	4 (80%)
c-e (n=12)	7 (58%)	5 (42%)	c-e (n=12)	2 (17%)	10 (83%)
a-e (n=1)	1 (100%)	0	a-e (n=3)	2 (67%)	1 (33%)
neo (n=6)	4 (67%)	2 (33%)	neo (n=8)	3 (38%)	5 (63%)
ITGB4			CD44		
Endothel (n=29)	29 (100%)	0	Endothel (n=29)	29 (100%)	0
Mesothel (n=29)	29 (100%)	0	Mesothel (n=29)	29 (100%)	0
LICAM			HA		
Endothel (n=29)	29 (100%)	0	Endothel (n=29)	29 (100%)	0
Mesothel (n=29)	29 (100%)	0	Mesothel (n=28)	28 (100%)	0

3.1 E-Selektin

Es konnte bei allen Gewebeschnitten sowohl im Endothel als auch im Mesothel eine Expression des E-Selektins nachgewiesen werden. Der Großteil der Gewebeschnitte (24 von 29) zeigte im Endothel eine mittelgradige Intensität, lediglich bei fünf Gewebeschnitten wurde eine schwächere Intensität der immunhistochemischen Reaktion registriert. Der Anteil der Endothelzellen, die eine positive Immunreaktivität zeigten, variierte zwischen 13% und 78%, wobei die Mehrheit einen Anteil von 50% bis 70% aufwies, was sich auch am Mittelwert mit 57% widerspiegelt. Es konnten kaum Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den verschiedenen Gewebearten gezeigt werden. Im normalen und akut entzündlichen Gewebe zeigten die Endothelzellen lediglich einen minimal höheren Anteil angefärbter Zellen im Gegensatz zum chronisch-entzündlichen und neoplastischen Gewebe (normales Gewebe 59%; akut-entzündliches Gewebe 61%; chronisch-entzündliches Gewebe 56%; neoplastisch-malignes Gewebe 55%; [Abbildung 4.4.]).

Die Mehrheit der Gewebeschnitte (19) zeigte im Mesothel eine stärkere Intensität (+++) der Immunreaktivität als im Endothel (Abbildung 4.1. und 4.3.). Neun Gewebeschnitte wiesen eine mittelgradige Intensität auf und lediglich einer war im Mesothel schwächer angefärbt. Der prozentuale Anteil der Mesothelzellen, die eine Expression des E-Selektins zeigten, schwankte bei der Mehrheit der Gewebeschnitte zwischen 50% und 100% mit einem Mittelwert von 70%. Nur bei vier Gewebeschnitten lag der Anteil unter 50%. Dabei waren die Mesothelzellen im normalen Gewebe prozentual gesehen mit 88% am höchsten mit dem E-Selektin ausgestattet, während in den anderen Gewebearten der Anteil geringer ausfiel (chronisch-entzündliches Gewebe 66%; akut-entzündliches Gewebe 67%; neoplastisches Gewebe 66% [Abbildung 4.4.]). Zusammenfassend wird deutlich, dass Mesothelzellen im Gegensatz zu Endothelzellen in allen Gewebearten eine höhere Expression hinsichtlich des E-Selektins vorwiesen. Diese Unterschiede lagen im entzündlichen und neoplastischen Gewebe bei bis zu 11%. Im normalen Gewebe waren die Unterschiede mit fast 20% am deutlichsten (Abbildung 4.4.).

Ergebnisse

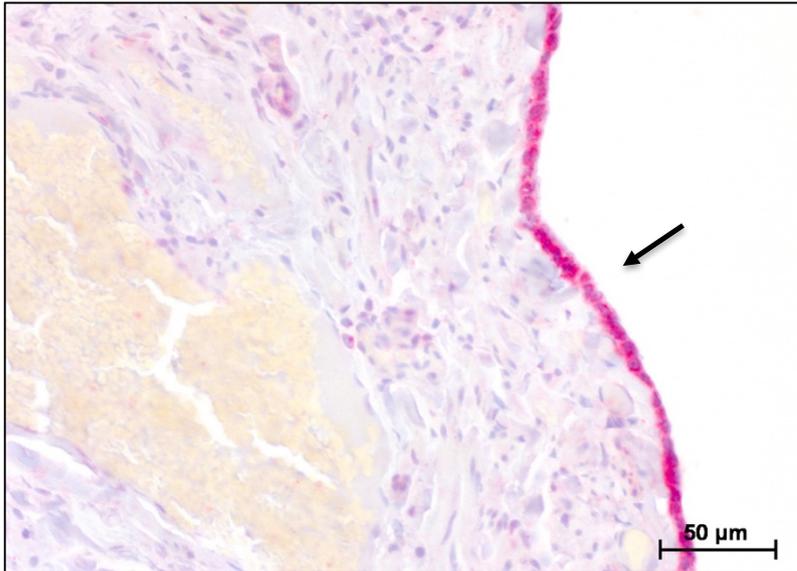


Abbildung 4.1.:

Immunohistochemische Färbung mit anti-CD62E. Die Mesothelzellen in der Tube sind stark angefärbt (Pfeil).

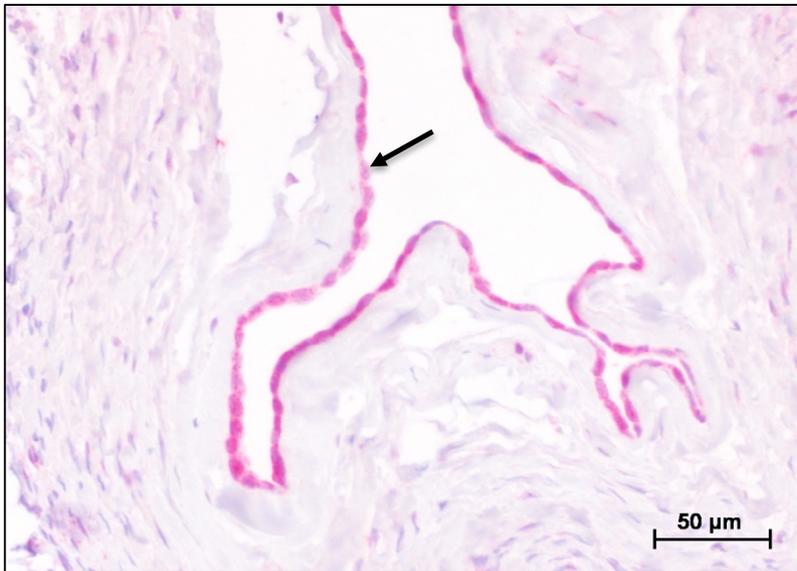


Abbildung 4.2.:

Immunohistochemische Färbung mit anti-CD62E. Die Mesothelzellen im Ovar haben teilweise eine kubische Form (Pfeil).

Ergebnisse

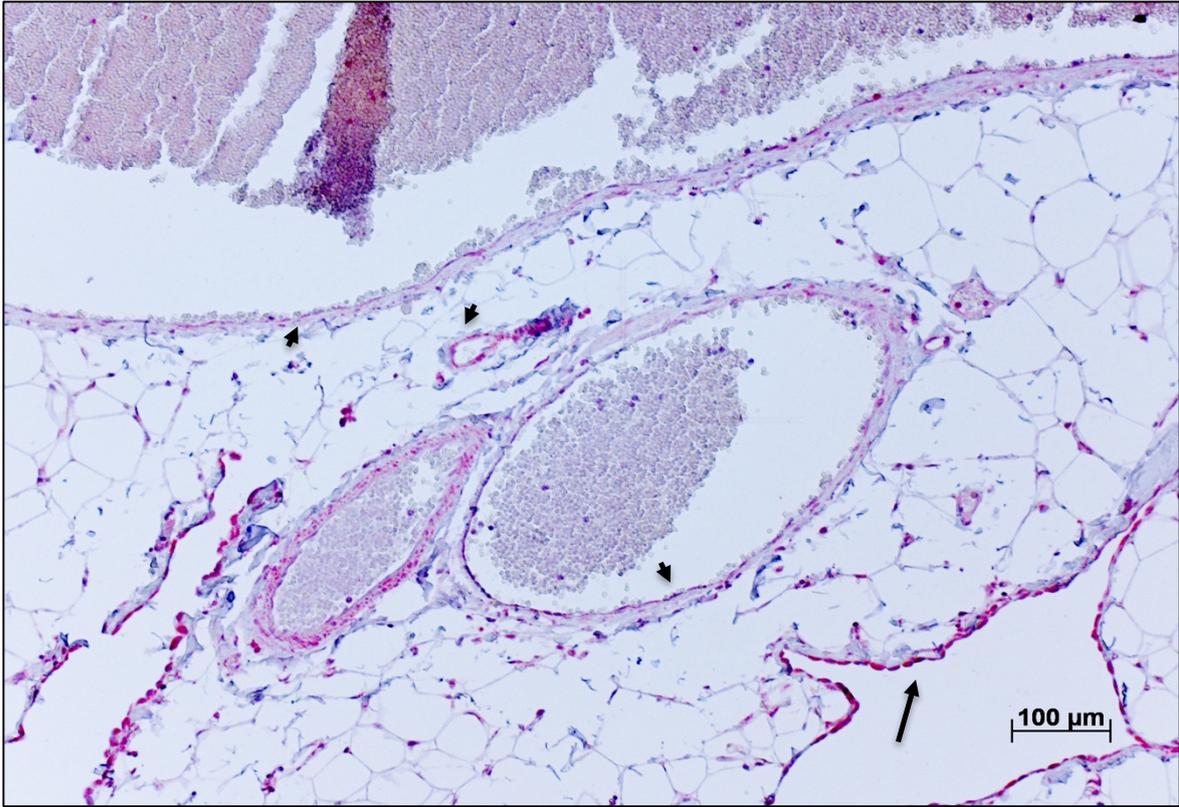


Abbildung 4.3.: Immunhistochemische Färbung mit anti-CD62E. Die Endothelzellen (Pfeilspitzen) im Omentum majus zeigen eine mittelgradige Immunreaktivität, während die Mesothelzellen (Pfeil) eine stärkere Intensität vorweisen.

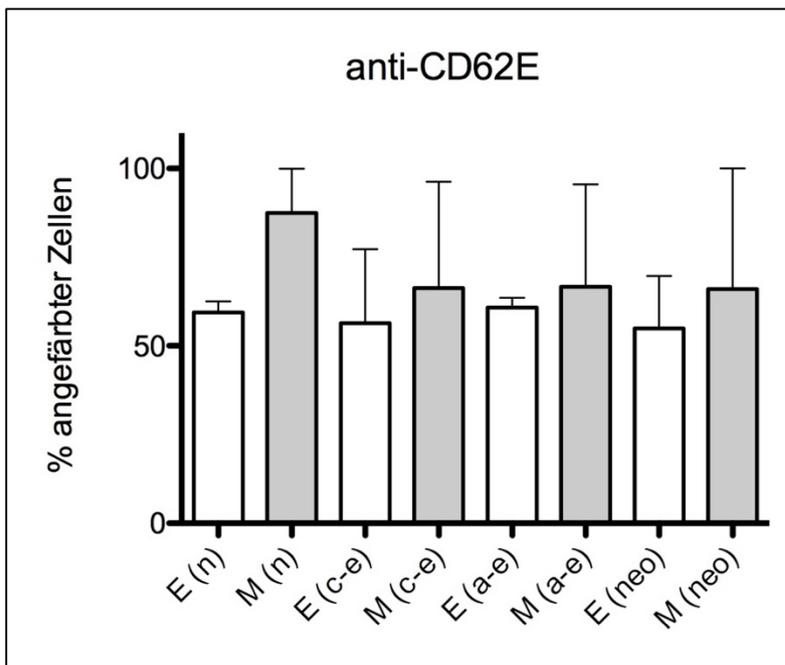


Abbildung 4.4: Vergleich der prozentual angefärbten Endothel- bzw. Mesothelzellen mit anti-CD62E in den verschiedenen Gewebetypen. E(n) = 59%; M(n) = 88%; E(c-e) = 56%; M(c-e) = 66%; E(a-e) = 61%; M(a-e) = 67%; E(neo) = 55%; M(neo) = 66%

3.2 P-Selektin

Während bei allen der Präparate, mit Ausnahme von einem, im Endothel eine Expression des P-Selektins festgestellt werden konnte, zeigte sich im Mesothel in keinem der untersuchten Präparate eine Expression (Abbildung 4.5.). 18 Gewebeschnitte wiesen im Endothel eine mittelgradige Intensität auf (Abbildung 4.6.). Sieben zeigten eine schwächere Intensität und allein zwei zeigten eine höhere Intensität. Der prozentuale Anteil schwankte zwischen 16% und 72%, wobei bei über der Hälfte der Präparate eine annähernd 50%ige Anfärbung der Endothelzellen zu sehen war, was sich auch am Mittelwert mit 53% zeigt. Im normalen Gewebe war das P-Selektin auf den Endothelzellen am höchsten exprimiert, während im akut-entzündlichen Gewebe der prozentuale Anteil am kleinsten ausfiel (normales Gewebe 64% vs. akut-entzündliches Gewebe 38% [Abbildung 4.9.]). Im chronisch-entzündlichen Gewebe und im neoplastischen Gewebe lag dieser dazwischen (chronisch-entzündliches Gewebe 49%; neoplastisches Gewebe 50% [Abbildung 4.9.]). Weiterhin konnte eine Expression des P-Selektins in den Endothelzellen hochendothelialer Venolen und in den Thrombozyten dargestellt werden (Abbildungen 4.7. und 4.8.).

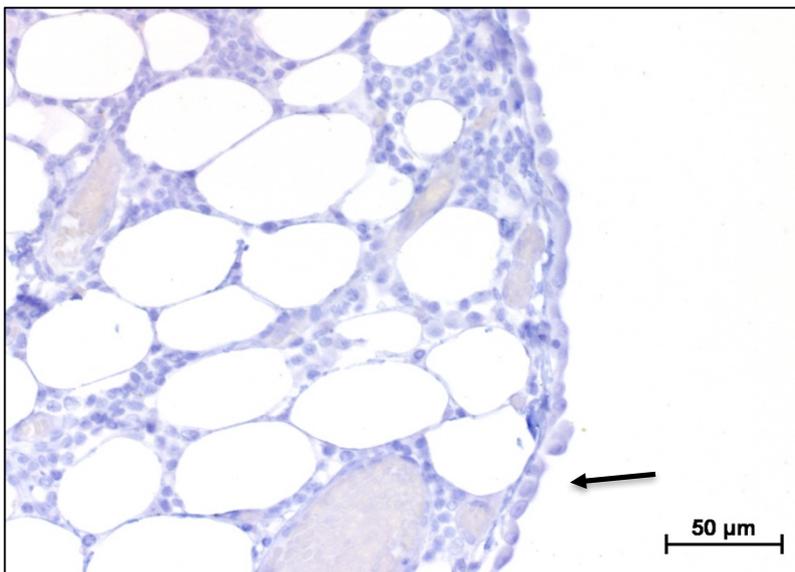


Abbildung 4.5.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-CD62P. Die Mesothelzellen zeigen keine Immunreaktivität (Pfeil).

Ergebnisse

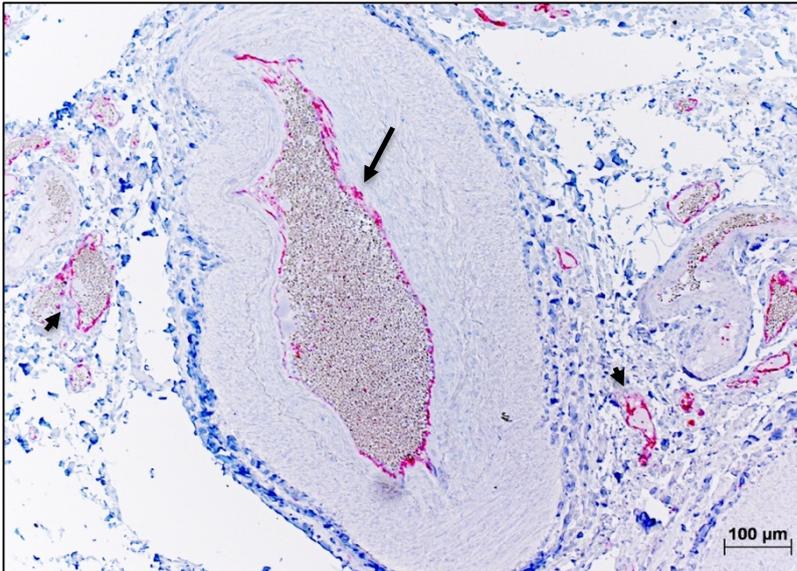


Abbildung 4.6.:

Immunohistochemische Färbung mit anti-CD62P. Das Endothel der Arterie (Pfeil) und der anderen Gefäße (Pfeilspitzen) zeigt eine einheitlich mittelgradige Färbung.

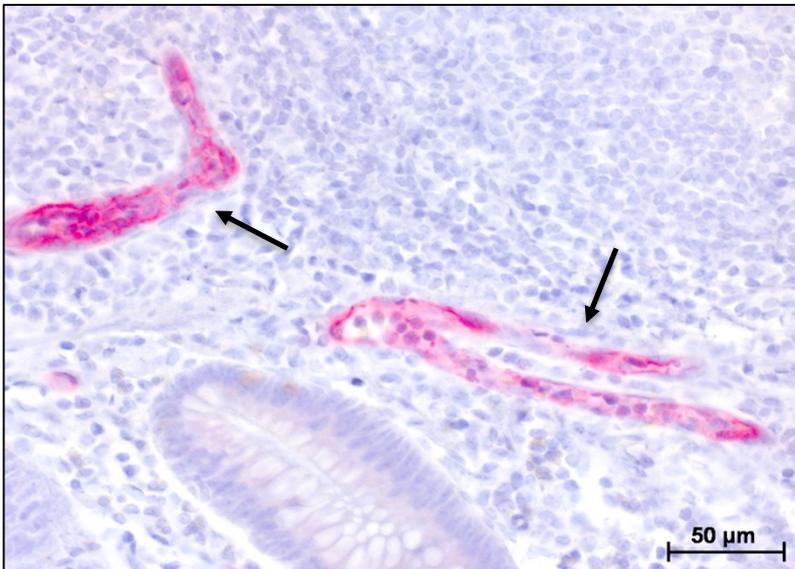


Abbildung 4.7.:

Immunohistochemische Färbung mit anti-CD62P. Die Endothelzellen der hochendothelialen Venolen in der Lamina propria mucosae der Appendix zeigen eine Expression des CD62P (Pfeile).

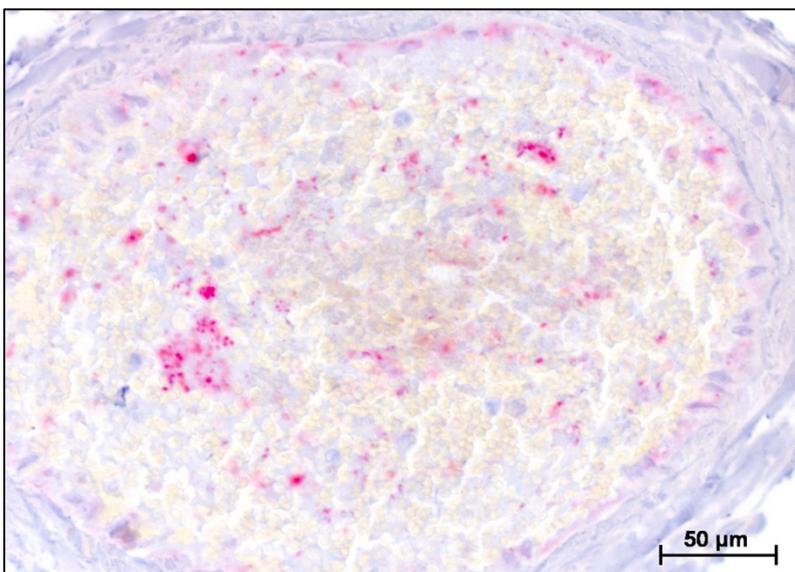
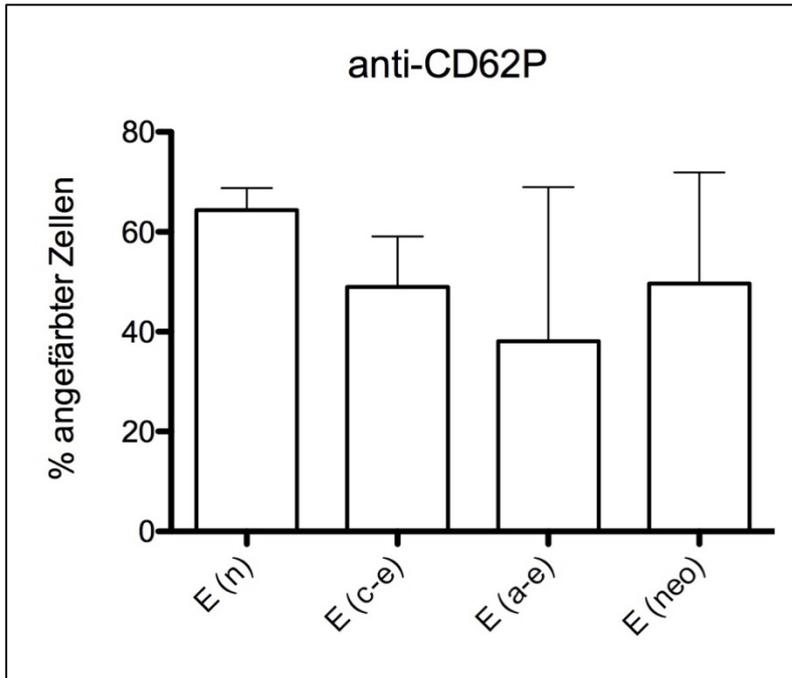


Abbildung 4.8.:

Immunohistochemische Färbung mit anti-CD62P. Im Gefäßlumen befinden sich neben den Erythrozyten und den Zellen des Immunsystems auch Thrombozyten, die hier durch die Expression des CD62P zu erkennen sind.

**Abbildung 4.9.:**

Vergleich der prozentual angefärbten Endothelzellen mit anti-CD62P in den verschiedenen Gewebearten. E(n) = 64%; E(c-e) = 49%; E(a-e) = 38%; E(neo) = 50%

3.3 Integrin $\beta 1$

Bei der Mehrheit der Gewebeschnitte (19 und 21) konnte weder im Endothel noch im Mesothel eine positive Reaktion des anti-Integrin $\beta 1$ Antikörper festgestellt werden (Abbildung 4.11.). Zehn Gewebeschnitte zeigten im Endothel eine positive Immunreaktivität. Davon wiesen acht Gewebeschnitte eine schwache Intensität auf und der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen schwankte zwischen 15% und 33% (Abbildung 4.10.). Lediglich zwei Schnitte zeigten eine stärkere Anfärbung. Der eine zeigte eine mittelgradige Intensität und einen prozentualen Anteil von 60% und der andere eine starke Intensität und einen Anteil von 72%. Im neoplastischen Gewebe war der Anteil der angefärbten Endothelzellen mit 22% am höchsten, während in den anderen Gewebearten ein ähnlich geringes Expressionsmuster erzielt wurde (normales Gewebe 13%; chronisch-entzündliches Gewebe 10%; akut entzündliches Gewebe 10% [Abbildung 4.14.]). Im Mesothel konnte bei acht Gewebeschnitten das Integrin $\beta 1$ nachgewiesen werden. Davon zeigten fünf Schnitte im Mesothel eine schwache Intensität und einen prozentualen Anteil der gefärbten Mesothelzellen von 25% (Abbildung 4.10.) Zwei Gewebeschnitte wiesen eine mittelgradige Intensität und einen Anteil von 38% und 75% auf. Nur ein Schnitt zeigte eine starke Intensität mit einem Anteil von 63% der gefärbten Mesothelzellen. Beim Vergleich der verschiedenen Gewebearten war das Integrin $\beta 1$ auf den Mesothelzellen im normalen Gewebe mit 25% am höchsten repräsentiert, während im chronisch-entzündlichen Gewebe der Anteil mit 12% geringer ausfiel. Im neoplastischen Gewebe und im akut-entzündlichen

Ergebnisse

Gewebe zeigte sich in den Mesothelzellen kaum eine Expression (neoplastisches Gewebe 3%; akut-entzündliches Gewebe 0% [Abbildung 4.14.]). Endothel und Mesothel zeigten mehrheitlich keine Expression des Integrin $\beta 1$. Im chronisch-entzündlichen Gewebe zeigte das Endothel und das Mesothel eine ähnlich geringe Expression mit 10% angefärbter Endothel- und 12% angefärbter Mesothelzellen. Ansonsten sind eher Unterschiede im Expressionsmuster hervorzuheben. Die höchste Immunreaktivität der Endothelzellen konnte im neoplastischen Gewebe erzielt werden und bei den Mesothelzellen im normalen Gewebe. Weiterhin konnte keine bzw. kaum eine Expression in den Mesothelzellen im akut-entzündlichen und neoplastischen Gewebe dargestellt werden, während die Endothelzellen in beiden Geweben eine geringe Immunreaktivität aufwiesen (Abbildung 4.14.). Eine Expression des Integrin $\beta 1$ zeigte sich zudem auch auf glatten Muskelzellen, auf der basalen Oberfläche des Darmepithels und auf der Oberfläche maligner Zellen (Abbildungen 4.10., 4.12. und 4.13.).

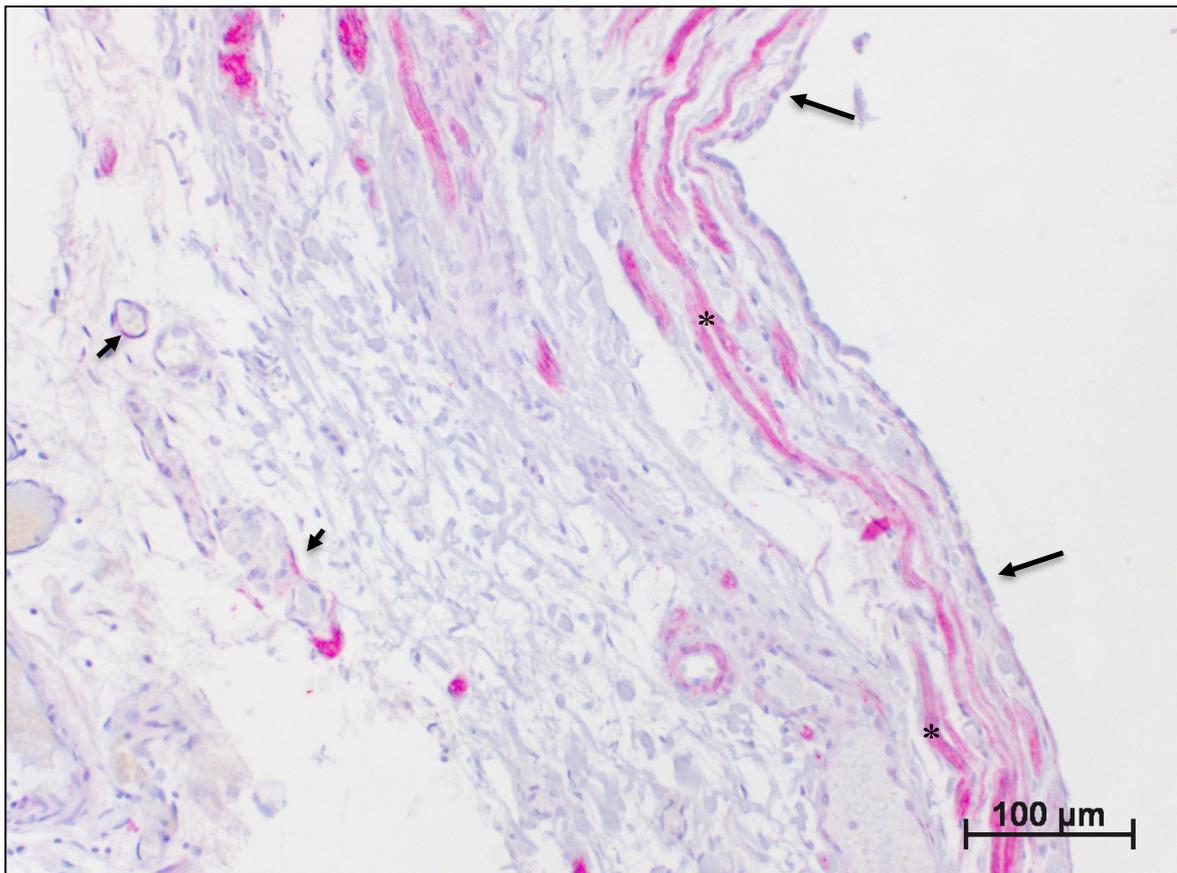


Abbildung 4.10.: Immunhistochemische Färbung mit anti-ITGB1. Die Endothelzellen (Pfeilspitzen) und Mesothelzellen (Pfeil) sind schwach angefärbt. Glatte Muskelzellen in der Muscularis mucosa sind hingegen stärker angefärbt (Stern).

Ergebnisse

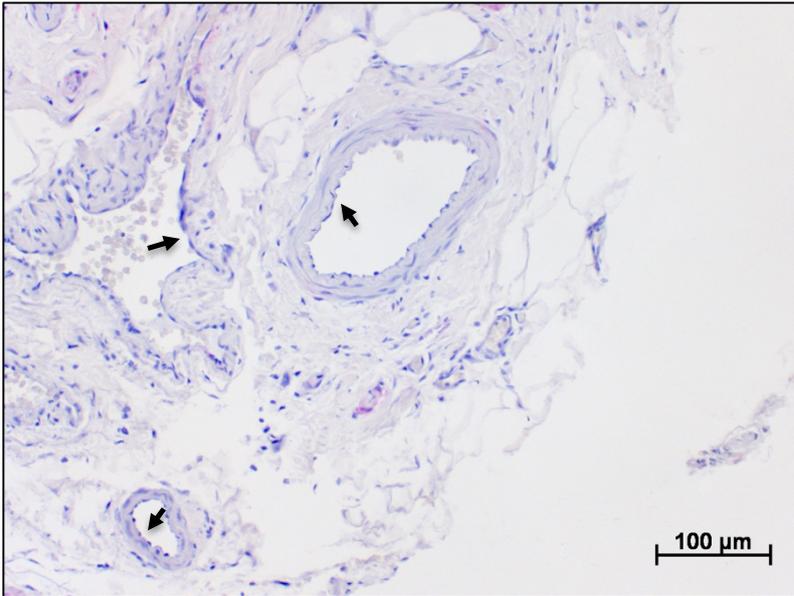


Abbildung 4.11.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-ITGB1. Die Endothelzellen in diesem Präparat zeigen keine Immunreaktivität (Pfeilspitzen).

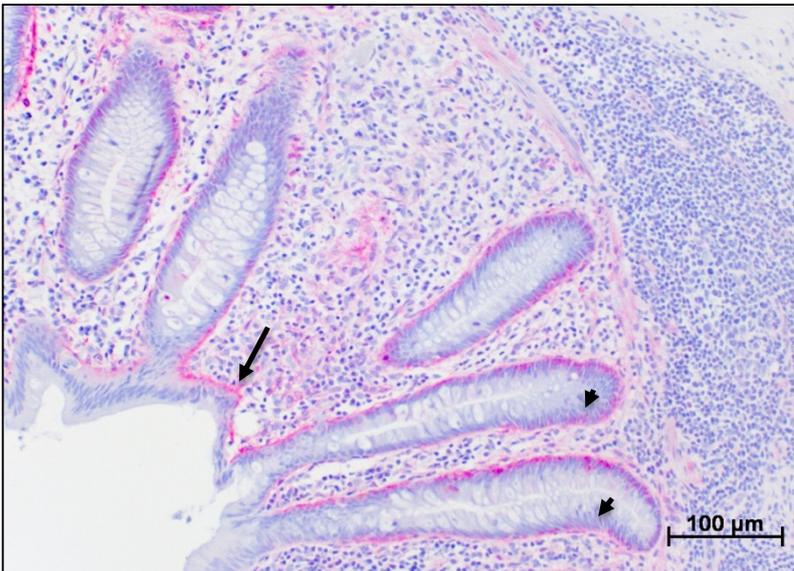


Abbildung 4.12.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-ITGB1. Auf der basalen Zellmembran des Darmepithels (Pfeil) und in den Lieberkühnkrypten (Pfeilspitzen) zeigt sich eine Expression des ITGB1.

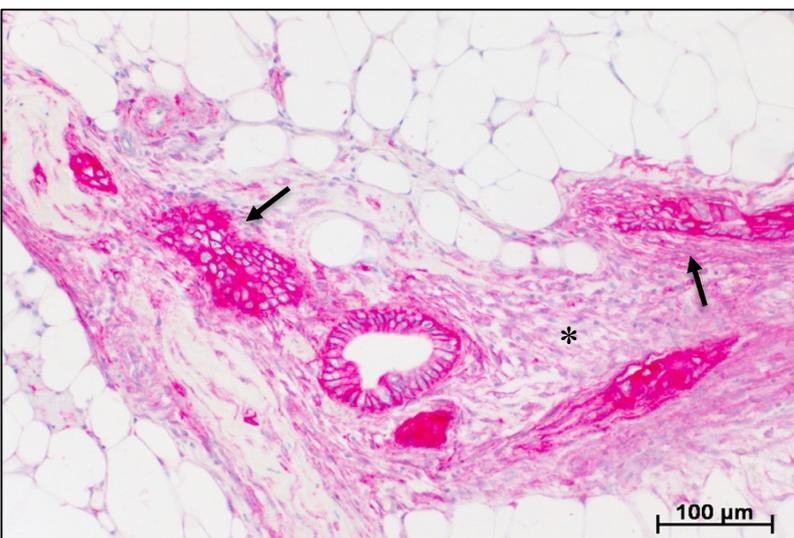
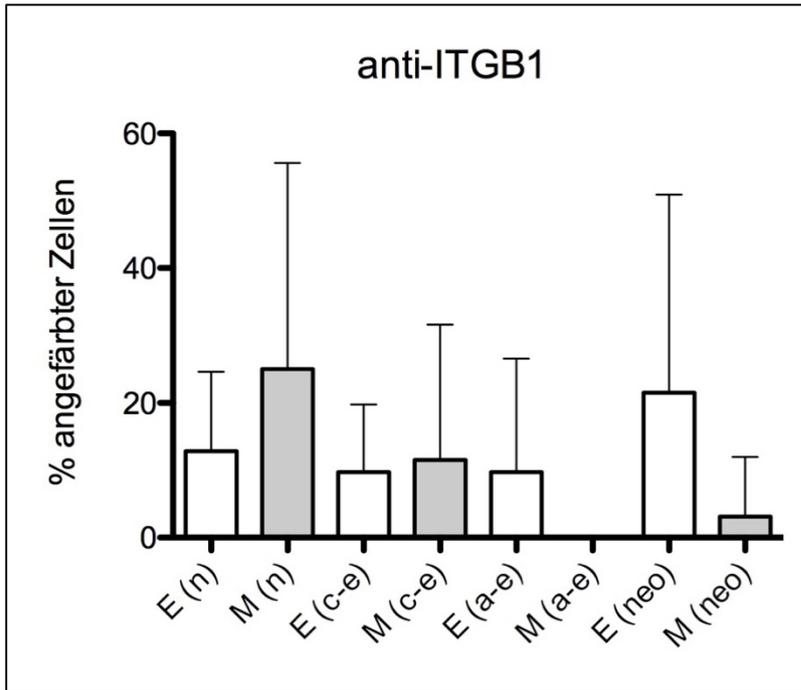


Abbildung 4.13.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-ITGB1. Die Tumorzellen eines serösen Zystadenokarzinoms des Ovars, G2, zeigen eine starke Expression des ITGB1 (Pfeile). Auch das Bindegewebe zwischen den Tumorzellnestern ist angefärbt (Stern).

**Abbildung 4.14.:**

Vergleich der prozentual angefärbten Endothel- bzw. Mesothelzellen mit anti-ITGB1 in den verschiedenen Gewebearten. E(n) = 13%; M(n) = 25%; E(c-e) = 10%; M(c-e) = 12%; E(a-e) = 10%; M(a-e) = 0%; E(neo) = 22%; M(neo) = 3%

3.4 Integrin $\beta 3$

Bei der Mehrheit der Gewebeschnitte (20) konnte im Endothel keine Expression des Integrin $\beta 3$ festgestellt werden (Abbildung 4.17.). Acht Gewebeschnitte wiesen im Endothel eine positive Immunreaktivität auf. Davon zeigten sieben eine schwache (Abbildung 4.16.) und einer eine mittelgradige Intensität der immunhistochemischen Färbung. Der prozentuale Anteil der gefärbten Endothelzellen variierte zwischen 16% und 78% stark. Die Endothelzellen im normalen Gewebe wiesen mit Abstand den größten prozentualen Anteil auf (normales Gewebe 44% vs. chronisch-entzündliches Gewebe 7%; neoplastisches Gewebe 3%; akut-entzündliches Gewebe 0% [Abbildung 4.18.]). Insgesamt standen für die Beurteilung der Expression des Integrin $\beta 3$ im Mesothel nur 24 Gewebeschnitte zur Verfügung, da bei fünf Gewebeschnitten die Mesothelschicht während der immunhistochemischen Behandlung herausgelöst wurde. Die Expression des Integrin $\beta 3$ im Mesothel wies ein inhomogenes Muster auf. In der Hälfte der Gewebeschnitte konnte keine Expression des Integrin $\beta 3$ gefunden werden (Abbildung 4.17.). In acht Gewebeschnitten wurde im Mesothel eine schwache Intensität des anti-Integrin $\beta 3$ Antikörpers festgestellt und der prozentuale Anteil der gefärbten Mesothelzellen schwankte zwischen 13% und 50%, wobei der Mittelwert bei 33% lag. Lediglich vier Gewebeschnitte wiesen im Mesothel eine mittelgradige Intensität und mit 75% und 100% einen hohen Anteil der gefärbten Mesothelzellen auf (Abbildungen 4.15. und 4.16.). Die verschiedenen Gewebearten betrachtend zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster wie bei den Endothelzellen. Die

Ergebnisse

meisten Mesothelzellen waren im normalen Gewebe angefärbt, während lediglich geringe Prozentzahlen in den restlichen Gewebearten erzielt wurden (normales Gewebe 68% vs. chronisch-entzündliches Gewebe 17%; neoplastisches Gewebe 13%; akut-entzündliches Gewebe 0%). Es lässt sich zusammenfassend hervorheben, dass die Zellen im normalen Gewebe die höchste Immunreaktivität mit einem Anteil von 44% im Endothel und sogar von 68% im Mesothel aufwiesen. Im chronisch-entzündlichen und neoplastischen Gewebe war das Mesothel ebenfalls mit einem höheren Anteil als das Endothel vertreten, jedoch mit deutlich geringeren Prozentzahlen (chronisch-entzündliches Gewebe 17% vs. 7%; neoplastisches Gewebe 13% vs. 3%). Im akut-entzündlichen Gewebe zeigten weder Mesothel- noch Endothelzellen eine Immunreaktivität (Abbildung 4.18.).

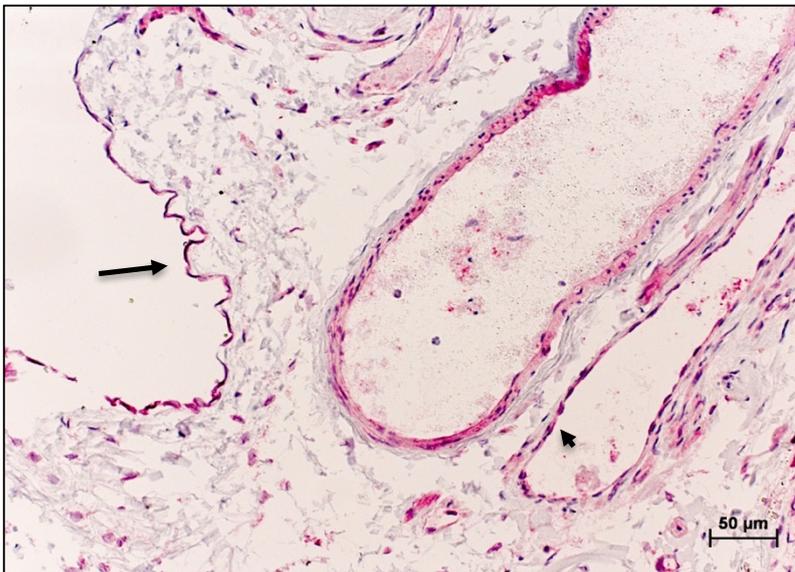


Abbildung 4.15.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-ITGB3. Mesothel- (Pfeil) und Endothelzellen (Pfeilspitzen) zeigen eine Expression des ITGB3.

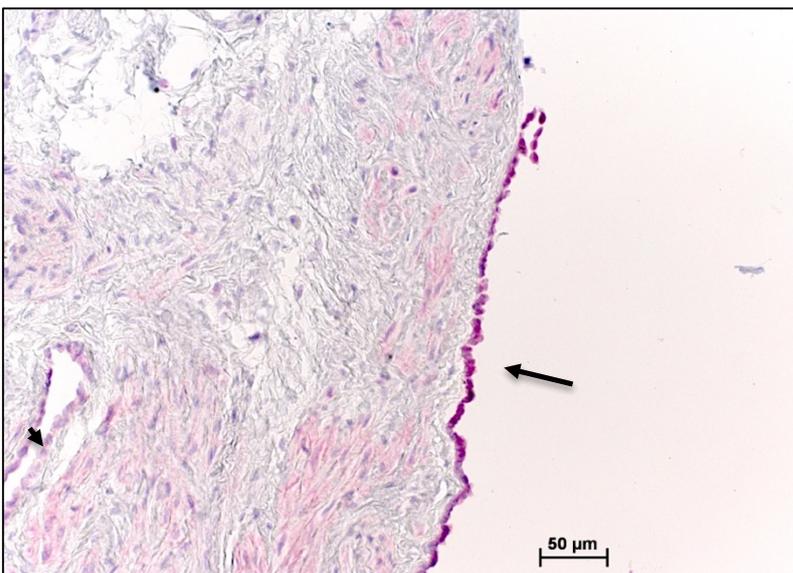


Abbildung 4.16.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-ITGB3. Während die Mesothelzellen (Pfeil) eine mittelgradige Färbung aufweisen, sind die Endothelzellen (Pfeilspitze) in diesem Präparat schwächer angefärbt.

Ergebnisse

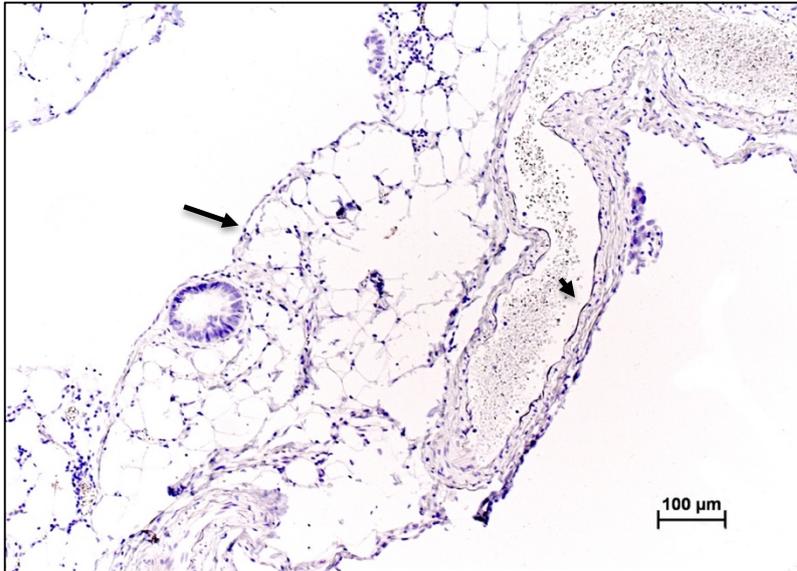


Abbildung 4.17.:

Immunohistochemische Färbung mit anti-ITGB3. In diesem Präparat zeigen weder Endothel- (Pfeilspitze) noch Mesothelzellen (Pfeil) eine Immunreaktivität.

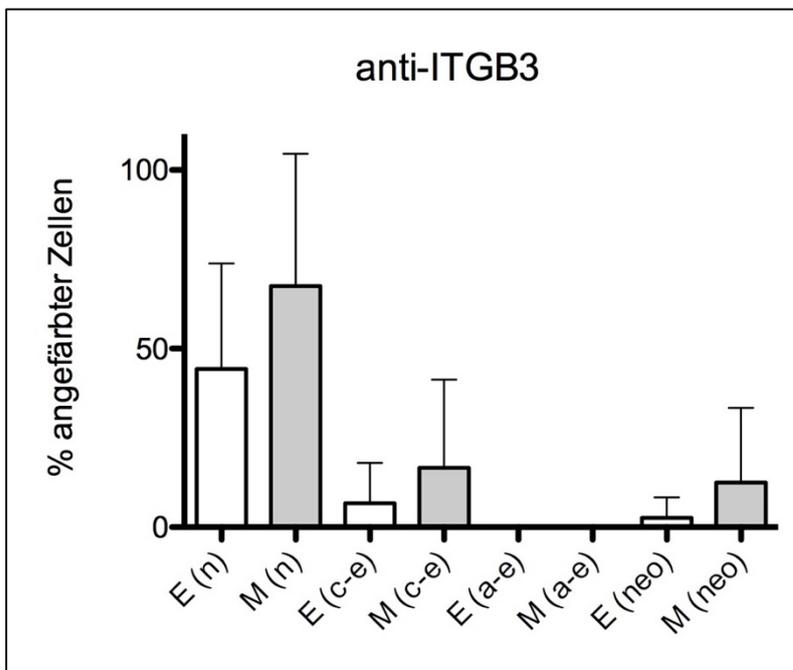


Abbildung 4.18.:

Vergleich der prozentual angefärbten Endothel- bzw. Mesothelzellen mit anti-ITGB3 in den verschiedenen Gewebearten. E(n) = 44%; M(n) = 68%; E(c-e) = 8%; M(c-e) = 17%; E(a-e) = 0%; M(a-e) = 0%; E(neo) = 3%; M(neo) = 13%

3.5 Integrin $\beta 4$

In keinem der Präparate konnte eine Expression des Integrin $\beta 4$ im Endothel oder im Mesothel festgestellt werden (Abbildung 4.19.). Eine Immunreaktivität konnte im Darmepithel, an der basalen Oberfläche des Tubenepithels und in malignen Zellen nachgewiesen werden (Abbildungen 4.20.-22).

Ergebnisse

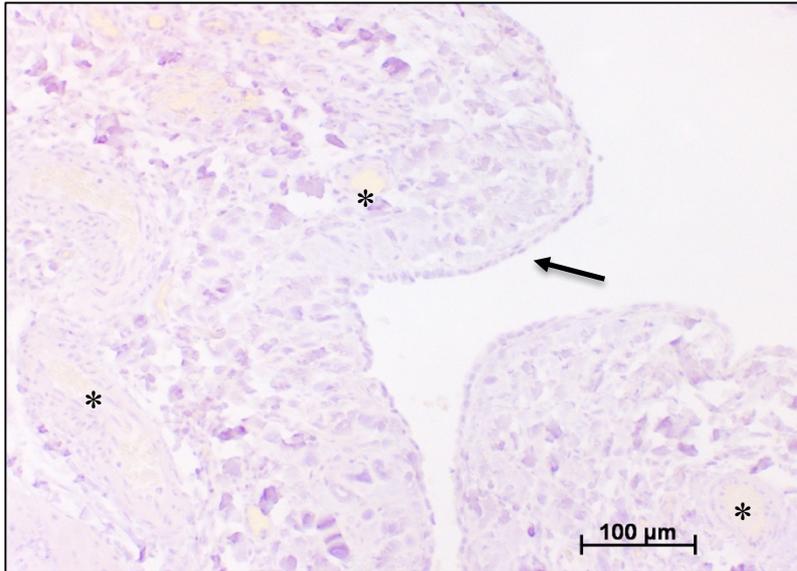


Abbildung 4.19.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-ITGB4. In den Gefäßen (Stern) ist keine Immunreaktivität der Endothelzellen zu erkennen. Auch die Mesothelzellen (Pfeil) zeigen keine Expression des ITGB4.

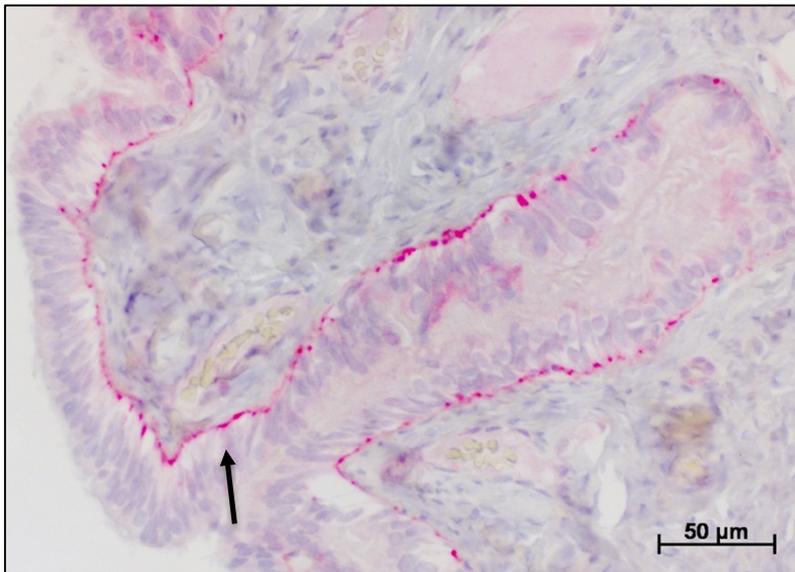


Abbildung 4.20.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-ITGB4. Auf der basalen Seite des Tubenepithels zeigt sich eine deutlich fokale Immunreaktivität (Pfeil).



Abbildung 4.21.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-ITGB4. Das Darmepithel an der Oberfläche (Pfeil) und auch in den Lieberkühn-Krypten (Stern) zeigt eine Expression des ITGB4.

Ergebnisse

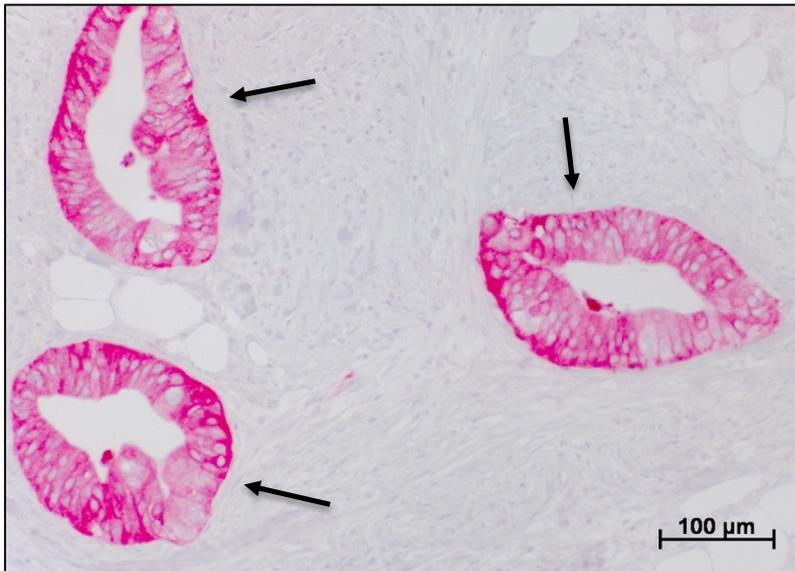


Abbildung 4.22.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-ITGB4. Die Tumorzellnester eines serösen Zystadenokarzinoms des Ovars, G2, sind deutlich angefärbt (Pfeile).

3.6 Zelladhäsionsmolekül L1

Bei allen Gewebeschnitten konnte weder im Endothel noch im Mesothel eine Immunreaktivität mit dem anti-L1CAM Antikörper festgestellt werden (Abbildung 4.23.). Eine Expression des L1CAM zeigte sich in peripheren Nerven und auf der Oberfläche von Tumorzellen eines serösen Zystadenokarzinoms des Ovars und eines endometrioden Ovarialkarzinoms (Abbildungen 4.23 und 4.24).

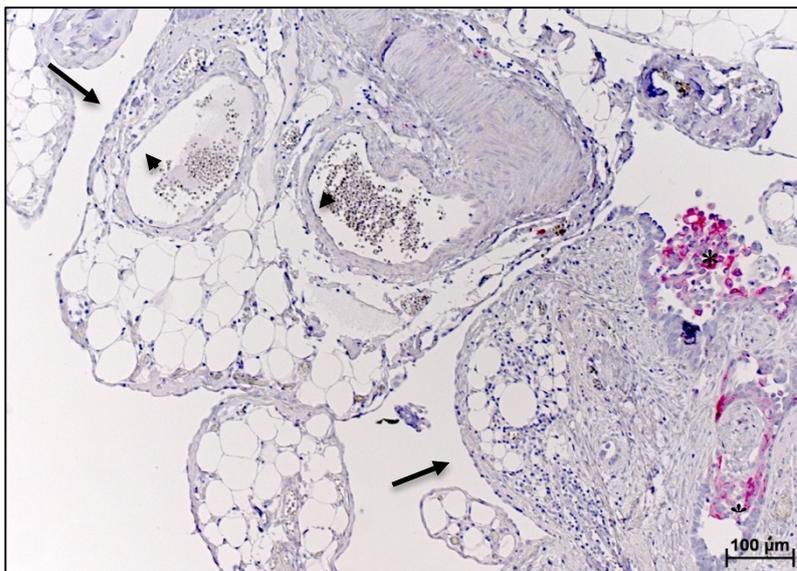


Abbildung 4.23.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-L1CAM. Weder die Endothel- (Pfeilspitzen) noch die Mesothelzellen (Pfeile) zeigen eine Immunreaktivität. Die Tumorzellen eines endometrioden Ovarialkarzinoms, G2, sind deutlich angefärbt (Stern).

Ergebnisse

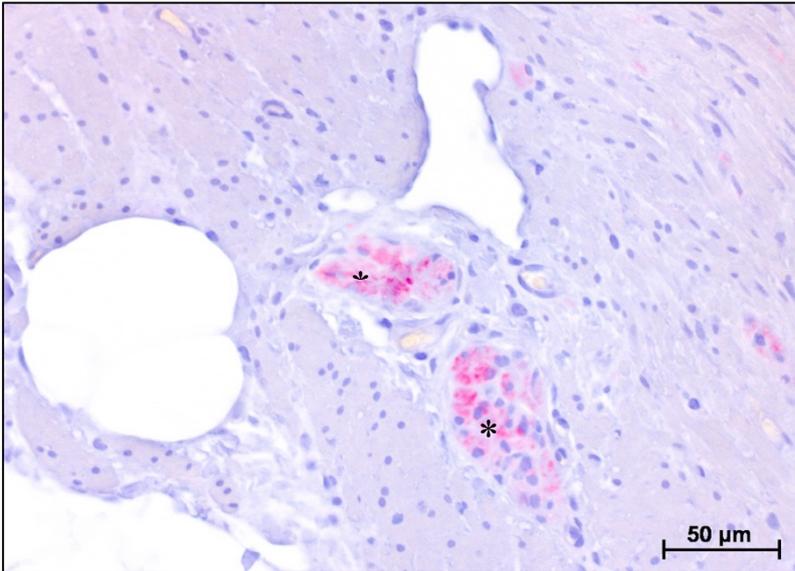


Abbildung 4.24.:

Immunohistochemische Färbung mit anti-L1CAM. Die quer angeschnittenen peripheren Nerven zeigen eine Expression des L1CAM (Stern).

3.7 Zelladhäsionsmolekül CD44

Es zeigte sich in keinen der Präparate eine Expression des CD44-Adhäsionsmoleküls im Endothel und Mesothel (Abbildungen 4.25. und 4.26.). Eine Immunreaktivität konnte auf der Oberfläche maligner Zellen und im lymphatischen Gewebe der Lamina propria mucosae des Appendix nachgewiesen werden (Abbildung 4.27).

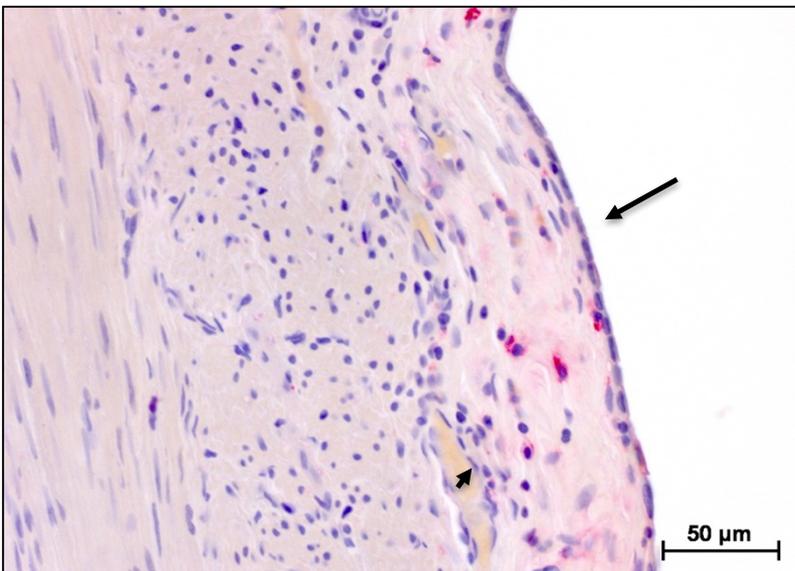


Abbildung 4.25.:

Immunohistochemische Färbung mit anti-CD44. Weder die Endothel- (Pfeilspitzen) noch die Mesothelzellen (Pfeil) zeigen eine Immunreaktivität.

Ergebnisse

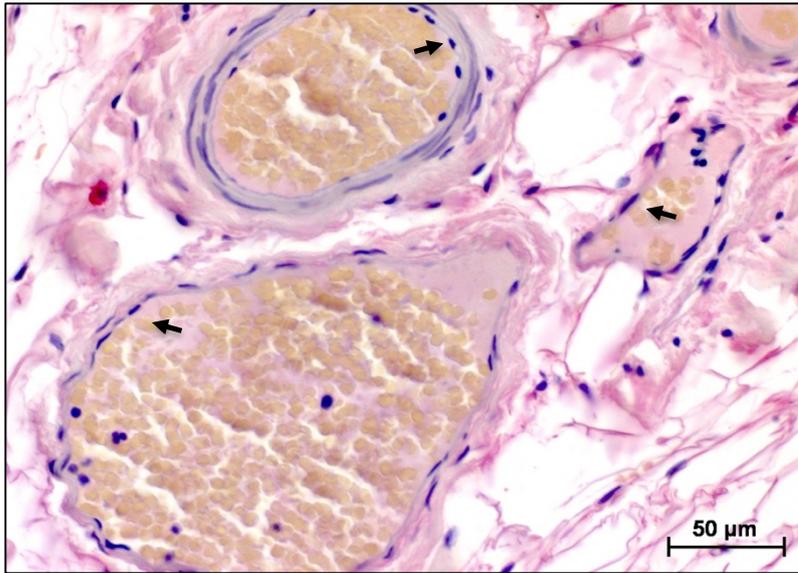


Abbildung 4.26.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-CD44. Die Endothelzellen zeigen keine Immunreaktivität (Pfeilspitzen).

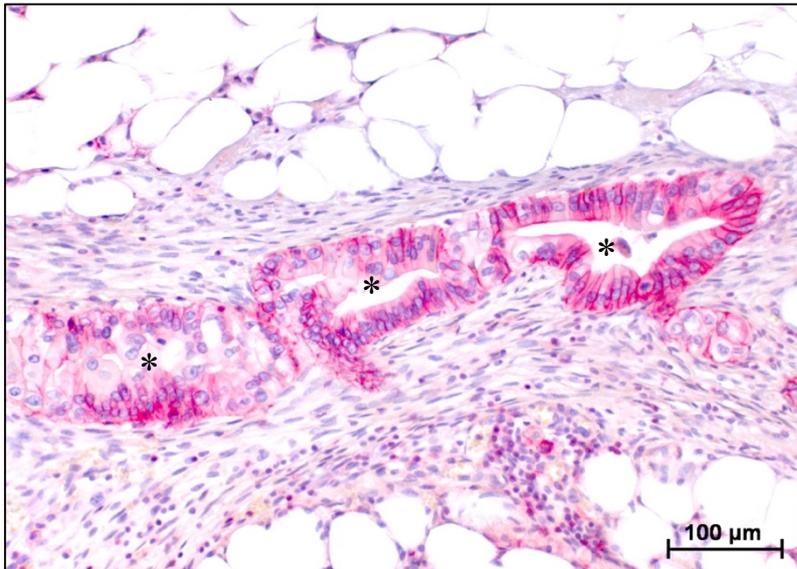


Abbildung 4.27.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-CD44. Die Tumorzellnester eines serösen Zystadenokarzinoms des Ovars, G2, zeigen eine Expression des CD44 (Stern).

3.8 Hyaluronan

Bei allen Gewebeschnitten konnte weder im Endothel noch im Mesothel eine Expression des Hyaluronan detektiert werden (Abbildungen 4.28. und 4.29.). Die extrazelluläre Matrix zeigt dagegen eine deutliche Expression des Hyaluronan (Abbildungen 4.28. und 4.29.).

Ergebnisse

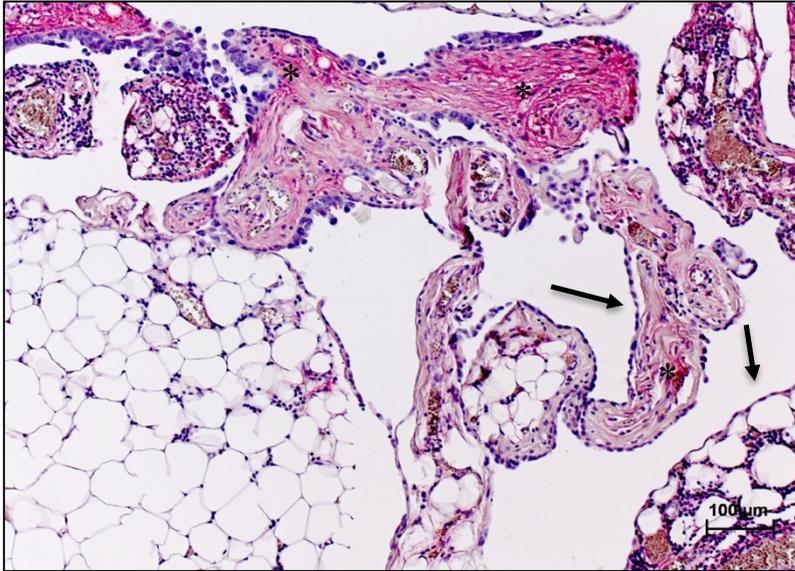


Abbildung 4.28.:

Immunohistochemische Färbung mit HABP. Die Mesothelzellen zeigen keine Immunreaktivität (Pfeile). Das Bindegewebe in der Subserosa zeigt eine Expression der HA (Stern).

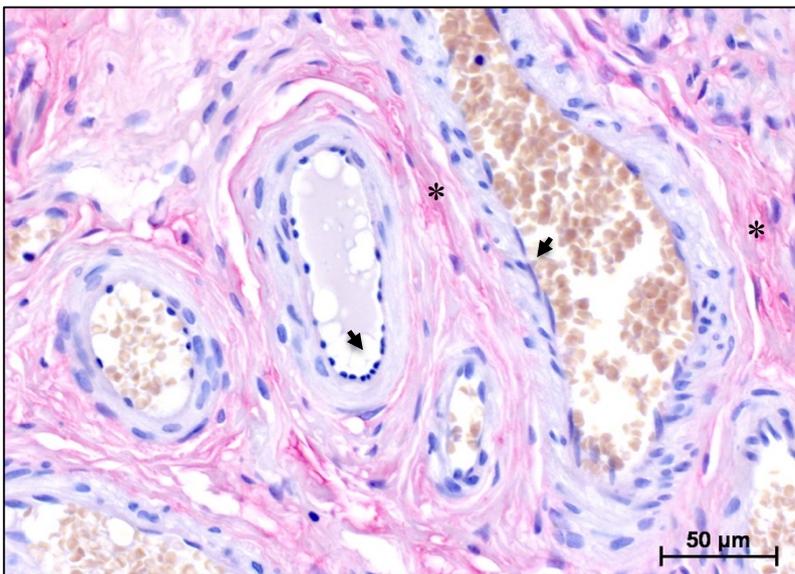


Abbildung 4.29.:

Immunohistochemische Färbung mit HABP. Die Endothelzellen zeigen keine Immunreaktivität (Pfeilspitzen). Das Bindegewebe in der Subserosa der Tube zeigt eine Expression der HA (Stern).

3.9 Pan-Zytokeratin

Von insgesamt 29 Gewebeschnitten zeigten 18, und somit mehr als die Hälfte, im Endothel keine Immunreaktivität (Abbildung 4.30.). Bei zehn der Gewebeschnitte waren die Endothelzellen mit einer schwachen (+) Intensität angefärbt und auch der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen fiel mit einer Spannweite zwischen 16% und 30% sehr gering aus. Lediglich in einem Gewebeschnitt waren 50% der Endothelzellen mit einer stärkeren (++) Intensität angefärbt. Im normalen Gewebe waren knapp ein Fünftel der Endothelzellen angefärbt, während im entzündlichen und neoplastischen Gewebe der Anteil geringer ausfiel (normales Gewebe 19%; chronisch-entzündlich 11%; akut-entzündlich 0%; neoplastisches Gewebe 5% [Abbildung 4.33.]). Im Gegensatz dazu zeigten die Mesothelzellen mit einer Ausnahme in allen Gewebeschnitten eine starke (+++) Intensität des anti-Pan-Zytokeratin

Ergebnisse

Antikörpers (Abbildung 4.30.). In 19 Gewebeschnitten waren die Mesothelzellen zu 100% gefärbt, in sieben zu 75% und in zwei zu 88%. Nur in einem Gewebeschnitt zeigte sich eine 50%ige Anfärbung der Mesothelzellen. Die Mesothelzellen wiesen im normalen, im chronisch-entzündlichen und im neoplastischen Gewebe prozentual gesehen die höchste Anfärbbarkeit auf (normales Gewebe 95%; chronisch-entzündliches Gewebe 92%; neoplastisches Gewebe 91% [Abbildung 4.33.]). Im akut-entzündlichen fiel die Zahl geringer aus (akut-entzündliches Gewebe 83% [Abbildung 4.33.]). Insgesamt konnte im Mesothel in allen Geweben eine hohe Immunreaktivität nachgewiesen werden, während die Anzahl beim Endothel deutlich geringer ausfiel (Abbildung 4.33.). Im Tubenepithel und im Darmepithel konnte eine deutliche Expression des Pan-Zytokeratins festgestellt werden (Abbildungen 4.31. und 4.32.).

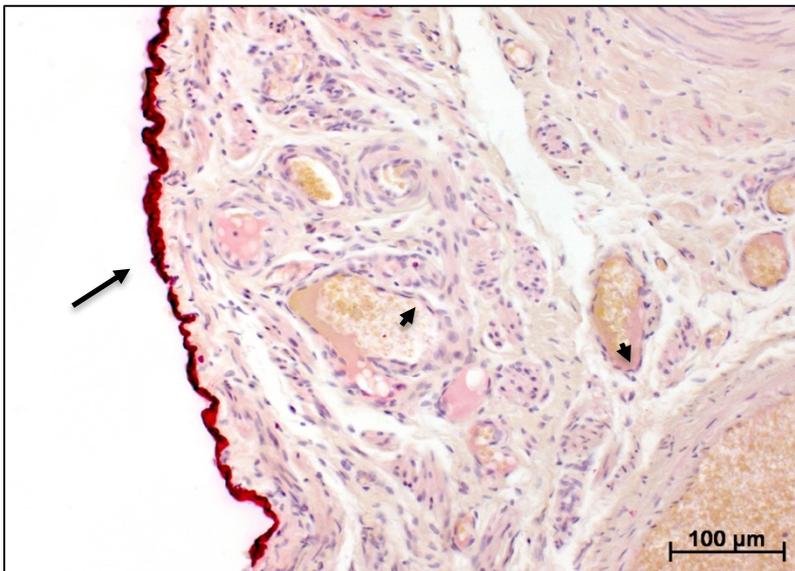


Abbildung 4.30.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-Pan-ZK. Die Mesothelzellen (Pfeil) zeigen eine starke Expression des Pan-CK während die Endothelzellen (Pfeilspitzen) keine Expression zeigen.

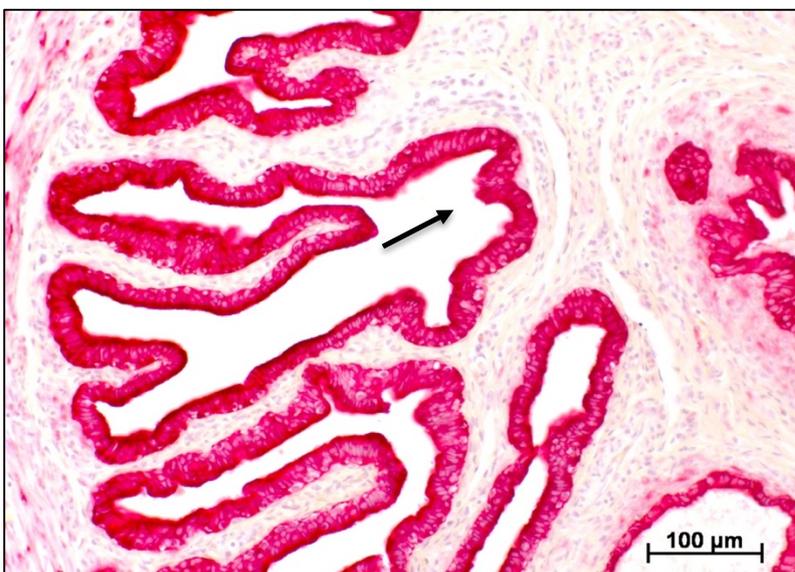


Abbildung 4.31.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-Pan-ZK. Das Tubenepithel zeigt eine starke Expression des Zytokeratins (Pfeil).

Ergebnisse

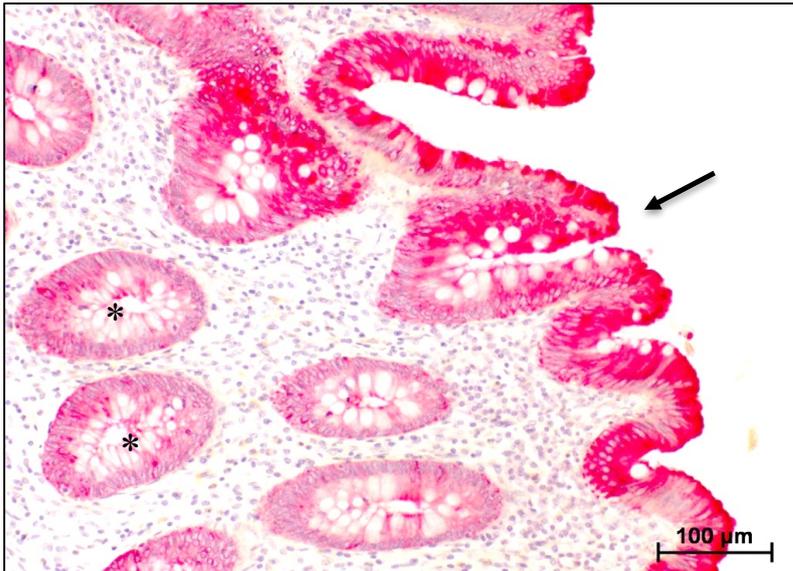


Abbildung 4.32.:

Immunohistochemische Färbung mit anti-Pan-ZK. Das Darmepithel an der Lumenoberfläche (Pfeil) und auch in den Lieberkühn-Krypten (Stern) zeigt eine Zytokeratinimmunreaktivität.

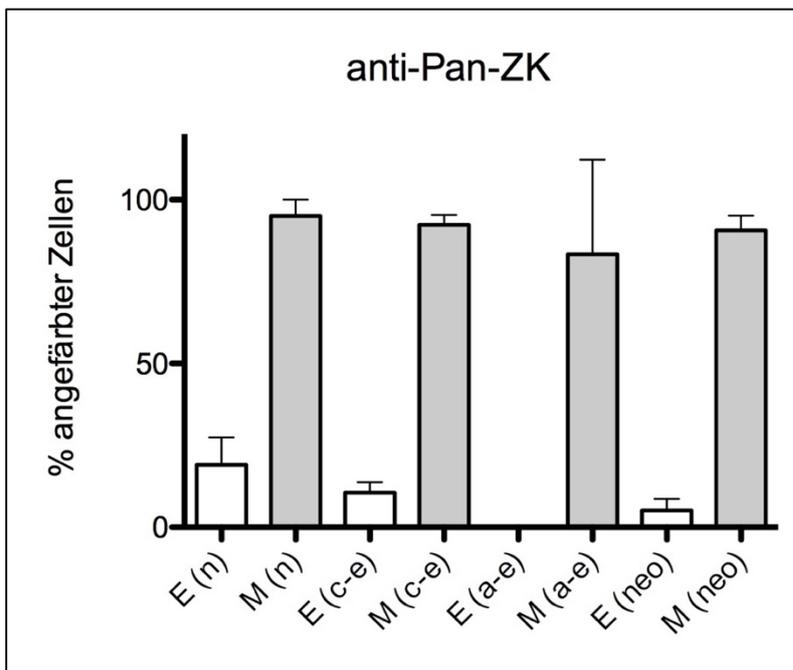


Abbildung 4.33.:

Vergleich der prozentual angefärbten Endothel- bzw. Mesothelzellen mit anti-Pan-ZK in den verschiedenen Gewebearten. E(n) = 19%; M(n) = 95%; E(c-e) = 11%; M(c-e) = 92%; E(a-e) = 0%; M(a-e) = 83%; E(neo) = 5%; M(neo) = 91%

3.10 Zytokeratin K8

Alle 29 Gewebeproben zeigten im Endothel keine Immunreaktivität gegenüber dem anti-Zytokeratin K8 Antikörper (Abbildung 4.34.). Dagegen konnte gezeigt werden, dass das Mesothel in allen Gewebeschnitten eine starke Färbung aufwies (Abbildung 4.34.). 22 Gewebeschnitte waren mit einer starken (+++) und sieben mit einer mittelgradigen Intensität gefärbt. Der prozentuale Anteil der gefärbten Mesothelzellen lag bei der Mehrheit mit 18 Schnitten bei 75%. Bei neun Gewebeschnitten waren es 100% und bei zwei lag der prozentuale Anteil mit 88% zwischen den beiden Werten. In allen Gewebearten war das Zytokeratin K8 stark repräsentiert, wobei im normalen Gewebe der höchste prozentuale

Ergebnisse

Anteil erzielt wurde (normales Gewebe 90%; chronisch-entzündliches Gewebe 81%; akut-entzündliches Gewebe 83%; neoplastisches Gewebe 84% [Abbildung 4.37.]). Darüber hinaus konnte eine Expression des Zytokeratin K8 auch im Tubenepithel, im Darmepithel und in malignen Zellen nachgewiesen werden (Abbildungen 4.35. und 4.36.).

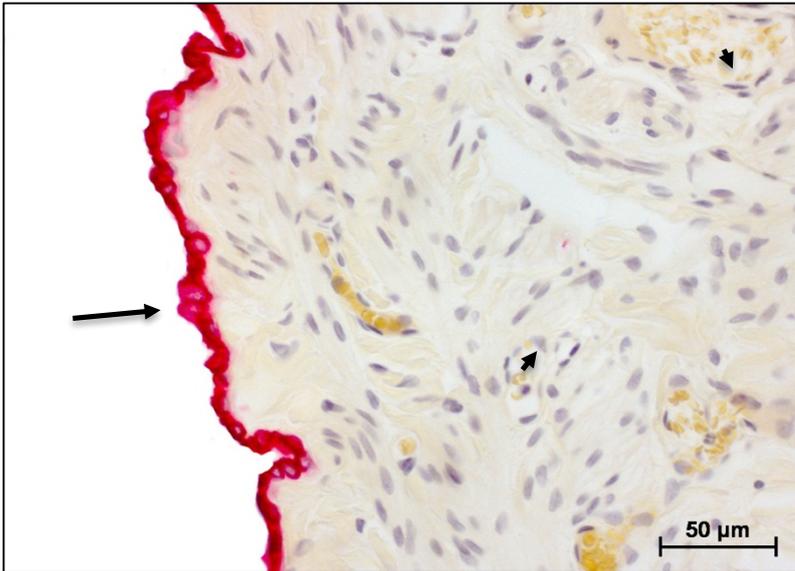


Abbildung 4.34.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-K8. Während die Mesothelzellen stark angefärbt sind (Pfeil), zeigt sich in den Endothelzellen keine Expression des K8 (Pfeilspitzen).

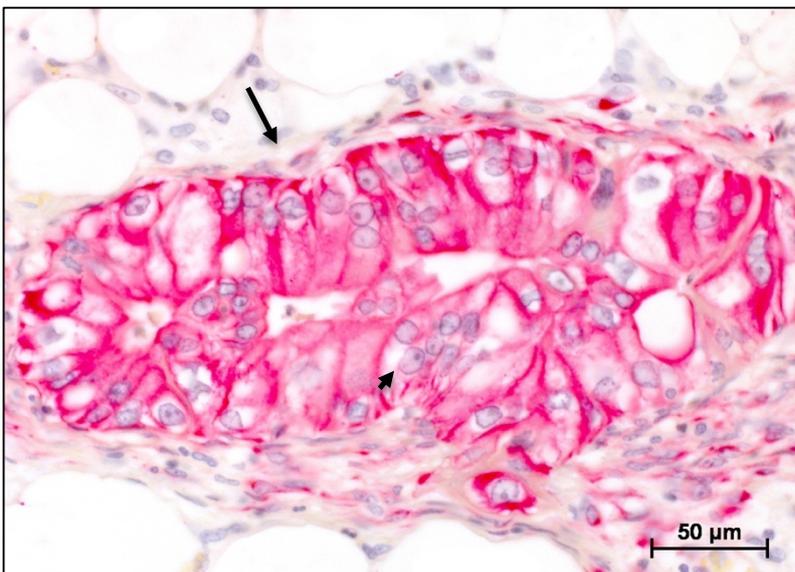


Abbildung 4.35.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-K8. Die Tumorzellen eines serösen Zystadenokarzinoms des Ovars, G2, zeigen eine starke Expression des K8 (Pfeil). Die Tumorzellen sind durch einen großen Zellkern mit einem prominenten Nucleolus zu erkennen (Pfeilspitze).

Ergebnisse

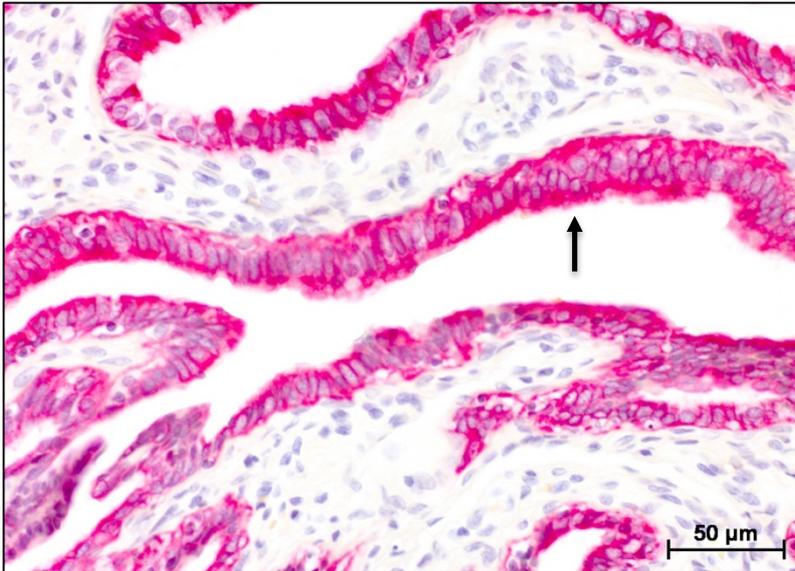


Abbildung 4.36.:

Immunohistochemische Färbung mit anti-K8. Das Tubenepithel zeigt eine deutliche Expression des K8 (Pfeil).

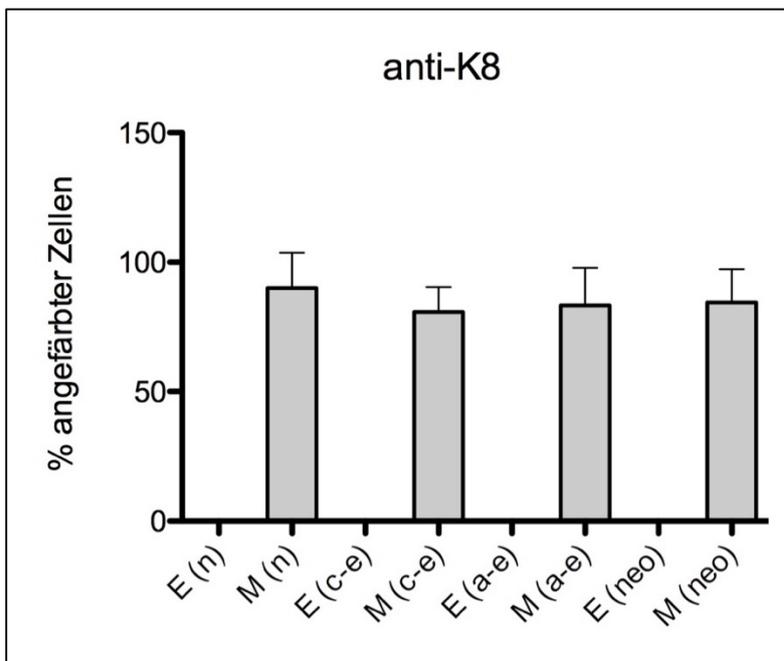


Abbildung 4.37.:

Vergleich der prozentual angefarbten Mesothelzellen mit anti-K8 in den verschiedenen Gewebearten. M(n) = 90%; M(c-e) = 81%; M(a-e) = 83%; M(neo) = 84%

3.11 Zytokeratin K15

Die Mehrheit der Gewebeschnitte (25) wies im Endothel keine Zytokeratin K15 Immunreaktivität auf (Abbildung 4.38.). Lediglich in vier Gewebeschnitten zeigte sich eine Expression des Zytokeratin 15. Dabei war die Intensität schwach und auch der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen war mit einer Spanne zwischen 13% und 23% sehr gering. Im normalen und chronisch entzündlichen Gewebe zeigte sich kaum eine Anfärbbarkeit in den Endothelzellen und im akut-entzündlichen und neoplastischen Gewebe gar keine Expression für das Zytokeratin K15 (normales Gewebe 4%; chronisch entzündliches Gewebe 4% [Abbildung 4.40.]). Drei Gewebeschnitte konnten für das Mesothel nicht beurteilt werden,

Ergebnisse

da bei der immunhistochemischen Behandlung der Schnitte die Mesothelschicht herausgelöst wurde. Die restlichen 26 Gewebeschnitte zeigten ein sehr inhomogenes Muster. In acht Gewebeschnitten zeigte das Mesothel keine Immunreaktivität gegenüber dem anti-Zytokeratin K15 Antikörper, die Mehrzahl war mit 18 Schnitten jedoch positiv (Abbildung 4.38.). Davon konnte bei acht eine schwache, bei neun eine mittelgradige und bei einem eine starke Intensität der Färbung festgestellt werden. Der prozentuale Anteil der gefärbten Mesothelzellen erstreckte sich von 25% bis 100%, wobei die Mehrheit bei 25% und 50% lag. Lediglich bei vier Gewebeschnitten konnte ein prozentualer Anteil der gefärbten Mesothelzellen von 75% erreicht werden. Ein Schnitt zeigte eine 100%ige Anfärbung der Mesothelzellen mit dem anti-Zytokeratin K15 Antikörper. Im normalen Gewebe war der prozentuale Anteil am höchsten und in den restlichen Gewebearten geringer (normales Gewebe 60%; chronisch-entzündliches Gewebe 31%; akut-entzündliches Gewebe 25%; neoplastisches Gewebe 25% [Abbildung 4.40.]). Insgesamt konnte im Mesothel in allen Geweben eine hohe Immunreaktivität nachgewiesen werden, während die Zahlen beim Endothel deutlich geringer ausfielen (Abbildung 4.40.). Eine Expression konnte auch in malignen Zellen festgestellt werden (Abbildung 4.39).

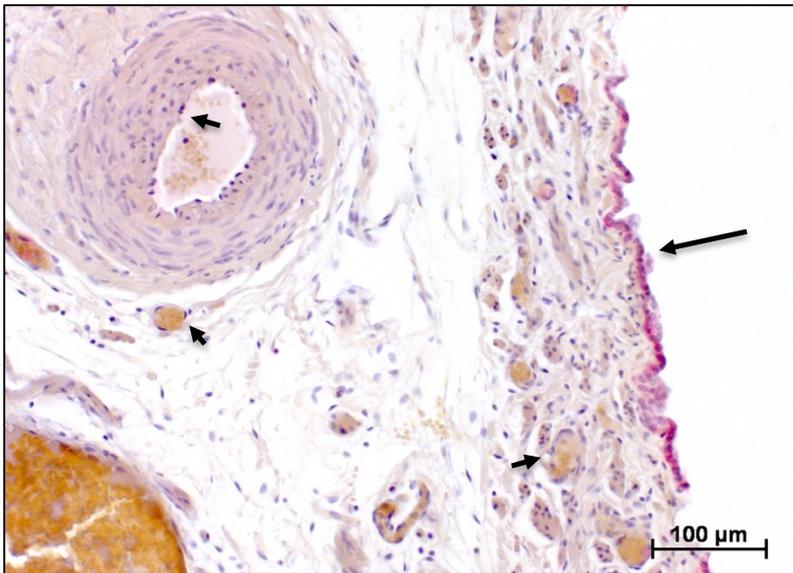


Abbildung 4.38.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-K15. Während die Mesothelzellen mittelgradig angefärbt sind (Pfeil), zeigt sich in den Endothelzellen keine Immunreaktivität (Pfeilspitzen).

Ergebnisse

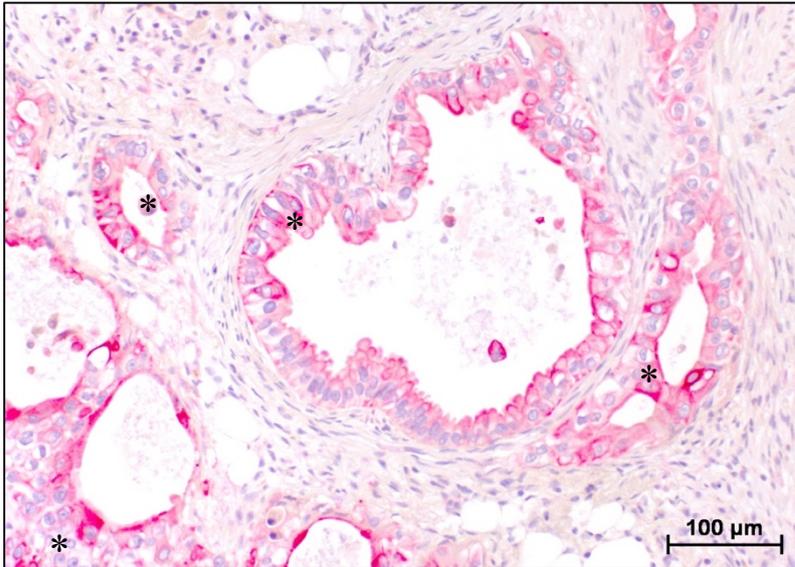


Abbildung 4.39.:

Immunohistochemische Färbung mit anti-K15. Die Tumorzellen zeigen teilweise eine Expression des K15 (Stern).

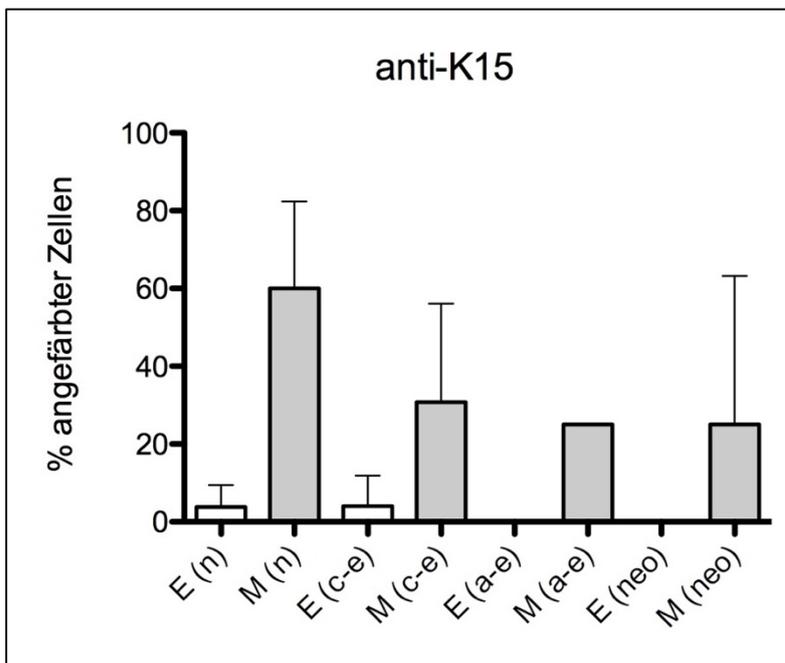


Abbildung 4.40.:

Vergleich der prozentual angefärbten Endothel- bzw. Mesothelzellen mit anti-K15 in den verschiedenen Gewebearten. E(n) = 4%; M(n) = 60%; E(c-e) = 4%; M(c-e) = 31%; E(a-e) = 0%; M(a-e) = 25%; E(neo) = 0%; M(neo) = 25%

3.12 Vimentin

Bei allen Gewebeschnitten, mit Ausnahme von dreien, konnte im Endothel eine Expression des Vimentins festgestellt werden (Abbildung 4.42.). Dabei zeigte das Endothel in 15 Gewebeschnitten eine mittelgradige und in zehn Schnitten eine schwache Intensität der Immunreaktivität. Der prozentuale Anteil der gefärbten Endothelzellen variierte zwischen 21% und 72% stark, wobei der Mittelwert bei 42% lag. Im normalen Gewebe war circa die Hälfte der Endothelzellen positiv für das Vimentin, während bei den restlichen Gewebearten der prozentuale Anteil zwischen 33% und 41% lag (normales Gewebe 49%, chronisch-entzündliches Gewebe 33%; akut-entzündliches Gewebe 36%; neoplastisches Gewebe 41%

Ergebnisse

[Abbildung 4.44.]). Beim Mesothel zeigte sich bei acht Gewebeschnitten keine Expression des Vimentins, während die Mehrzahl der Gewebeschnitte (20) eine positive Reaktion aufwiesen (Abbildung 4.41.). Davon waren zwölf Gewebeschnitte im Mesothel nur mit einer schwachen und sieben mit einer mittelgradigen Intensität angefärbt. Ein Schnitt zeigte im Mesothel eine starke Intensität. Auch hier fand man beim prozentualen Anteil der gefärbten Mesothelzellen eine starke Variation zwischen 12,5% und 100%, wobei der prozentuale Anteil in den meisten Präparaten um 50% lag. Der Mittelwert war 45%. Betrachtet man die verschiedenen Gewebewarten, konnte im normalen Gewebe der höchste prozentuale Anteil erzielt werden, gefolgt vom neoplastischen und chronisch-entzündlichen Gewebe (normales Gewebe 45%; neoplastisches Gewebe 34%; chronisch-entzündliches Gewebe 29% [Abbildung 4.44.]). Im akut-entzündlichen Gewebe zeigte sich mit 17% die geringste Expression (Abbildung 4.44.). Beim Tubenepithel konnte ebenfalls eine Expression des Vimentins festgestellt werden (Abbildung 4.43.).

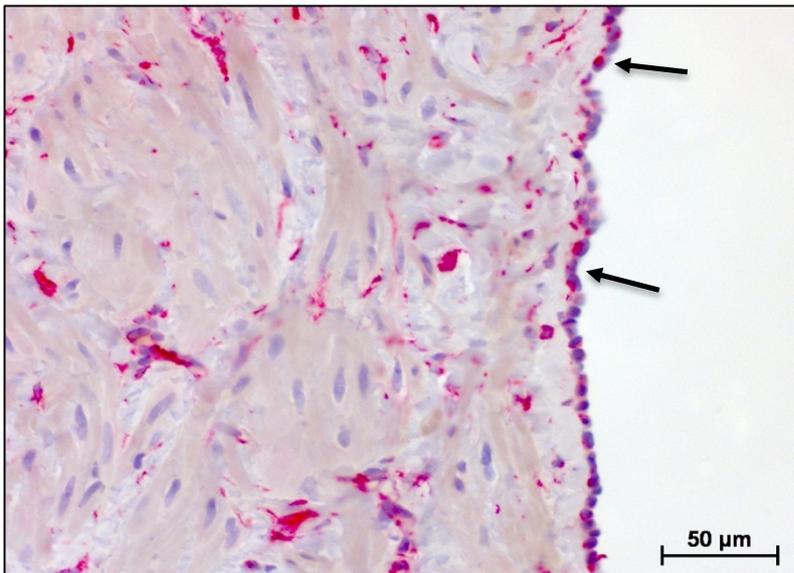


Abbildung 4.41.:

Immunhistochemische Färbung mit anti-Vimentin. Die Mehrheit der Mesothelzellen zeigen eine Expression des Vimentins (Pfeile).

Ergebnisse

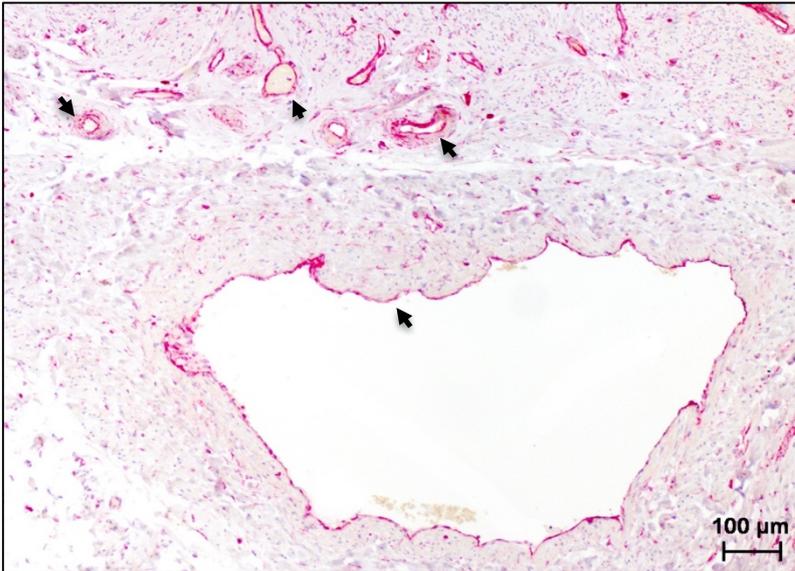


Abbildung 4.42.:

Immunohistochemische Färbung mit anti-Vimentin. Die Endothelzellen zeigen eine einheitlich mittelgradige Expression des Vimentins (Pfeilspitzen).

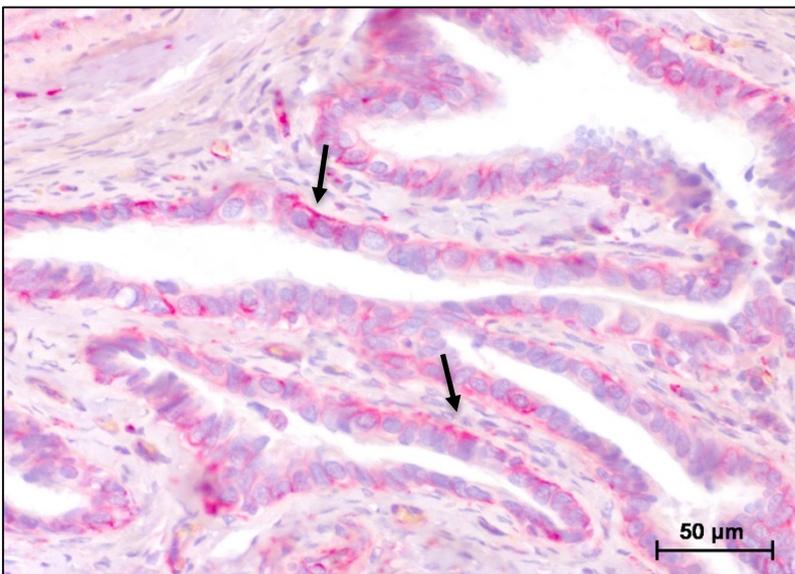


Abbildung 4.43.:

Immunohistochemische Färbung mit anti-Vimentin. Das Tubenepithel zeigt mehrheitlich auf der basalen Seite eine Expression des Vimentins (Pfeile).

Ergebnisse

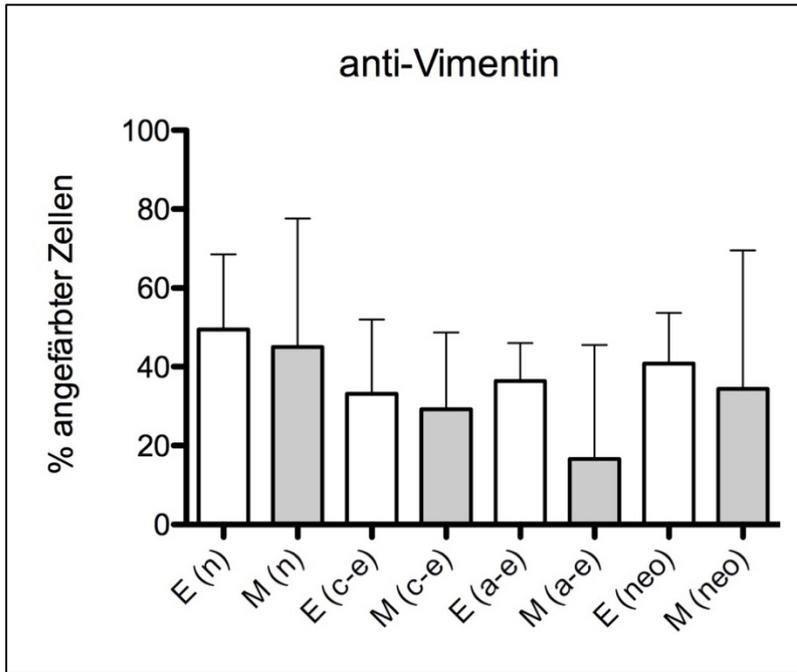


Abbildung 4.44.:

Vergleich der prozentual angefärbten Endothel- bzw. Mesothelzellen mit anti-Vimentin in den verschiedenen Gewebearten. E(n) = 49%; M(n) = 45%; E(c-e) = 33%; M(c-e) = 29%; E(a-e) = 36%; M(a-e) = 17%; E(neo) = 41%; M(neo) = 34%

3.13 Übersicht der verschiedenen Färbungen

Die folgenden zwei Diagramme, Abbildung 4.45. und 4.46., erlauben eine Übersicht hinsichtlich der Expression der Zelladhäsionsmoleküle und Intermediärfilamente im Endothel und Mesothel.

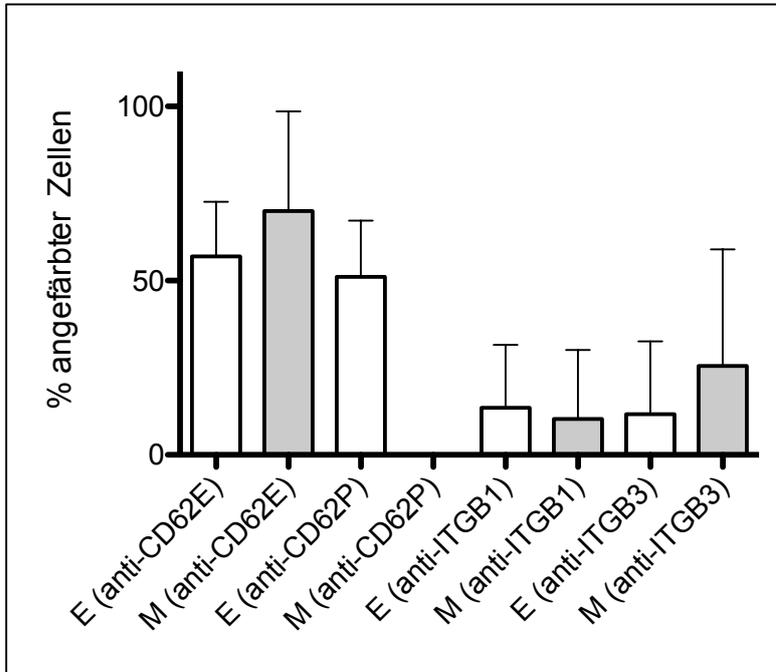


Abbildung 4.45.:

Vergleich der prozentualen Expression der verschiedenen Zelladhäsionsmoleküle in den Endothel- und Mesothelzellen.

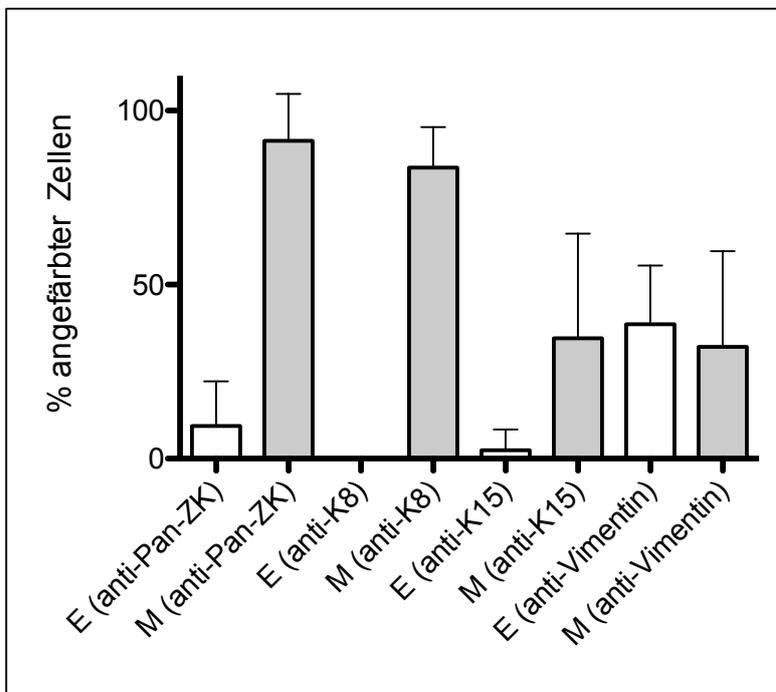


Abbildung 4.46.:

Vergleich der prozentualen Expression der verschiedenen Intermediärfilamente in den Endothel- und Mesothelzellen.

4 Diskussion

Sowohl die hämatogene als auch die peritoneale Metastasierung von Tumorzellen stellen einen hochkomplexen Vorgang dar, bei der die Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel bzw. an das Mesothel einen entscheidenden Schritt darstellt. In vielen Studien konnte eine Vielzahl von Zelladhäsionsmolekülen an den Endothelzellen identifiziert werden, die an der hämatogenen Metastasierung beteiligt sind. Dagegen haben sich bisher wenige Arbeiten mit der Expression von Zelladhäsionsmolekülen von Mesothelzellen und den molekularen Mechanismen der peritonealen Metastasierung auseinandergesetzt. In dieser Arbeit wurden mittels immunhistochemischer Verfahren Endothel- und Mesothelzellen hinsichtlich der Expression einer Vielzahl an Zelladhäsionsmoleküle untersucht und es konnte gezeigt werden, dass diese Zelltypen mehrere Gemeinsamkeiten in ihrer Zelladhäsionsausstattung aufweisen.

4.1 E-Selektin

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass im Rahmen der Metastasierung dem E-Selektin eine bedeutende Rolle zukommt. In mehreren Experimenten konnte gezeigt werden, dass der erste Schritt der Adhäsion durch das auf Endothelzellen befindliche E-Selektin vermittelt wird (Dimitroff et al., 2004, Burdick et al., 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Blockierung der Selektin-Liganden Interaktion die Tumorzelladhäsion und die Metastasierung einschränkte (Hosono et al., 1998, Nakashio et al., 1997b). Auch *in vivo* stellte sich beim Kolon-, Mamma- und beim kleinzelligen Bronchialkarzinom heraus, dass die Abwesenheit der E- und P-Selektine mit einem geringeren Metastasierungspotenzial in Verbindung stand (Kohler et al., 2010, Stubke et al., 2012, Heidemann et al., 2014). In der Arbeit von Stübke et al. (2012) wurden die Experimente zusätzlich zu Doppel-E- und P-Selektin-defizienten Mäusen an Einzel-Selektin-defizienten Mäusen durchgeführt. Die Anzahl der Lungenmetastasen in den E-Selektin-defizienten Mäusen war gegenüber den Wildtypmäusen geringer. Wohingegen bei den P-Selektin-defizienten Mäusen das Umgekehrte zu beobachten war.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die in den intraperitonealen Organen befindlichen Endothelzellen konstitutiv das E-Selektin exprimieren. Auch in den entnommenen Organen, in denen keine Entzündung vorlag, wiesen die Endothelzellen eine Expression des E-Selektins auf. Dieses Phänomen konnte auch auf nicht-aktivierten Endothelzellen von Venolen im Knochenmark und in der Haut beobachtet werden.

Diskussion

Normalerweise jedoch wird eine Expression des E-Selektins nur auf aktivierten Endothelzellen festgestellt, die zuvor mit Zytokinen (TNF- α , IL-1 oder bakterielle Lipopolysaccharide) behandelt worden waren (Bevilacqua et al., 1989, McEver, 2015, Bevilacqua and Nelson, 1993). In der immunhistochemischen Studie von Bittinger et al. (1998) sowie von Gebauer et al. (2013) konnte eine Expression des E-Selektins auch in resezierten Appendixes bzw. im Omentum majus festgestellt werden, die histologisch keinen Anhalt für eine Entzündung lieferten, so dass vermutlich eine konstitutive Expression des E-Selektins vorliegt.

Pankreaskarzinomzellen scheinen die Selektin-Liganden Interaktion bei der Implantierung peritonealer Metastasen zu nutzen (Gebauer et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass E- und P-Selektin-defiziente Mäuse weitaus weniger intraperitoneale Metastasen als die Kontrollmäuse vorwiesen. Zusätzlich zu der Expression von E-Selektin auf Endothelzellen, konnten diese immunhistochemisch auf peritonealen Mesothelzellen identifiziert werden. Auch auf einer Mesothel-Zelllinie konnte mittels Durchflusszytometrie eine konstitutive Expression des E-Selektins festgestellt werden. Die Ergebnisse von Gebauer et al. (2013) wurden hinsichtlich des E-Selektins durch diese Studie bestätigt. Es zeigte sich durchweg eine positive Immunreaktivität der Mesothelzellen mit einer mittelgradigen bis starken Intensität und einer Expression des E-Selektins bei über 50% der Mesothelzellen. Auch *in vitro* konnte eine Expression des E-Selektins auf Mesothelzellen festgestellt werden, diese wurde allerdings durch IL-1 β induziert (Klein et al., 1995). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von weiteren Versuchen, in denen keine Expression des E-Selektins auf Mesothelzellen gefunden werden konnte (Bittinger et al., 1998). In einer Arbeit wurden die Mesothel-Zellkulturen mit TNF und EGF behandelt, sodass man annehmen könnte, dass das Ergebnis aufgrund anderer verwendeter inflammatorischer Zytokine nicht erzielt wurde (Chung-Welch et al., 1997). Jedoch zeigten auch Mesothelzellen, die mit IL-1 β stimuliert wurden, keine Expression des E-Selektins, sodass der Grund der unterschiedlichen Ergebnisse unklar bleibt (Jonjic et al., 1992).

Eine grundlegende Beteiligung des E-Selektins an der Adhäsion der Tumorzellen an das Mesothel könnte erklären, warum in mehreren Studien die eingesetzten Antikörper gegen einige Zelladhäsionsmoleküle nicht zur vollständigen (Lessan et al., 1999, Strobel and Cannistra, 1999) bzw. zu gar keiner Blockierung der Adhäsion führten (Schlaeppli et al., 1997). So konnte *in vitro* die Adhäsion von Ovarialkarzinomzellen an eine Mesothelzellschicht durch die vorherige Behandlung der Tumorzellen mit einem anti-Integrin β 1 Antikörper bzw. einem anti-CD44 Antikörper nur zum Teil reduziert werden

Diskussion

(Lessan et al., 1999, Strobel and Cannistra, 1999). Bei vier Kolorektalkarzinom-Zelllinien kam es beim Einsatz von anti-Integrin Antikörpern und anti-CD44 Antikörpern zu gar keiner Verhinderung der Adhäsion an Mesothelzellen (Schlaepfi et al., 1997), sodass hierbei davon ausgegangen werden müsste, dass andere Zelladhäsionsmoleküle diese Rolle übernehmen. Viele Tumorzellen tragen auf ihrer Zelloberfläche die E-Selektin-Liganden sialyl Lewis^a und sialyl Lewis^x. Auch andere Karzinome, die häufig mit einer Peritonealkarzinose einhergehen wie beispielsweise das kolorektale Karzinom, das Pankreaskarzinom und das Ovarialkarzinom exprimieren die E-Selektin-Liganden sialyl Lewis^a und sialyl Lewis^x (Takada et al., 1993). Darüber hinaus konnte die Expression des sialyl Lewis^a und sialyl Lewis^x mit einer schlechteren Prognose beim kolorektalen Karzinom und beim Magenkarzinom assoziiert werden (Nakayama et al., 1995, Futamura et al., 2000), was auch für ihren Beitrag an der Metastasierung spricht. Beim Magenkarzinom konnte die Inzidenz peritonealer Metastasen nach potentiell kurativer chirurgischer Resektion nicht mit der Expression des sialyl Lewis^x in Zusammenhang gebracht werden (Futamura et al., 2000), wohingegen erhöhte präoperative Spiegel des Tumormarkers CA19-9, auch bekannt als sialyl Lewis^a-Antigen, als Risikofaktor für das gleichzeitige Vorhandensein einer Peritonealkarzinose bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom identifiziert werden konnte (Kaneko et al., 2017). Diese beiden zunächst widersprüchlich erscheinenden Befunde könnten darauf hindeuten, dass sialyl Lewis^a als Ligand für E-Selektin wichtiger ist als sialyl Lewis^x. Die Mausversuche von Gebauer et al. (2013) verdeutlichen, dass die E- und P-Selektine eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung der Peritonealkarzinose beim Pankreaskarzinom spielen. Um heraus zu finden in wie weit welches Selektin für die Adhäsion zuständig war, wurde das Experiment mit Mäusen wiederholt, in denen entweder das E- oder P-Selektin-Gen ausgeschaltet war, und mit den Wildtypmäusen verglichen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Tumorfläche zwischen den drei Gruppen, welches darauf hindeuten könnte, dass allein das gleichzeitige Ausschalten der Selektine die Tumorzellen an der Adhäsion hindert. Zudem konnte gezeigt werden, dass E- und P-Selektine bei der Implantierung von peritonealen Metastasen auch beim Ovarial- und Magenkarzinom von Bedeutung sind (unveröffentlichte Daten, persönliche Mitteilung D. Wicklein, C. Stürken). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass E- und P-Selektin-Liganden Interaktionen allgemein an der Ausbildung der Peritonealkarzinose beteiligt sind, unabhängig davon um welchen Primärtumor es sich handelt. Zudem könnte die konstitutive Expression von E-Selektin auf Mesothelzellen erklären, warum eine Peritonealkarzinose bei

manchen Tumorentitäten (z.B. beim Ovarialkarzinom) im Vergleich zur hämatogenen Metastasierung häufiger stattfindet.

4.2 P-Selektin

Das P-Selektin scheint auch an der Metastasierung beteiligt zu sein. Während das E-Selektin lediglich die Grundstruktur sialyl Lewis^a und sialyl Lewis^x benötigt um eine Bindung einzugehen, müssen die Kohlenhydratstrukturen beim P-Selektin an ein spezielles Trägerprotein gebunden sein. Meist wird dabei das PSGL-1 verwendet (Handa et al., 1995). Das P-Selektin ist in der Lage an Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten zu binden (Aruffo et al., 1992, Goetz et al., 1996). Es ist durch die Expression auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten und Endothelien über zwei Mechanismen an der Metastasierung involviert. Zum einen bilden Thrombozyten über das P-Selektin mit Tumorzellen in der Blutbahn Zellaggregate, die in der Mikrozirkulation hängenbleiben und durch die die Tumorzellen vom Immunsystem nicht erkannt werden (Borsig, 2008, Nash et al., 2002) und zum anderen ist das P-Selektin an der Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel beteiligt (Ludwig et al., 2004). Die Arbeit von Protratz et al. (1996) verdeutlicht eine P-Selektin-vermittelte Adhäsion der kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen an aktivierte Endothelzellen. *In vivo* Versuche an P-Selektin-defizienten Mäusen bzw. an doppelt E- und P-Selektin-defizienten Mäusen zeigten eine beschränkte Metastasenbildung beim Kolonkarzinom und beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (Kim et al., 1998, Heidemann et al., 2014, Kohler et al., 2010). In der vorgelegten Studie konnte immunhistochemisch die Expression des P-Selektins auf Endothelien gezeigt werden, die sich in intraperitonealen Organen befinden. In einem Präparat waren die Endothelien nicht gefärbt. Dagegen wiesen die Mesothelzellen keine Immunreaktivität auf. Diese Beobachtung entspricht denen einer experimentellen Studie, in der auch *in vitro* durch die Behandlung mit TNF- α und EGF das P-Selektin auf der Endothelzelloberfläche induziert werden konnte, jedoch nicht auf Mesothelzellen (Chung-Welch et al., 1997, Sendt et al., 2002). In einer anderen Arbeit konnte das P-Selektin immunhistochemisch auf peritonealen Mesothelzellen des Omentum majus sichtbar gemacht werden. In der untersuchten Mesothel-Zelllinie konnte eine Expression des P-Selektins zwar identifiziert werden, es wurden aber nur geringe Expressionsmengen gemessen (Gebauer et al., 2013).

4.3 Integrin $\beta 1$

In dieser Studie konnte das Integrin $\beta 1$ auf Endothelzellen in 10 von 29 Präparaten festgestellt werden. Zumeist zeigte sich eine schwache Intensität der Färbung, insgesamt waren im Mittel 33% der Endothelzellen angefärbt. Schon zuvor konnten *in vitro* Versuche zeigen, dass Integrin-Heterodimere, die das Integrin $\beta 1$ beinhalten, auf Endothelzellen vertreten waren (Albelda et al., 1989). Auch *in situ* war dies zu beobachten (Mechtersheimer et al., 1994, Brooks et al., 1994). Dabei machte es kaum einen Unterschied, ob es sich um große Gefäße handelte oder um Gefäße, die Teil der Mikrozirkulation waren (Luscinskas and Lawler, 1994).

Das Integrin $\beta 1$ scheint zudem bei der Ausbildung einer Peritonealkarzinose eine Rolle zu spielen. Das Integrin $\beta 1$ konnte auch auf mehreren Tumorentitäten identifiziert werden, die gehäuft mit einer Peritonealkarzinose vergesellschaftet sind, beispielsweise das Ovarialkarzinom, das Pankreaskarzinom und das Magenkarzinom (Lessan et al., 1999, Casey and Skubitz, 2000, Gardner et al., 1995, Nishimura et al., 1996, Strobel and Cannistra, 1999). Beim Vergleich zweier Magenkarzinom-Zelllinien, die sich in ihrem Potenzial unterschieden peritoneale Metastasen auszubilden, konnten die Integrin-Heterodimere $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$ vermehrt auf der Karzinomzelllinie gefunden werden, die in der Lage war eine Peritonealkarzinose auszubilden (Nishimura et al., 1996). Bei *in vitro* Adhäsionsversuchen zwischen Mesothelzellen und Magenkarzinom-Zellen konnte durch die vorherige Behandlung der Tumorzellen mit einem anti-Integrin $\beta 1$ Antikörper eine Reduzierung der Adhäsion erreicht werden (Nakashio et al., 1997a, Takatsuki et al., 2004). Dies konnte auch bei einer Ovarialkarzinom-Zelllinie sowie bei einer Pankreaskarzinomzelllinie beobachtet werden (Strobel and Cannistra, 1999, Hosono et al., 1998). Die Ovarialkarzinom-Zellen waren in der Lage über bestimmte Integrinrezeptoren, die das Integrin $\beta 1$ beinhalten, an die Extrazellulärmatrix-Proteine Fibronectin, Typ IV Kollagen und Laminin zu binden (Casey and Skubitz, 2000, Lessan et al., 1999). Auf einer untersuchten Mesothel-Zelllinie konnten die Extrazellulärmatrix-Proteine Fibronectin, Laminin und die Kollagene Typ I, III und IV identifiziert werden (Lessan et al., 1999). Dieses lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Integrin $\beta 1$ -ECM-Protein-Interaktion einen möglichen Mechanismus für die Adhäsion zwischen Tumorzellen und Mesothelzellen darstellt.

Denkbar ist jedoch auch, dass die Tumorzellen direkt an Extrazellulärmatrix-Proteine binden ohne die Mesothelzellschicht überwinden zu müssen. An einigen Stellen des Peritoneums konnte eine Diskontinuität der Mesothelzellschicht beobachtet werden, u.a. die so genannten

Diskussion

lymphatischen Stomata (Wang et al., 2010, Wilkosz et al., 2005). Durch die an diesen Stellen im Peritoneum frei liegenden Bestandteile der Extrazellulärmatrix wäre eine Adhäsion der Tumorzellen an das Peritoneum ebenso wie eine direkte Bindung zwischen Tumorzelle und Mesothelzelle möglich. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass größtenteils Integrinheterodimere auf Tumorzellen, die die $\beta 1$ -Untereinheit besitzen, diese Adhäsion vermitteln (Takatsuki et al., 2004, Casey and Skubitz, 2000, Kawamura et al., 2001).

Eine zentrale Rolle des Integrin $\beta 1$ bei der Peritonealkarzinose konnte auch *in vivo* durch die Verwendung von Antikörpern gezeigt werden. Die Applikation eines Antikörpers gegen das Integrin $\beta 1$ in Nacktmäusen, die vorher mit Magenkarzinom-Zellen beimpft worden waren, führte zu einer geringeren Anzahl an Tumorzellen auf dem Peritoneum (Kawamura et al., 2001). Auch die Ausbreitung der vorher injizierten Pankreaskarzinom-Zellen innerhalb der Peritonealhöhle konnte durch den Antikörper gegen das Integrin $\beta 1$ eingeschränkt werden und das Überleben der Nacktmäuse verlängert werden (Hosono et al., 1998, Nakashio et al., 1997a). Beim Ovarialkarzinom konnte durch einen anti- $\alpha 5\beta 1$ Antikörper die peritoneale Metastasierung ebenfalls größtenteils blockiert werden (Mitra et al., 2011).

In dieser Studie konnte *in situ* die Expression des Integrin $\beta 1$ auf Mesothelzellen in acht von 21 Präparaten gezeigt werden, dabei zeigten die Mesothelzellen mehrheitlich eine schwache Intensität der Immunreaktivität und im Mittel eine 38 prozentige Anfärbbarkeit der Mesothelzellen. *In vitro* Versuche an peritonealen Mesothelzellen von Ratten und Menschen hatten zuvor ergeben, dass eine Expression des Integrin $\beta 1$ auf Mesothelzellen identifiziert werden konnte (van Rossen et al., 2001, Gardner et al., 1995, Tietze et al., 1999). Dieses konnte anhand von Präparaten des Bauchperitoneums *in situ* bestätigt werden (Witz et al., 2000). Auch Mesothelzellen der Pleura waren mit dem Integrin $\beta 1$ ausgestattet, sodass es anzunehmen ist, dass diese Eigenschaft von allen Mesothelzellen, unabhängig von welcher Lokalisation, geteilt wird (Barth et al., 2002, Liaw et al., 2001). Die von Integrin $\beta 1$ -Rezeptoren erkennenden Extrazellulärmatrix-Proteine Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ IV konnten auf Ovarialkarzinomzellen identifiziert werden (Liebman et al., 1993). Ob eine Integrin $\beta 1$ vermittelte Interaktion zwischen Tumorzellen und Mesothelzellen auch möglich wäre, wenn sich das Integrin $\beta 1$ auf Mesothelzellen befindet, ist unklar. Dazu müssten erst einmal *in vitro* Versuche durchgeführt werden, in denen die Mesothelzellen anstatt die Tumorzellen vor der Zusammenführung mit Tumorzellen mit einem Antikörper gegen das Integrin $\beta 1$ inkubiert werden würden.

4.4 Integrin $\beta 3$

In dieser Arbeit wiesen acht von 20 Präparaten im Endothel eine Expression des Integrin $\beta 3$ auf. Dabei zeigten im Mittel 39% der Endothelzellen eine Immunreaktivität und die Intensität wurde größtenteils als schwach gewertet. Brooks et al. (1994) konnten *in situ* eine Expression des Integrins $\alpha V\beta 3$ auf Gefäßendothelzellen in Granulationsgewebe nachweisen. Endothelzellen in gesunder Haut zeigten dagegen keine Immunreaktivität. Auch Stupack und Cheresch (2002) zeigten *in vitro* das Vorhandensein dieses Integrins auf proliferierenden Endothelzellen, während ruhende Endothelzellen diese Eigenschaft nicht besaßen. Diese Ergebnisse konnten nur teilweise in dieser Studie bestätigt werden. Es zeigte sich in unterschiedlichen intraperitonealen Organen eine Expression des Integrin $\beta 3$ auf Endothelzellen. Dabei waren aber neben Endothelzellen, die in Beziehung mit inflammatorischen Prozessen standen, auch Endothelzellen innerhalb von Organen betroffen, die histologisch keinen Anhalt für eine Entzündung lieferten (Präparatnr. 1, 3, 4 und 5). In den ruhenden Endothelzellen der Mikrovaskulatur der Lunge sowie im Portalvenensystem der Leber konnte dieses Phänomen anhand von immunhistochemischen Verfahren auch in der Ratte beobachtet werden. In den Blutgefäßen von Gehirn, Skelettmuskel und Haut hingegen nicht (Singh et al., 2000). Auch auf ruhenden Endothelzellen humanen Ursprungs konnte das Integrin $\alpha V\beta 3$ detektiert werden (Luscinskas and Lawler, 1994). Diese kontroversen Ergebnisse könnten zum einen durch unterschiedliche Detektierungsverfahren und zum anderen durch die endotheliale Heterogenität erklärt werden (Geraud et al., 2014).

Auf den Mesothelzellen konnte bei der Hälfte (12 von 24) der Präparate eine Expression des Integrin $\beta 3$ festgestellt werden und es zeigten im Mittel 51% der Mesothelzellen eine Immunreaktivität. Die Intensität wurde als schwach bis mittelgradig gewertet. *In vitro* Versuche an Mesothel-Zelllinien und an frisch isolierten peritonealen Mesothelzellen konnten zuvor eine Expression dieses Integrins dokumentieren (Gardner et al., 1995, Tietze et al., 1999). Auch auf pleuralen Mesothelzellen konnte *in vitro* eine starke Expression identifiziert werden, die sich jedoch nicht *in situ* widerspiegelte (Liaw et al., 2001).

4.5 Integrin $\beta 4$

In dieser Arbeit konnte das Integrin $\beta 4$ nicht auf peritonealen Mesothelzellen detektiert werden. Diese *in situ* Ergebnisse bestätigen zuvor durchgeführte *in vitro* Versuche an

Mesothel-Zelllinien und an frisch isolierten peritonealen Mesothelzellen humanen Ursprungs (Gardner et al., 1995, Kettunen et al., 2005). Es konnte auch keine Expression des Integrin $\beta 4$ *in situ* auf normalen pleuralen Mesothelzellen festgestellt werden, während reaktiv veränderte Pleura eine schwache Immunreaktivität zeigte (Kettunen et al., 2005). Maligne veränderte Mesothelzellen wiesen dagegen eine stärkere Expression des Integrin $\beta 4$ auf (Kettunen et al., 2005, Giuffrida et al., 1999).

Auf Endothelzellen, die in intraperitoneal gelegenen Organen zu finden waren, konnte in dieser immunhistochemischen Studie ebenfalls keine Expression des Integrin $\beta 4$ festgestellt werden. Auf humanen tumorassoziierten Endothelzellen konnte *in situ* eine Expression dieses Integrins nachgewiesen werden (Nikolopoulos et al., 2004). In den Präparaten, in denen ein Karzinom miterfasst wurde, zeigte sich jedoch auch in dieser Arbeit keine Immunreaktivität in den angrenzenden Endothelzellen.

4.6 Zelladhäsionsmolekül L1

In dieser Studie konnte im Endothel keine Expression des L1CAM festgestellt werden. In einer anderen Studie konnte eine Expression in verschiedenen Endothel-Zelllinien gezeigt werden, diese konnte durch die Behandlung mit TNF- α hochreguliert werden. In derselben Arbeit konnte immunhistochemisch jedoch keine Expression des L1CAM auf der Oberfläche ruhender Endothelzellen sichtbar gemacht werden. Lediglich in Gefäßendothelzellen, die mit entzündlichen oder neoplastischen Vorgängen in Beziehung standen, konnte immunhistochemisch eine Expression nachgewiesen werden (Maddaluno et al., 2009). Eine Anreicherung des L1CAM in tumorassoziierten Endothelzellen konnte auch beim Pankreaskarzinom beobachtet werden (Issa et al., 2009). Diese Beobachtungen konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Auch auf Mesothelzellen konnte in dieser Studie keine Expression des L1CAM nachgewiesen werden. Zu diesem Ergebnis kamen ebenfalls Goode et al. (2017) mittels eines immunhistochemischen Verfahrens. Entartete Mesothelzellen waren hingegen positiv, so konnten beim malignen Mesotheliom eine Expression des L1CAM in 33 von 41 Tumoren gezeigt werden (Kettunen et al., 2005).

4.7 Zelladhäsionsmolekül CD44 und Hyaluronan

Eine Expression des CD44 auf Mesothelzellen konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden. Andere Studien hingegen konnten *in vitro* eine Expression des CD44 auf humanen Mesothelzellen zeigen (Chew et al., 2017, Yu et al., 2010, Gardner et al., 1995).

Diskussion

Mesothelzellen aus Ratten, die einen epithelähnlichen Phänotyp aufwiesen, waren für das Zelladhäsionsmolekül negativ. Eine Expression des CD44 konnte erst durch das EGF bzw. IL-1 β induziert werden (van Rossen et al., 2001, Koistinen et al., 2017). Nakamura et al. (2017) konnten *in situ* auf humanen Mesothelzellen im Omentum majus keine CD44-Expression feststellen. In Netzmetastasen von Ovarialkarzinomen fiel ihnen eine positive Immunreaktivität in den Mesothelzellen auf, die direkt mit den Tumorzellen in Beziehung standen. Weiter weg von den Tumorzellnestern lokalisierte Mesothelzellen zeigten keine Immunreaktivität.

Mesothelzellen sind in der Lage Hyaluronan zu sezernieren und diese in einer der Zelle umgebene Schicht perizellulär anzuordnen (Heldin and Pertoft, 1993, Jones et al., 1995). In dieser Studie konnte histochemisch kein Hyaluronan auf Mesothelzellen bzw. perizellulär sichtbar gemacht werden. Diese gegensätzlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich auf die Methodik zurückzuführen. Heldin und Pertoft (1993) bzw. Jones et al. (1995) konnten anhand von Partikelausschluss-Versuchen die Mesothelzellen umgebende Hyaluronanschicht visualisieren. Bereits 1968 nutzten Wissenschaftler ein ähnliches Verfahren, um bei Synovialzellen den perizellulären Mantel sichtbar zu machen. Durch immunhistochemische Verfahren gelang dieses nicht (Clarris and Fraser, 1968).

In dieser Arbeit konnte immunhistochemisch keine Expression des CD44 auf Endothelzellen festgestellt werden, die in intraperitonealen Organen lokalisiert sind. Zuvor hatten hingegen *in vitro* Experimente das Vorhandensein des CD44 auf der Oberfläche von einigen Endothelzelllinien nachgewiesen (Xu et al., 1994, Liesveld et al., 1994, Lokeshwar et al., 1996). Von einem Rind entnommene Endothelzellen zeigten eine Expression des CD44 (Lokeshwar et al., 1996). Auch auf Endothelzellen humanen Ursprungs der Mikrovaskulatur sowie der großen Gefäße war dies gegeben (Xu et al., 1994, Liesveld et al., 1994). Aufgrund der unterschiedlichen Gegebenheiten *in vitro* und *in vivo* sowie unterschiedlicher Detektierungsverfahren ist es schwer, die Ergebnisse zu vergleichen. Des Weiteren ist die endotheliale Heterogenität zu beachten, die beschreibt, dass sich Endothelzellen verschiedener Organe bzw. Gewebe und je nach Gefäßabschnitt hinsichtlich ihrer molekularen Eigenschaften unterscheiden. Es konnte durch Genexpressionsanalysen an Endothelzellen unterschiedlicher Organe gezeigt werden, dass unter anderem die Zelladhäsionsausstattung variiert (Nolan et al., 2013). So beschrieben Xu et al. (1994) eine geringe Expression des CD44 auf Endothelzellen der Mikrovaskulatur während die Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVEC) eine starke Expression aufwiesen. Darüber hinaus werden die gewebespezifischen Genexpressionsmuster maßgeblich durch das

Mikromilieu beeinflusst, so zeigten isolierte Endothelzellen *in vitro* im Vergleich zu den Bedingungen *in vivo* eine veränderte Genexpression (Lacorre et al., 2004, Amatschek et al., 2007). In der Arbeit von Savani et al. (2001) konnte das Vorhandensein des CD44 *in situ* in Endothelzellen der humanen Haut sowie *in vitro* gezeigt werden.

Luminal besitzen Endothelzellen eine hohe Glykokalyx. Hyaluronan ist Bestandteil dieser Glykokalyx (Reitsma et al., 2007). In dieser Arbeit konnte keine Expression des Hyaluronan auf Endothelzellen festgestellt werden. Diese widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich damit begründen, dass die Glykokalyx als delikate und durch immunhistochemische Verfahren als leicht zerstörbar gilt (Reitsma et al., 2007). Abgesehen vom Vorhandensein des Hyaluronan in der Endothelzelle assoziierten Glykokalyx, konnte diese auch durch die Behandlung mit proinflammatorischen Zytokinen auf der Oberfläche einiger Endothelzelllinien nachgewiesen werden. Die humane Endothel-Zelllinie zeigte diese Eigenschaft nicht (Mohamadzadeh et al., 1998). In der menschlichen Lunge konnte in Kapillarendothelzellen zwischen den Alveolen histochemisch eine Expression des Hyaluronan visualisiert werden. Diese zeigte sich jedoch nur auf wenigen Zellen (Richter et al., 2012).

4.8 Charakterisierung der Endothel- und Mesothelzellen anhand ausgewählter Intermediärfilamente

Das Endothel und das Mesothel entwickeln sich aus dem Seitenplattenmesoderm (Choi et al., 1998, Moore et al., 2013). Charakteristisch für Gewebe mesenchymalen Ursprungs ist das Intermediärfilament Vimentin (Welsch et al., 2014). In dieser Arbeit zeigten 25 von 28 Präparate im Endothel und 20 von 28 Präparate im Mesothel eine Immunreaktivität des Vimentins. Ähnliche Ergebnisse wurden in weiteren Studien erzielt. Schon zuvor konnte *in vitro* und *in situ* eine Expression des Vimentins in humanen peritonealen Mesothelzellen nachgewiesen werden (Czernobilsky et al., 1985, Zhang et al., 1999, Tietze et al., 1999). Auch Mesothelzellen der Pleura zeigen diese Eigenschaft (LaRocca and Rheinwald, 1984, Terada, 2011). Die Endothelzellen besitzen als Intermediärfilament typischerweise das Vimentin (Katagata et al., 2002, Evans, 1998)

Charakteristisch für Epithelien ist ihre Zytokeratinausstattung. Das zu den basischen Zytokeratinen gehörende Zytokeratin K8 ist in Zellen einschichtiger Epithelien zu finden (Moll et al., 1982, Owens and Lane, 2003). Konkordant dazu zeigte sich in dieser Arbeit in allen Präparaten eine Expression des Zytokeratin K8 in den Mesothelzellen. Auch weitere

Diskussion

Studien mit humanen peritonealen und pleuralen Mesothelzellen kamen zu diesem Ergebnis (Tietze et al., 1999, Zhang et al., 1999, Terada, 2011). Das Zytokeratin K8 konnte *in situ* in dieser immunhistochemischen Studie in keinem der Präparate im Endothel nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen damit die Ergebnisse der Arbeit von Miettinen et al. (2000). Maligne veränderte Endothelzellen im Sinne eines Angiosarkomas zeigten hingegen eine Immunreaktivität. Andere Arbeiten kamen wiederum zu gegenteiligen Resultaten. In Endothelzellen der Kornea konnte eine Expression des Zytokeratins K8 festgestellt werden (Merjava et al., 2009) und auch in kultivierten Endothelzellen der Mikrovaskulatur der Haut konnte *in vitro* durch Gelelektrophorese dieses Intermediärfilament nachgewiesen werden (Katagata et al., 2002). Die endotheliale Heterogenität, die zuvor im Abschnitt 4.7 diskutiert wurde, könnte ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse darstellen.

Das Zytokeratin K15 ist ein Vertreter der sauren Zytokeratine und typischerweise in den Basalzellen der Epidermis und anderen mehrschichtigen Plattenepithelien anzutreffen (Moll et al., 1993, Lloyd et al., 1995). Mit dieser Arbeit konnte erstmals dieses Zytokeratin anhand von immunhistochemischen Verfahren in peritonealen Mesothelzellen und zu geringem Maße auch in Endothelzellen sichtbar gemacht werden. Während die Mehrheit der Präparate (18 von 26) im Mesothel eine positive Immunreaktivität zeigten, waren lediglich vier von 29 Präparate im Endothel positiv.

In dieser Arbeit konnten erstmals Parallelen und Unterschiede zwischen Endothel- und Mesothelzellen humanen Ursprungs hinsichtlich der Expression von acht Zelladhäsionsmolekülen, die eine Schlüsselrolle im Rahmen der hämatogenen Metastasierung aufweisen konnten, identifiziert werden. Dabei zeigten beide Zelltypen eine Expression des E-Selektins, des Integrins $\beta 1$ sowie des Integrins $\beta 3$. Keine Expression zeigte sich hingegen für das Integrin $\beta 4$, das L1CAM, das CD44 und das Hyaluronan. Das P-Selektin zeigte lediglich eine Immunreaktivität auf den Endothelzellen.

Beide Zelltypen zeigten eine hohe Expression des E-Selektins, wobei auf den Mesothelzellen der prozentuale Anteil höher ausfiel. Dabei machte es bei den Endothelzellen kaum einen Unterschied, ob es sich hierbei um normales, entzündliches oder neoplastisches Gewebe handelte. Im normalen Gewebe zeigte sich ein höherer prozentuale Anteil E-Selektin exprimierender Mesothelzellen, während der Anteil im entzündlichen und neoplastischen Gewebe ähnlich hoch ausfiel. Es zeigte sich grundsätzlich eine geringe Expression des Integrins $\beta 1$ auf beiden Zelltypen, wobei die Endothelzellen im neoplastischen Gewebe und die Mesothelzellen im normalen Gewebe mit ca. einem Viertel

Diskussion

Anteil die höchste Immunreaktivität zeigten. Hinsichtlich des Integrins $\beta 3$ konnten vor allem die Endothel- und Mesothelzellen im normalen Gewebe eine Expression vorweisen. Im entzündlichen und neoplastischen Gewebe zeigte sich kaum eine Expression des Integrins $\beta 3$ auf den beiden Zelltypen.

Die Intermediärfilamente Pan-Zytokeratin, Zytokeratin K15 und das Vimentin zeigten im Endothel und Mesothel eine Immunreaktivität, wobei der prozentuale Anteil beim Pan-Zytokeratin und Zytokeratin K15 im Endothel sehr viel geringer als beim Mesothel ausfiel. Das Zytokeratin K8 wies lediglich eine Expression in den Mesothelzellen auf. Somit stellt dieses Intermediärfilament einen geeigneten Marker zur Unterscheidung zwischen Endothel- und Mesothelzellen dar.

Zusammenfassend wird anhand dieser Studie deutlich, dass Endothel- und Mesothelzellen hinsichtlich ihrer Zelladhäsionsausstattung viele Gemeinsamkeiten aufweisen. Von insgesamt acht Zelladhäsionsmolekülen zeigten sieben ein ähnliches Expressionsprofil auf den genannten Zelltypen. Einen prägnanten Unterschied stellte das P-Selektin dar, welches lediglich auf den Endothelzellen exprimiert wurde. Die verschiedenen Gewebearten betrachtend, konnte vorrangig im normalen Gewebe eine höhere Expression erzielt werden. Zu berücksichtigen ist bei den Ergebnissen jedoch, dass insgesamt die Zahl der untersuchten Gewebeprobe relativ klein war, sodass weitere Studien notwendig wären, um die Ergebnisse zu verifizieren. Weiterhin sollte das Mesothel und die untersuchten Zelladhäsionsmoleküle Gegenstand zukünftiger Studien sein um die molekularen Mechanismen der Peritonealkarzinose zu klären.

5 Zusammenfassung

Mehrere Zelladhäsionsmoleküle stehen aufgrund ihrer zentralen Rolle im Rahmen der Tumorprogression und Metastasierung im Fokus der Forschung. Während eine Vielzahl an Zelladhäsionsmolekülen hinsichtlich der hämatogenen Metastasierung untersucht worden sind, liegen noch wenige Daten zur Expression dieser Moleküle im Mesothel des Peritoneums vor, die eine entscheidende Rolle bei der Peritonealkarzinose spielen dürften. In der vorgelegten Arbeit sollte anhand eines immunhistochemischen Verfahrens die Endothel- und Mesothelzellen in 29 humanen Gewebeproben auf ihre exprimierenden Zelladhäsionsmoleküle hin untersucht werden. Weiterhin wurde vor dem Hintergrund, dass Endothel- und Mesothelzellen mesenchymalen Ursprungs sind, eine Charakterisierung dieser Zelltypen anhand von ausgewählten Intermediärfilamenten vorgenommen.

Das E-Selektin konnte mit hoher Expression auf den untersuchten Endothel- und Mesothelzellen im normalen, entzündlichen und neoplastischen Gewebe dargestellt werden, wobei auf den Mesothelzellen ein höherer prozentualer Anteil erzielt wurde. Auf beiden Zelltypen zeigte sich hinsichtlich des Integrin $\beta 1$ eine geringe Immunreaktivität. Das Integrin $\beta 3$ zeigte in beiden Zelltypen die höchste Expression im normalen Gewebe, während in den anderen Gewebearten die Immunreaktivität sehr gering ausfiel. Das Integrin $\beta 4$, das L1CAM, das CD44 und Hyaluronan konnte in dieser Arbeit nicht auf den genannten Zelltypen nachgewiesen werden. Hinsichtlich des P-Selektins konnte lediglich eine Expression im Endothel dargestellt werden.

Die Mesothelzellen exprimierten die Intermediärfilamente Vimentin, das Zytokeratin K8 und K15. Die Endothelzellen zeigten hingegen nur eine positive Immunreaktivität für das Vimentin und zu geringen Maße für das Zytokeratin K15. Somit könnte das Zytokeratin K8 als Marker zur Unterscheidung zwischen den beiden Zelltypen dienen.

In Anbetracht dieser Ergebnisse und auch anderer Studien haben Endothel- und Mesothelzellen viele gemeinsame Eigenschaften und Funktionen und sind grundlegend an der Metastasierung beteiligt. Das E-Selektin scheint im Allgemeinen neben seiner Funktion im Rahmen der hämatogenen Metastasierung auch eine Schlüsselrolle bei der Peritonealkarzinose zu spielen.

6 Abstract

Several cell adhesion molecules play an essential role in tumor progression and metastasis formation and are therefore of crucial interest. The function of cell adhesion molecules in hematogenous metastases were part of numerous research studies, but little is known about the expression of these molecules in the peritoneum and also about their role in peritoneal carcinomatosis. In this study, endothelial and mesothelial cells in 29 human tissues were analyzed for their expression of several cell adhesion molecules. In addition, the endothelial and mesothelial cells were characterized by their expressing intermediate filaments.

There was a high expression of E-selectin on the endothelial and mesothelial cells in normal, inflamed and neoplastic tissue but the percentage was higher on the mesothelial cells. In contrast, there was a low immunoreactivity of integrin $\beta 1$ on both cell types. Integrin $\beta 3$ showed a low expression on both cell types in inflamed and neoplastic tissue, but had a higher presence on endothelial and mesothelial cells of normal tissue. There was no expression of integrin $\beta 4$, L1CAM, CD44 and hyaluronan on endothelial and mesothelial cells in this study. P-selectin showed just an immunoreactivity on endothelial cells.

Vimentin, cytokeratin K8 and cytokeratin K15 were expressed in mesothelial cells while endothelial cells showed just an immunoreactivity for vimentin and a partial immunoreactivity for cytokeratin K15. Thus, cytokeratin K8 might be useful to distinguish both cell types.

Considering these results and other studies, endothelial and mesothelial cells share many characteristics and functions and are essential in metastasis formation. Besides its function in hematogenous metastases, E-selectin seems to also play an essential role in peritoneal carcinomatosis.

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
ABC	Avidin-Biotin-Complex
a-e	Akut-entzündlich
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
CA19-9	Cancer antigen 19-9
c-e	Chronisch-entzündlich
CD44v	CD44 Varianten
CD62E	E-Selektin
CD62P	P-Selektin
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
E	Endothel
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
ECM	Extrazellulärmatrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
g	Gramm
G1-3	Grading 1-3
h	Stunde
HA	Hyaluronan (hyaluronic acid)
HABP	Hyaluronan bindendes Protein (hyaluronic acid binding protein)
HIPEC	Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül-1 (Intercellular cell adhesion molecule-1)
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL-1β	Interleukin-1β
ITGB1,3,4	Integrin β1,3,4
L	Liter
L1CAM	L1 Zelladhäsionsmolekül (L1 cell adhesion molecule)
M	Mesothel
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mMol	Millimol
mRNA	Messenger RNA
n	Normal
N-Cadherin	Neurales Cadherin
neo	Neoplastisch
nm	Nanometer
Nr	Nummer
PECAM-1	(Blut-)Plättchen-Endotheliales Zelladhäsionsmolekül 1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1)
pH	Potentia hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1)
sec	Sekunden
siRNA	Small interfering RNA
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Tween
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (Vascular cell adhesion molecule-1)

8 Literaturverzeichnis

- ABADIER, M. & LEY, K. 2017. P-selectin glycoprotein ligand-1 in T cells. *Curr Opin Hematol*, 24, 265-273.
- AL-SAAD, S., AL-SHIBLI, K., DONNEM, T., PERSSON, M., BREMNES, R. M. & BUSUND, L. T. 2008. The prognostic impact of NF-kappaB p105, vimentin, E-cadherin and Par6 expression in epithelial and stromal compartment in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, 99, 1476-83.
- ALBELDA, S. M., DAISE, M., LEVINE, E. M. & BUCK, C. A. 1989. Identification and characterization of cell-substratum adhesion receptors on cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*, 83, 1992-2002.
- ALPHONSUS, C. S. & RODSETH, R. N. 2014. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia*, 69, 777-84.
- AMATSCHEK, S., KRIEHLER, E., BAUER, W., REININGER, B., MERANER, P., WOLPL, A., SCHWEIFER, N., HASLINGER, C., STINGL, G. & MAURER, D. 2007. Blood and lymphatic endothelial cell-specific differentiation programs are stringently controlled by the tissue environment. *Blood*, 109, 4777-85.
- ANGST, B. D., MARCOZZI, C. & MAGEE, A. I. 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci*, 114, 629-41.
- APLIN, A. E., HOWE, A., ALAHARI, S. K. & JULIANO, R. L. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*, 50, 197-263.
- ARUFFO, A., DIETSCH, M. T., WAN, H., HELLSTROM, K. E. & HELLSTROM, I. 1992. Granule membrane protein 140 (GMP140) binds to carcinomas and carcinoma-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2292-6.
- AUVINEN, P., TAMMI, R., PARKKINEN, J., TAMMI, M., AGREN, U., JOHANSSON, R., HIRVIKOSKI, P., ESKELINEN, M. & KOSMA, V. M. 2000. Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *Am J Pathol*, 156, 529-36.
- BARCZYK, M., CARRACEDO, S. & GULLBERG, D. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res*, 339, 269-80.
- BARTH, T. F., RINALDI, N., BRUDERLEIN, S., MECHTERSHEIMER, G., STRATER, J., ALTEVOGT, P. & MOLLER, P. 2002. Mesothelial cells in suspension expose an enriched integrin repertoire capable of capturing soluble fibronectin and laminin. *Cell Commun Adhes*, 9, 1-14.
- BASBUG, M., AYGEN, E., TAYYAR, M., KAYA, E., NARIN, F. & OKTEM, O. 1998. Hyaluronic acid plus heparin for improved efficacy in prevention of adhesion formation in rat uterine horn model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 78, 109-12.
- BASKARANATHAN, S., PHILIPS, J., MCCREDDEN, P. & SOLOMON, M. J. 2004. Free colorectal cancer cells on the peritoneal surface: correlation with pathologic variables and survival. *Dis Colon Rectum*, 47, 2076-9.
- BEER, S., OLESZEWSKI, M., GUTWEIN, P., GEIGER, C. & ALTEVOGT, P. 1999. Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J Cell Sci*, 112 (Pt 16), 2667-75.
- BEN, Q. W., WANG, J. C., LIU, J., ZHU, Y., YUAN, F., YAO, W. Y. & YUAN, Y. Z. 2010. Positive expression of L1-CAM is associated with perineural invasion and poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*, 17, 2213-21.

- BERG, E. L., ROBINSON, M. K., MANSSON, O., BUTCHER, E. C. & MAGNANI, J. L. 1991. A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J Biol Chem*, 266, 14869-72.
- BEVILACQUA, M. P. & NELSON, R. M. 1993. Selectins. *J Clin Invest*, 91, 379-87.
- BEVILACQUA, M. P., POBER, J. S., MENDRICK, D. L., COTRAN, R. S. & GIMBRONE, M. A., JR. 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 9238-42.
- BEVILACQUA, M. P., STENGELIN, S., GIMBRONE, M. A., JR. & SEED, B. 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, 243, 1160-5.
- BIRD, M. I., FOSTER, M. R., PRIEST, R. & MALHOTRA, R. 1997. Selectins: physiological and pathophysiological roles. *Biochem Soc Trans*, 25, 1199-206.
- BITTINGER, F., BROCHHAUSEN, C., KOHLER, H., LEHR, H. A., OTTO, M., SKARKE, C., WALGENBACH, S. & KIRKPATRICK, C. J. 1998. Differential expression of cell adhesion molecules in inflamed appendix: correlation with clinical stage. *J Pathol*, 186, 422-8.
- BITTINGER, F., KLEIN, C. L., SKARKE, C., BROCHHAUSEN, C., WALGENBACH, S., ROHRIG, O., KOHLER, H. & KIRKPATRICK, C. J. 1996. PECAM-1 expression in human mesothelial cells: an in vitro study. *Pathobiology*, 64, 320-7.
- BLOOD, C. H. & ZETTER, B. R. 1990. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 1032, 89-118.
- BOFFETTA, P. 2007. Epidemiology of peritoneal mesothelioma: a review. *Ann Oncol*, 18, 985-90.
- BOGENRIEDER, T. & HERLYN, M. 2003. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene*, 22, 6524-36.
- BOHM, J., NISKANEN, L., TAMMI, R., TAMMI, M., ESKELINEN, M., PIRINEN, R., HOLLMEN, S., ALHAVA, E. & KOSMA, V. M. 2002. Hyaluronan expression in differentiated thyroid carcinoma. *J Pathol*, 196, 180-5.
- BORLAND, G., ROSS, J. A. & GUY, K. 1998. Forms and functions of CD44. *Immunology*, 93, 139-48.
- BORSIG, L. 2008. The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther*, 8, 1247-55.
- BROOKS, P. C., CLARK, R. A. & CHERESH, D. A. 1994. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, 264, 569-71.
- BRUMMENDORF, T., KENWRICK, S. & RATHJEN, F. G. 1998. Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr Opin Neurobiol*, 8, 87-97.
- BRUMMENDORF, T. & RATHJEN, F. G. 1996. Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol*, 6, 584-93.
- BURDICK, M. M., MCCAFFERY, J. M., KIM, Y. S., BOCHNER, B. S. & KONSTANTOPOULOS, K. 2003. Colon carcinoma cell glycolipids, integrins, and other glycoproteins mediate adhesion to HUVECs under flow. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, C977-87.
- CANNISTRA, S. A., KANSAS, G. S., NILOFF, J., DEFRANZO, B., KIM, Y. & OTTENSMEIER, C. 1993. Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H. *Cancer Res*, 53, 3830-8.
- CANNISTRA, S. A., OTTENSMEIER, C., TIDY, J. & DEFRANZO, B. 1994. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by peritoneal mesothelium partly mediates the binding of activated human T lymphocytes. *Exp Hematol*, 22, 996-1002.

- CASEY, R. C. & SKUBITZ, A. P. 2000. CD44 and beta1 integrins mediate ovarian carcinoma cell migration toward extracellular matrix proteins. *Clin Exp Metastasis*, 18, 67-75.
- CAVALLARO, U. & CHRISTOFORI, G. 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4, 118-32.
- CEELEN, W. P. & BRACKE, M. E. 2009. Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *Lancet Oncol*, 10, 72-9.
- CEELEN, WIM P. 2007. Peritoneal Carcinomatosis: A Multidisciplinary Approach., Springer, New York, Part 1.7, 119, ISBN-13 978-0-387-48991-9.
- CHAMBERS, A. F., GROOM, A. C. & MACDONALD, I. C. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2, 563-72.
- CHAMBERS, A. F. & MATRISIAN, L. M. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 89, 1260-70.
- CHEN, D. L., ZENG, Z. L., YANG, J., REN, C., WANG, D. S., WU, W. J. & XU, R. H. 2013. L1cam promotes tumor progression and metastasis and is an independent unfavorable prognostic factor in gastric cancer. *J Hematol Oncol*, 6, 43.
- CHEW, S. H., OKAZAKI, Y., AKATSUKA, S., WANG, S., JIANG, L., OHARA, Y., ITO, F., SAYA, H., SEKIDO, Y. & TOYOKUNI, S. 2017. Rheostatic CD44 isoform expression and its association with oxidative stress in human malignant mesothelioma. *Free Radic Biol Med*, 106, 91-99.
- CHOI, K., KENNEDY, M., KAZAROV, A., PAPADIMITRIOU, J. C. & KELLER, G. 1998. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, 125, 725-32.
- CHRISTOFORI, G. 2006. New signals from the invasive front. *Nature*, 441, 444-50.
- CHU, P. G. & WEISS, L. M. 2002. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*, 40, 403-39.
- CHUNG-WELCH, N., PATTON, W. F., SHEPRO, D. & CAMBRIA, R. P. 1997. Human omental microvascular endothelial and mesothelial cells: characterization of two distinct mesodermally derived epithelial cells. *Microvasc Res*, 54, 108-20.
- CLARRIS, B. J. & FRASER, J. R. 1968. On the pericellular zone of some mammalian cells in vitro. *Exp Cell Res*, 49, 181-93.
- COUSSENS, L. M. & WERB, Z. 1996. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol*, 3, 895-904.
- CZERNOBILSKY, B., MOLL, R., LEVY, R. & FRANKE, W. W. 1985. Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary. *Eur J Cell Biol*, 37, 175-90.
- DAY, A. J. & PRESTWICH, G. D. 2002. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J Biol Chem*, 277, 4585-8.
- DE MARZO, A. M., BRADSHAW, C., SAUVAGEOT, J., EPSTEIN, J. I. & MILLER, G. J. 1998. CD44 and CD44v6 downregulation in clinical prostatic carcinoma: relation to Gleason grade and cytoarchitecture. *Prostate*, 34, 162-8.
- DEBIEC, H., CHRISTENSEN, E. I. & RONCO, P. M. 1998. The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *J Cell Biol*, 143, 2067-79.
- DEGRENDELE, H. C., ESTESS, P. & SIEGELMAN, M. H. 1997. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science*, 278, 672-5.
- DESGROSELLIER, J. S. & CHERESH, D. A. 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 10, 9-22.
- DIMITROFF, C. J., LECHPAMMER, M., LONG-WOODWARD, D. & KUTOK, J. L. 2004. Rolling of human bone-metastatic prostate tumor cells on human bone marrow endothelium under shear flow is mediated by E-selectin. *Cancer Res*, 64, 5261-9.

- DIMITROFF, C. J., LEE, J. Y., RAFII, S., FUHLBRIGGE, R. C. & SACKSTEIN, R. 2001. CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. *J Cell Biol*, 153, 1277-86.
- DOBERSTEIN, K., WIELAND, A., LEE, S. B., BLAHETA, R. A., WEDEL, S., MOCH, H., SCHRAML, P., PFEILSCHIFTER, J., KRISTIENSEN, G. & GUTWEIN, P. 2011. L1-CAM expression in ccRCC correlates with shorter patients survival times and confers chemoresistance in renal cell carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 32, 262-70.
- DOMAGALA, W., LASOTA, J., BARTKOWIAK, J., WEBER, K. & OSBORN, M. 1990. Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction. *Am J Pathol*, 136, 219-27.
- ERICKSON, M. & STERN, R. 2012. Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. *Biochem Res Int*, 2012, 893947.
- EVANS, R. M. 1998. Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. *Bioessays*, 20, 79-86.
- FANG, Q. X., LU, L. Z., YANG, B., ZHAO, Z. S., WU, Y. & ZHENG, X. C. 2010. L1, beta-catenin, and E-cadherin expression in patients with colorectal cancer: correlation with clinicopathologic features and its prognostic significance. *J Surg Oncol*, 102, 433-42.
- FEDI, P., TRONICK, S.R. AND AARONSON, S.A. 1997. Growth factors. in: J.F Holland, R.C Bast, D.L Morton, E Frei, D.W Kufe, R.R Weichselbaum (Eds.) *Cancer Medicine*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- FERRANDEZ-IZQUIERDO, A., NAVARRO-FOS, S., GONZALEZ-DEVESA, M., GILBENSO, R. & LLOMBART-BOSCH, A. 1994. Immunocytochemical typification of mesothelial cells in effusions: in vivo and in vitro models. *Diagn Cytopathol*, 10, 256-62.
- FIDLER, I. J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3, 453-8.
- FOGEL, M., GUTWEIN, P., MECHTERSHEIMER, S., RIEDLE, S., STOECK, A., SMIRNOV, A., EDLER, L., BEN-ARIE, A., HUSZAR, M. & ALTEVOGT, P. 2003. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet*, 362, 869-75.
- FOX, S. B., FAWCETT, J., JACKSON, D. G., COLLINS, I., GATTER, K. C., HARRIS, A. L., GEARING, A. & SIMMONS, D. L. 1994. Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res*, 54, 4539-46.
- FRANKE, W. W., SCHILLER, D. L., MOLL, R., WINTER, S., SCHMID, E., ENGELBRECHT, I., DENK, H., KREPLER, R. & PLATZER, B. 1981. Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J Mol Biol*, 153, 933-59.
- FUCHS, E. & WEBER, K. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 63, 345-82.
- FUTAMURA, N., NAKAMURA, S., TATEMATSU, M., YAMAMURA, Y., KANNAGI, R. & HIROSE, H. 2000. Clinicopathologic significance of sialyl Le(x) expression in advanced gastric carcinoma. *Br J Cancer*, 83, 1681-7.
- GAO, A. C., LOU, W., DONG, J. T. & ISAACS, J. T. 1997. CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res*, 57, 846-9.
- GARDNER, M. J., JONES, L. M., CATTERALL, J. B. & TURNER, G. A. 1995. Expression of cell adhesion molecules on ovarian tumour cell lines and mesothelial cells, in relation to ovarian cancer metastasis. *Cancer Lett*, 91, 229-34.

- GEBAUER, F., WICKLEIN, D., STUBKE, K., NEHMANN, N., SCHMIDT, A., SALAMON, J., PELDSCHUS, K., NENTWICH, M. F., ADAM, G., TOLSTONOG, G., BOCKHORN, M., IZBICKI, J. R., WAGENER, C. & SCHUMACHER, U. 2013. Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp⁻/rag2⁻ mice. *Gut*, 62, 741-50.
- GENG, J. G., BEVILACQUA, M. P., MOORE, K. L., MCINTYRE, T. M., PRESCOTT, S. M., KIM, J. M., BLISS, G. A., ZIMMERMAN, G. A. & MCEVER, R. P. 1990. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature*, 343, 757-60.
- GERAUD, C., KOCH, P. S. & GOERDT, S. 2014. Vascular niches: endothelial cells as tissue- and site-specific multifunctional team players in health and disease. *J Dtsch Dermatol Ges*, 12, 685-9.
- GILL, R. S., AL-ADRA, D. P., NAGENDRAN, J., CAMPBELL, S., SHI, X., HAASE, E. & SCHILLER, D. 2011. Treatment of gastric cancer with peritoneal carcinomatosis by cytoreductive surgery and HIPEC: a systematic review of survival, mortality, and morbidity. *J Surg Oncol*, 104, 692-8.
- GIUFFRIDA, A., VIANALE, G., DI MUZIO, M., PASS, H. I., COLETTI, A., BIRARELLI, P., PROCOPIO, A. & MODESTI, A. 1999. Modulation of integrin expression on mesotheliomas: the role of different histotypes in invasiveness. *Int J Oncol*, 15, 437-42.
- GIUNTOLI, R. L., 2ND, WEBB, T. J., ZOSO, A., ROGERS, O., DIAZ-MONTES, T. P., BRISTOW, R. E. & OELKE, M. 2009. Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. *Anticancer Res*, 29, 2875-84.
- GOETZ, D. J., DING, H., ATKINSON, W. J., VACHINO, G., CAMPHAUSEN, R. T., CUMMING, D. A. & LUSCINSKAS, F. W. 1996. A human colon carcinoma cell line exhibits adhesive interactions with P-selectin under fluid flow via a PSGL-1-independent mechanism. *Am J Pathol*, 149, 1661-73.
- GOODE, B., JOSEPH, N. M., STEVERS, M., VAN ZIFFLE, J., ONODERA, C., TALEVICH, E., GRENER, J. P., YEH, I., BASTIAN, B. C., PHILLIPS, J. J., GARG, K., RABBAN, J. T., ZALOUDEK, C. & SOLOMON, D. A. 2017. Adenomatoid tumors of the male and female genital tract are defined by TRAF7 mutations that drive aberrant NF- κ B pathway activation. *Mod Pathol*.
- GUNTHER, U., SCHWARZLER, C., WITTIG, B., LAMAN, J., RUIZ, P., STAUDER, R., BLOEM, A., SMADJA-JOFFE, F., ZOLLER, M. & ROLINK, A. 1998. Functional involvement of CD44, a family of cell adhesion molecules, in immune responses, tumour progression and haematopoiesis. *Adv Exp Med Biol*, 451, 43-9.
- HANDA, K., WHITE, T., ITO, K., FANG, H., WANG, S. & HAKOMORI, S. 1995. P-selectin-dependent adhesion of human cancer-cells - requirement for coexpression of a psgl-1-like core protein and the glycosylation process for sialosyl-le(x) or sialosyl-le(a). *Int J Oncol*, 6, 773-81.
- HARRIS, A. L. 2002. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2, 38-47.
- HAUSMANN, M. J., ROGACHEV, B., WEILER, M., CHAIMOVITZ, C. & DOUVDEVANI, A. 2000. Accessory role of human peritoneal mesothelial cells in antigen presentation and T-cell growth. *Kidney Int*, 57, 476-86.
- HEIDEMANN, F., SCHILDT, A., SCHMID, K., BRUNS, O. T., RIECKEN, K., JUNG, C., ITTRICH, H., WICKLEIN, D., REIMER, R., FEHSE, B., HEEREN, J., LUERS, G., SCHUMACHER, U. & HEINE, M. 2014. Selectins mediate small cell lung cancer systemic metastasis. *PLoS One*, 9, e92327.

- HELDIN, P. & PERTOFT, H. 1993. Synthesis and assembly of the hyaluronan-containing coats around normal human mesothelial cells. *Exp Cell Res*, 208, 422-9.
- HEMLER ME. 1999. Integrins. In: Kreis, T., Vale, R. Guidebook to the extracellular matrix, anchor and adhesion proteins. Springer, Niederlande, 196–212.
- HERRON, L. R., HILL, M., DAVEY, F. & GUNN-MOORE, F. J. 2009. The intracellular interactions of the L1 family of cell adhesion molecules. *Biochem J*, 419, 519-31.
- HEYSE, T. J., MALCHERCZYK, D., MOLL, R., TIMMESFELD, N., WAPELHORST, J., FUCHS-WINKELMANN, S., PALETTA, J. R. & SCHOFER, M. D. 2010. CD44: survival and metastasis in chondrosarcoma. *Osteoarthritis Cartilage*, 18, 849-56.
- HOLMDAHL, L. 1997. The role of fibrinolysis in adhesion formation. *Eur J Surg Suppl*, 24-31.
- HOSONO, J., NARITA, T., KIMURA, N., SATO, M., NAKASHIO, T., KASAI, Y., NONAMI, T., NAKAO, A., TAKAGI, H. & KANNAGI, R. 1998. Involvement of adhesion molecules in metastasis of SW1990, human pancreatic cancer cells. *J Surg Oncol*, 67, 77-84.
- HUMPHRIES, J. D., BYRON, A. & HUMPHRIES, M. J. 2006. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, 119, 3901-3.
- HYNES, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.
- HYNES, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-87.
- ISSA, Y., NUMMER, D., SEIBEL, T., MUERKOSTER, S. S., KOCH, M., SCHMITZ-WINNENTHAL, F. H., GALINDO, L., WEITZ, J., BECKHOVE, P. & ALTEVOGT, P. 2009. Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration. *J Mol Med (Berl)*, 87, 99-112.
- ITANO, N. & KIMATA, K. 2002. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life*, 54, 195-9.
- JAYNE, D. G., FOOK, S., LOI, C. & SEOW-CHOEN, F. 2002. Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg*, 89, 1545-50.
- JONES, L. M., GARDNER, M. J., CATTERALL, J. B. & TURNER, G. A. 1995. Hyaluronic acid secreted by mesothelial cells: a natural barrier to ovarian cancer cell adhesion. *Clin Exp Metastasis*, 13, 373-80.
- JONJIC, N., PERI, G., BERNASCONI, S., SCIACCA, F. L., COLOTTA, F., PELICCI, P., LANFRANCONE, L. & MANTOVANI, A. 1992. Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *J Exp Med*, 176, 1165-74.
- KANEKO, M., ISHIHARA, S., MURONO, K., SASAKI, K., OTANI, K., YASUDA, K., NISHIKAWA, T., TANAKA, T., KIYOMATSU, T., HATA, K., KAWAI, K., NOZAWA, H., NAKAYAMA, H., WATANABE, T., SASAKI, S. & WATANABE, T. 2017. Carbohydrate Antigen 19-9 Predicts Synchronous Peritoneal Carcinomatosis in Patients with Colorectal Cancer. *Anticancer Res*, 37, 865-870.
- KANNAGI, R., IZAWA, M., KOIKE, T., MIYAZAKI, K. & KIMURA, N. 2004. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci*, 95, 377-84.
- KARGI, H. A., KUYUCUOGLU, M. F., ALAKAVUKLAR, M., AKPINAR, O. & ERK, S. 1997. CD44 expression in metastatic and non-metastatic non-small cell lung cancers. *Cancer Lett*, 119, 27-30.
- KATAGATA, Y., TAKEDA, H., ISHIZAWA, T., HOZUMI, Y. & KONDO, S. 2002. Occurrence and comparison of the expressed keratins in cultured human fibroblasts, endothelial cells and their sarcomas. *J Dermatol Sci*, 30, 1-9.

- KAWAMURA, T., ENDO, Y., YONEMURA, Y., NOJIMA, N., FUJITA, H., FUJIMURA, T., OBATA, T., YAMAGUCHI, T. & SASAKI, T. 2001. Significance of integrin alpha2/beta1 in peritoneal dissemination of a human gastric cancer xenograft model. *Int J Oncol*, 18, 809-15.
- KECMANOVIC, D. M., PAVLOV, M. J., CERANIC, M. S., SEPETKOVSKI, A. V., KOVACEVIC, P. A. & STAMENKOVIC, A. B. 2005. Treatment of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer by cytoreductive surgery and hyperthermic perioperative intraperitoneal chemotherapy. *Eur J Surg Oncol*, 31, 147-52.
- KETTUNEN, E., NICHOLSON, A. G., NAGY, B., WIKMAN, H., SEPPANEN, J. K., STJERNVALL, T., OLLIKAINEN, T., KINNULA, V., NORDLING, S., HOLLMEN, J., ANTTILA, S. & KNUUTILA, S. 2005. L1CAM, INP10, P-cadherin, tPA and ITGB4 over-expression in malignant pleural mesotheliomas revealed by combined use of cDNA and tissue microarray. *Carcinogenesis*, 26, 17-25.
- KHATIB, A. M., FALLAVOLLITA, L., WANCEWICZ, E. V., MONIA, B. P. & BRODT, P. 2002. Inhibition of hepatic endothelial E-selectin expression by C-raf antisense oligonucleotides blocks colorectal carcinoma liver metastasis. *Cancer Res*, 62, 5393-8.
- KIM, Y. J., BORSIG, L., VARKI, N. M. & VARKI, A. 1998. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 9325-30.
- KLEIN, C. L., BITTINGER, F., SKARKE, C. C., WAGNER, M., KOHLER, H., WALGENBACH, S. & KIRKPATRICK, C. J. 1995. Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells. *Pathobiology*, 63, 204-12.
- KOBAYASHI, K., MATSUMOTO, S., MORISHIMA, T., KAWABE, T. & OKAMOTO, T. 2000. Cimetidine inhibits cancer cell adhesion to endothelial cells and prevents metastasis by blocking E-selectin expression. *Cancer Res*, 60, 3978-84.
- KOHLER, S., ULLRICH, S., RICHTER, U. & SCHUMACHER, U. 2010. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *Br J Cancer*, 102, 602-9.
- KOISTINEN, V., HARKONEN, K., KARNA, R., ARASU, U. T., OIKARI, S. & RILLA, K. 2017. EMT induced by EGF and wounding activates hyaluronan synthesis machinery and EV shedding in rat primary mesothelial cells. *Matrix Biol*, 63, 38-54.
- KOKENYESI, R., MURRAY, K. P., BENSUSHAN, A., HUNTLEY, E. D. & KAO, M. S. 2003. Invasion of interstitial matrix by a novel cell line from primary peritoneal carcinosarcoma, and by established ovarian carcinoma cell lines: role of cell-matrix adhesion molecules, proteinases, and E-cadherin expression. *Gynecol Oncol*, 89, 60-72.
- KRAMER, K., SENNINGER, N., HERBST, H. & PROBST, W. 2002. Effective prevention of adhesions with hyaluronate. *Arch Surg*, 137, 278-82.
- KRISHNASWAMY, G., KELLEY, J., YERRA, L., SMITH, J. K. & CHI, D. S. 1999. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res*, 19, 91-104.
- KUPPNER, M. C., VAN MEIR, E., GAUTHIER, T., HAMOU, M. F. & DE TRIBOLET, N. 1992. Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumours. *Int J Cancer*, 50, 572-7.
- KUSAMURA, S., BARATTI, D., ZAFFARONI, N., VILLA, R., LATERZA, B., BALESTRA, M. R. & DERACO, M. 2010. Pathophysiology and biology of peritoneal carcinomatosis. *World J Gastrointest Oncol*, 2, 12-8.

- LACORRE, D. A., BAEKKEVOLD, E. S., GARRIDO, I., BRANDTZAEG, P., HARALDSEN, G., AMALRIC, F. & GIRARD, J. P. 2004. Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. *Blood*, 103, 4164-72.
- LAROCCA, P. J. & RHEINWALD, J. G. 1984. Coexpression of simple epithelial keratins and vimentin by human mesothelium and mesothelioma in vivo and in culture. *Cancer Res*, 44, 2991-9.
- LESLEY, J., HYMAN, R. & KINCADE, P. W. 1993. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol*, 54, 271-335.
- LESSAN, K., AGUIAR, D. J., OEGEMA, T., SIEBENSON, L. & SKUBITZ, A. P. 1999. CD44 and beta1 integrin mediate ovarian carcinoma cell adhesion to peritoneal mesothelial cells. *Am J Pathol*, 154, 1525-37.
- LEY, K. 2002. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunol Rev*, 186, 8-18.
- LEWINSOHN, D. M., R. F. BARGATZE, AND E. C. BUTCHER. 1987. Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes and other leukocytes. *J. Immunol.* 138: 4313 – 4321.
- LIAW, Y. S., YU, C. J., SHUN, C. T., LEE, Y. C., KUO, S. H., LUH, K. T. & YANG, P. C. 2001. Expression of integrins in human cultured mesothelial cells: the roles in cell-to-extracellular matrix adhesion and inhibition by RGD-containing peptide. *Respir Med*, 95, 221-6.
- LIEBMAN, J. M., BURBELO, P. D., YAMADA, Y., FRIDMAN, R. & KLEINMAN, H. K. 1993. Altered expression of basement-membrane components and collagenases in ascitic xenografts of OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Int J Cancer*, 55, 102-9.
- LIESVELD, J. L., FREDIANI, K. E., HARBOL, A. W., DIPERSIO, J. F. & ABBOUD, C. N. 1994. Characterization of the adherence of normal and leukemic CD34+ cells to endothelial monolayers. *Leukemia*, 8, 2111-7.
- LIU, C. Y., LIN, H. H., TANG, M. J. & WANG, Y. K. 2015. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*, 6, 15966-83.
- LIU, J., GENG, X. & LI, Y. 2016. Milky spots: omental functional units and hotbeds for peritoneal cancer metastasis. *Tumour Biol*, 37, 5715-26.
- LLOYD, C., YU, Q. C., CHENG, J., TURKSEN, K., DEGENSTEIN, L., HUTTON, E. & FUCHS, E. 1995. The basal keratin network of stratified squamous epithelia: defining K15 function in the absence of K14. *J Cell Biol*, 129, 1329-44.
- LOERS, G. & SCHACHNER, M. 2007. Recognition molecules and neural repair. *J Neurochem*, 101, 865-82.
- LOKESHWAR, V. B., IIDA, N. & BOURGUIGNON, L. Y. 1996. The cell adhesion molecule, GP116, is a new CD44 variant (ex14/v10) involved in hyaluronic acid binding and endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*, 271, 23853-64.
- LUDWIG, R. J., BOEHME, B., PODDA, M., HENSCHLER, R., JAGER, E., TANDI, C., BOEHNCKE, W. H., ZOLLNER, T. M., KAUFMANN, R. & GILLE, J. 2004. Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Res*, 64, 2743-50.
- LUSCINSKAS, F. W. & LAWLER, J. 1994. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *Faseb j*, 8, 929-38.
- MADDALUNO, L., VERBRUGGE, S. E., MARTINOLI, C., MATTEOLI, G., CHIAVELLI, A., ZENG, Y., WILLIAMS, E. D., RESCIGNO, M. &

- CAVALLARO, U. 2009. The adhesion molecule L1 regulates transendothelial migration and trafficking of dendritic cells. *J Exp Med*, 206, 623-35.
- MAGNANI, J. L. 2004. The discovery, biology, and drug development of sialyl Lea and sialyl Lex. *Arch Biochem Biophys*, 426, 122-31.
- MAHDI, F., SHARIAT-MADAR, Z., TODD, R. F., 3RD, FIGUEROA, C. D. & SCHMAIER, A. H. 2001. Expression and colocalization of cytokeratin 1 and urokinase plasminogen activator receptor on endothelial cells. *Blood*, 97, 2342-50.
- MCARDLE, C. S., MCMILLAN, D. C. & HOLE, D. J. 2006. The impact of blood loss, obstruction and perforation on survival in patients undergoing curative resection for colon cancer. *Br J Surg*, 93, 483-8.
- MCEVER, R. P. 2015. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res*, 107, 331-9.
- MCEVER, R. P., BECKSTEAD, J. H., MOORE, K. L., MARSHALL-CARLSON, L. & BAINTON, D. F. 1989. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest*, 84, 92-9.
- MECHTERSHEIMER, G., BARTH, T., HARTSCHUH, W., LEHNERT, T. & MOLLER, P. 1994. In situ expression of beta 1, beta 3 and beta 4 integrin subunits in non-neoplastic endothelium and vascular tumours. *Virchows Arch*, 425, 375-84.
- MERJAVA, S., NEUWIRTH, A., MANDYS, V. & JIRSOVA, K. 2009. Cytokeratins 8 and 18 in adult human corneal endothelium. *Exp Eye Res*, 89, 426-31.
- MIETTINEN, M. & FETSCH, J. F. 2000. Distribution of keratins in normal endothelial cells and a spectrum of vascular tumors: implications in tumor diagnosis. *Hum Pathol*, 31, 1062-7.
- MITRA, A. K., SAWADA, K., TIWARI, P., MUI, K., GWIN, K. & LENGYEL, E. 2011. Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and alpha(5)beta(1)-integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene*, 30, 1566-76.
- MOHAMADZADEH, M., DEGRENDELE, H., ARIZPE, H., ESTESS, P. & SIEGELMAN, M. 1998. Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. *J Clin Invest*, 101, 97-108.
- MOLL, I., TROYANOVSKY, S. M. & MOLL, R. 1993. Special program of differentiation expressed in keratinocytes of human haarscheiben: an analysis of individual cytokeratin polypeptides. *J Invest Dermatol*, 100, 69-76.
- MOLL, R., FRANKE, W. W., SCHILLER, D. L., GEIGER, B. & KREPLER, R. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31, 11-24.
- MOLL, R., SCHILLER, D. L. & FRANKE, W. W. 1990. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol*, 111, 567-80.
- MOLLOY, T. & VAN 'T VEER, L. J. 2008. Recent advances in metastasis research. *Curr Opin Genet Dev*, 18, 35-41.
- MOORE, K. L., PERSAUD, T. V. N., TORCHIA, M. G. 2013. Embryologie Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik., 6. Auflage, Elsevier, München, Kap. 4.3 und 4.7, ISBN e-Book 978-3-437-16886-4 (Stand: 06.12.2017, 13:05).
- MOUSTAKAS, A. & HELDIN, P. 2014. TGFbeta and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta*, 1840, 2621-34.
- MULLER, J. & YOSHIDA, T. 1995. Interaction of murine peritoneal leukocytes and mesothelial cells: in vitro model system to survey cellular events on serosal membranes during inflammation. *Clin Immunol Immunopathol*, 75, 231-8.

- MUTSAERS, S. E. 2002. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology*, 7, 171-91.
- MUTSAERS, S. E., BISHOP, J. E., MCGROUTHER, G. & LAURENT, G. J. 1997. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 29, 5-17.
- NAKAMURA, K., SAWADA, K., KINOSE, Y., YOSHIMURA, A., TODA, A., NAKATSUKA, E., HASHIMOTO, K., MABUCHI, S., MORISHIGE, K. I., KURACHI, H., LENGYEL, E. & KIMURA, T. 2017. Exosomes Promote Ovarian Cancer Cell Invasion through Transfer of CD44 to Peritoneal Mesothelial Cells. *Mol Cancer Res*, 15, 78-92.
- NAKASHIO, T., NARITA, T., AKIYAMA, S., KASAI, Y., FUJIWARA, M., ITO, K., TAKAGI, H. & KANNGI, R. 1997a. Adhesion of human gastric and pancreatic cancer cells to peritoneal mesothelial cells is mediated by CD44 and beta(1) integrin. *Int J Oncol*, 10, 183-8.
- NAKASHIO, T., NARITA, T., SATO, M., AKIYAMA, S., KASAI, Y., FUJIWARA, M., ITO, K., TAKAGI, H. & KANNAGI, R. 1997b. The association of metastasis with the expression of adhesion molecules in cell lines derived from human gastric cancer. *Anticancer Res*, 17, 293-9.
- NAKAYAMA, T., WATANABE, M., KATSUMATA, T., TERAMOTO, T. & KITAJIMA, M. 1995. Expression of sialyl Lewis(a) as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma. *Cancer*, 75, 2051-6.
- NASH, G. F., TURNER, L. F., SCULLY, M. F. & KAKKAR, A. K. 2002. Platelets and cancer. *Lancet Oncol*, 3, 425-30.
- NIESSEN, C. M., LECKBAND, D. & YAP, A. S. 2011. Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev*, 91, 691-731.
- NIKOLOPOULOS, S. N., BLAIKIE, P., YOSHIOKA, T., GUO, W. & GIANCOTTI, F. G. 2004. Integrin beta4 signaling promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, 6, 471-83.
- NISHIMURA, S., CHUNG, Y. S., YASHIRO, M., INOUE, T. & SOWA, M. 1996. Role of alpha 2 beta 1- and alpha 3 beta 1-integrin in the peritoneal implantation of scirrhous gastric carcinoma. *Br J Cancer*, 74, 1406-12.
- NOLAN, D. J., GINSBERG, M., ISRAELY, E., PALIKUQI, B., POULOS, M. G., JAMES, D., DING, B. S., SCHACHTERLE, W., LIU, Y., ROSENWAKS, Z., BUTLER, J. M., XIANG, J., RAFII, A., SHIDO, K., RABBANY, S. Y., ELEMENTO, O. & RAFII, S. 2013. Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration. *Dev Cell*, 26, 204-19.
- OSHIMA, R. G. 2007. Intermediate filaments: a historical perspective. *Exp Cell Res*, 313, 1981-94.
- OWENS, D. W. & LANE, E. B. 2003. The quest for the function of simple epithelial keratins. *Bioessays*, 25, 748-58.
- PANCOOK, J. D., REISFELD, R. A., VARKI, N., VITIELLO, A., FOX, R. I. & MONTGOMERY, A. M. 1997. Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J Immunol*, 158, 4413-21.
- PEARSON, J. D. 1999. Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 12, 329-41.
- PIRINEN, R., TAMMI, R., TAMMI, M., HIRVIKOSKI, P., PARKKINEN, J. J., JOHANSSON, R., BOHM, J., HOLLMEN, S. & KOSMA, V. M. 2001. Prognostic value of hyaluronan expression in non-small-cell lung cancer: Increased stromal expression indicates unfavorable outcome in patients with adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 95, 12-7.

- POBER, J. S., LAPIERRE, L. A., STOLPEN, A. H., BROCK, T. A., SPRINGER, T. A., FIERIS, W., BEVILACQUA, M. P., MENDRICK, D. L. & GIMBRONE, M. A., JR. 1987. Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol*, 138, 3319-24.
- PONTA, H., SHERMAN, L. & HERRLICH, P. A. 2003. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 33-45.
- POTTRATZ, S. T., HALL, T. D., SCRIBNER, W. M., JAYARAM, H. N. & NATARAJAN, V. 1996. P-selectin-mediated attachment of small cell lung carcinoma to endothelial cells. *Am J Physiol*, 271, L918-23.
- REITSMA, S., SLAAF, D. W., VINK, H., VAN ZANDVOORT, M. A. & OUDE EGBRINK, M. G. 2007. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch*, 454, 345-59.
- REMOTTI, F., FETSCH, J. F. & MIETTINEN, M. 2001. Keratin 1 expression in endothelia and mesenchymal tumors: an immunohistochemical analysis of normal and neoplastic tissues. *Hum Pathol*, 32, 873-9.
- RICHTER, U., WICKLEIN, D., GELEFF, S. & SCHUMACHER, U. 2012. The interaction between CD44 on tumour cells and hyaluronan under physiologic flow conditions: implications for metastasis formation. *Histochem Cell Biol*, 137, 687-95.
- ROPPONEN, K., TAMMI, M., PARKKINEN, J., ESKELINEN, M., TAMMI, R., LIPPONEN, P., AGREN, U., ALHAVA, E. & KOSMA, V. M. 1998. Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. *Cancer Res*, 58, 342-7.
- ROVIELLO, F., CARUSO, S., MARRELLI, D., PEDRAZZANI, C., NERI, A., DE STEFANO, A. & PINTO, E. 2011. Treatment of peritoneal carcinomatosis with cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: state of the art and future developments. *Surg Oncol*, 20, e38-54.
- SACKSTEIN, R. 2004. The bone marrow is akin to skin: HCELL and the biology of hematopoietic stem cell homing. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 9, 215-23.
- SADEGHI, B., ARVIEUX, C., GLEHEN, O., BEAUJARD, A. C., RIVOIRE, M., BAULIEUX, J., FONTAUMARD, E., BRACHET, A., CAILLOT, J. L., FAURE, J. L., PORCHERON, J., PEIX, J. L., FRANCOIS, Y., VIGNAL, J. & GILLY, F. N. 2000. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer*, 88, 358-63.
- SAVANI, R. C., CAO, G., POOLER, P. M., ZAMAN, A., ZHOU, Z. & DELISSER, H. M. 2001. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J Biol Chem*, 276, 36770-8.
- SCHLAEPI, M., RUEGG, C., TRAN-THANG, C., CHAPUIS, G., TEVAEARAI, H., LAHM, H. & SORDAT, B. 1997. Role of integrins and evidence for two distinct mechanisms mediating human colorectal carcinoma cell interaction with peritoneal mesothelial cells and extracellular matrix. *Cell Adhes Commun*, 4, 439-55.
- SCHRODER, C., SCHUMACHER, U., FOGEL, M., FEUERHAKE, F., MULLER, V., WIRTZ, R. M., ALTEVOGT, P., KRENKEL, S., JANICKE, F. & MILDE-LANGOSCH, K. 2009. Expression and prognostic value of L1-CAM in breast cancer. *Oncol Rep*, 22, 1109-17.
- SCHWEIZER, J., BOWDEN, P. E., COULOMBE, P. A., LANGBEIN, L., LANE, E. B., MAGIN, T. M., MALTAIS, L., OMARY, M. B., PARRY, D. A., ROGERS, M. A. & WRIGHT, M. W. 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*, 174, 169-74.

- SCREATON, G. R., BELL, M. V., JACKSON, D. G., CORNELIS, F. B., GERTH, U. & BELL, J. I. 1992. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 12160-4.
- SEITER, S., ARCH, R., REBER, S., KOMITOWSKI, D., HOFMANN, M., PONTA, H., HERRLICH, P., MATZKU, S. & ZOLLER, M. 1993. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med*, 177, 443-55.
- SENDT, W., MANSOURI, E., SCHMITT-GRAEFF, A., WOLFF-VORBECK, G. & SCHOFFEL, U. 2002. Influence of antiseptic agents on interleukin-8 release and transmigration of polymorphonuclear neutrophils in a human in vitro model of peritonitis. *Surg Infect (Larchmt)*, 3, 235-44.
- SETALA, L. P., TAMMI, M. I., TAMMI, R. H., ESKELINEN, M. J., LIPPONEN, P. K., AGREN, U. M., PARKKINEN, J., ALHAVA, E. M. & KOSMA, V. M. 1999. Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate. *Br J Cancer*, 79, 1133-8.
- SHERMAN, L., SLEEMAN, J., HERRLICH, P. & PONTA, H. 1994. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*, 6, 726-33.
- SHTIVELMAN, E. & BISHOP, J. M. 1991. Expression of CD44 is repressed in neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol*, 11, 5446-53.
- SINGH, B., FU, C. & BHATTACHARYA, J. 2000. Vascular expression of the alpha(v)beta(3)-integrin in lung and other organs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278, L217-26.
- SKELTON, T. P., ZENG, C., NOCKS, A. & STAMENKOVIC, I. 1998. Glycosylation provides both stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan. *J Cell Biol*, 140, 431-46.
- SMITH, C. W. 2008. 3. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol*, 121, S375-9; quiz S414.
- SPRINGER, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76, 301-14.
- STAUDER, R., EISTERER, W., THALER, J. & GUNTHER, U. 1995. CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood*, 85, 2885-99.
- STEEGMAIER, M., LEVINOVITZ, A., ISENMANN, S., BORGES, E., LENTER, M., KOCHER, H. P., KLEUSER, B. & VESTWEBER, D. 1995. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*, 373, 615-20.
- STERN, R., KOGAN, G., JEDRZEJAS, M. J. & SOLTES, L. 2007. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnol Adv*, 25, 537-57.
- STEWART, C. J., MORRIS, M., DE BOER, B. & IACOPETTA, B. 2007. Identification of serosal invasion and extramural venous invasion on review of Dukes' stage B colonic carcinomas and correlation with survival. *Histopathology*, 51, 372-8.
- STEWART, J. H. T., SHEN, P. & LEVINE, E. A. 2005. Intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for peritoneal surface malignancy: current status and future directions. *Ann Surg Oncol*, 12, 765-77.
- STROBEL, T. & CANNISTRA, S. A. 1999. Beta1-integrins partly mediate binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Gynecol Oncol*, 73, 362-7.
- STROBEL, T., SWANSON, L. & CANNISTRA, S. A. 1997. In vivo inhibition of CD44 limits intra-abdominal spread of a human ovarian cancer xenograft in nude mice: a novel role for CD44 in the process of peritoneal implantation. *Cancer Res*, 57, 1228-32.

- STUBKE, K., WICKLEIN, D., HERICH, L., SCHUMACHER, U. & NEHMANN, N. 2012. Selectin-deficiency reduces the number of spontaneous metastases in a xenograft model of human breast cancer. *Cancer Lett*, 321, 89-99.
- STUPACK, D. G. & CHERESH, D. A. 2002. ECM remodeling regulates angiogenesis: endothelial integrins look for new ligands. *Sci STKE*, 2002, pe7.
- TAKADA, A., OHMORI, K., YONEDA, T., TSUYUOKA, K., HASEGAWA, A., KISO, M. & KANNAGI, R. 1993. Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res*, 53, 354-61.
- TAKATSUKI, H., KOMATSU, S., SANO, R., TAKADA, Y. & TSUJI, T. 2004. Adhesion of gastric carcinoma cells to peritoneum mediated by alpha3beta1 integrin (VLA-3). *Cancer Res*, 64, 6065-70.
- TERADA, T. 2011. Immunohistochemical profile of normal mesothelium and histiocytic/mesothelial hyperplasia: a case report. *Int J Clin Exp Pathol*, 4, 631-6.
- TESSIER-LAVIGNE, M. & GOODMAN, C. S. 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science*, 274, 1123-33.
- THIERY, J. P. & SLEEMAN, J. P. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 131-42.
- THIES, A., SCHACHNER, M., MOLL, I., BERGER, J., SCHULZE, H. J., BRUNNER, G. & SCHUMACHER, U. 2002. Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer*, 38, 1708-16.
- THURIN, M. & KIEBER-EMMONS, T. 2002. SA-Lea and tumor metastasis: the old prediction and recent findings. *Hybrid Hybridomics*, 21, 111-6.
- TIETZE, L., BORNTAEGER, J., KLOSTERHALFEN, B., AMO-TAKYI, B., HANDT, S., GUNTHER, K. & MERKELBACH-BRUSE, S. 1999. Expression and function of beta(1) and beta(3) integrins of human mesothelial cells in vitro. *Exp Mol Pathol*, 66, 131-9.
- TISCHLER, V., PFEIFER, M., HAUSLADEN, S., SCHIRMER, U., BONDE, A. K., KRISTIANSEN, G., SOS, M. L., WEDER, W., MOCH, H., ALTEVOGT, P. & SOLTERMANN, A. 2011. L1CAM protein expression is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*, 10, 127.
- TOOLE, B. P. 1990. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr Opin Cell Biol*, 2, 839-44.
- TOOLE, B. P. 2001. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 12, 79-87.
- VALASTYAN, S. & WEINBERG, R. A. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147, 275-92.
- VAN DER FLIER, A. & SONNENBERG, A. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, 305, 285-98.
- VAN GREVENSTEIN, W. M., HOFLAND, L. J., JEEKEL, J. & VAN EIJCK, C. H. 2006. The expression of adhesion molecules and the influence of inflammatory cytokines on the adhesion of human pancreatic carcinoma cells to mesothelial monolayers. *Pancreas*, 32, 396-402.
- VAN ROSSEN, M. E., HOFLAND, L. J., VAN DEN TOL, M. P., VAN KOETSVELD, P. M., JEEKEL, J., MARQUET, R. L. & VAN EIJCK, C. H. 2001. Effect of inflammatory cytokines and growth factors on tumour cell adhesion to the peritoneum. *J Pathol*, 193, 530-7.
- VERWAAL, V. J., VAN RUTH, S., DE BREE, E., VAN SLOOTHEN, G. W., VAN TINTEREN, H., BOOT, H. & ZOETMULDER, F. A. 2003. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic

- chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 21, 3737-43.
- VESTWEBER, D. & BLANKS, J. E. 1999. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev*, 79, 181-213.
- VIGETTI, D., KAROUSOU, E., VIOLA, M., DELEONIBUS, S., DE LUCA, G. & PASSI, A. 2014. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1840, 2452-9.
- WANG, Z. B., LI, M. & LI, J. C. 2010. Recent advances in the research of lymphatic stomata. *Anat Rec (Hoboken)*, 293, 754-61.
- WASEEM, A., DOGAN, B., TIDMAN, N., ALAM, Y., PURKIS, P., JACKSON, S., LALLI, A., MACHESNEY, M. & LEIGH, I. M. 1999. Keratin 15 expression in stratified epithelia: downregulation in activated keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 112, 362-9.
- WEI, J., XU, G., WU, M., ZHANG, Y., LI, Q., LIU, P., ZHU, T., SONG, A., ZHAO, L., HAN, Z., CHEN, G., WANG, S., MENG, L., ZHOU, J., LU, Y., WANG, S. & MA, D. 2008. Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation. *Anticancer Res*, 28, 327-34.
- WEIGEL, P. H., HASCALL, V. C. & TAMMI, M. 1997. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*, 272, 13997-4000.
- WELSCH, U., DELLER, T., KUMMER, W. 2014. Lehrbuch Histologie., 4. Auflage, Elsevier, München, Kap. 5.1, ISBN e-Book 978-3-437-29647-5 (Stand: 01.12.2017, 11:34).
- WELSCH, U., DELLER, T., KUMMER, W. 2014. Lehrbuch Histologie., 4. Auflage, Elsevier, München, Kap. 9, ISBN e-Book 978-3-437-29647-5 (Stand: 15.12.2017, 17:21).
- WIELENGA, V. J., HEIDER, K. H., OFFERHAUS, G. J., ADOLF, G. R., VAN DEN BERG, F. M., PONTA, H., HERRLICH, P. & PALS, S. T. 1993. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res*, 53, 4754-6.
- WILKOSZ, S., IRELAND, G., KHWAJA, N., WALKER, M., BUTT, R., DE GIORGIO-MILLER, A. & HERRICK, S. E. 2005. A comparative study of the structure of human and murine greater omentum. *Anat Embryol (Berl)*, 209, 251-61.
- WILLIAMS, A. F. & BARCLAY, A. N. 1988. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*, 6, 381-405.
- WITZ, C. A., TAKAHASHI, A., MONTOYA-RODRIGUEZ, I. A., CHO, S. & SCHENKEN, R. S. 2000. Expression of the alpha2beta1 and alpha3beta1 integrins at the surface of mesothelial cells: a potential attachment site of endometrial cells. *Fertil Steril*, 74, 579-84.
- WITZ, I. P. 2006. The involvement of selectins and their ligands in tumor-progression. *Immunol Lett*, 104, 89-93.
- XU, Y., SWERLICK, R. A., SEPP, N., BOSSE, D., ADES, E. W. & LAWLEY, T. J. 1994. Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1). *J Invest Dermatol*, 102, 833-7.
- YAGI, T. & TAKEICHI, M. 2000. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev*, 14, 1169-80.
- YANCOPOULOS, G. D., DAVIS, S., GALE, N. W., RUDGE, J. S., WIEGAND, S. J. & HOLASH, J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407, 242-8.
- YANEZ-MO, M., LARA-PEZZI, E., SELGAS, R., RAMIREZ-HUESCA, M., DOMINGUEZ-JIMENEZ, C., JIMENEZ-HEFFERNAN, J. A., AGUILERA, A.,

- SANCHEZ-TOMERO, J. A., BAJO, M. A., ALVAREZ, V., CASTRO, M. A., DEL PESO, G., CIRUJEDA, A., GAMALLO, C., SANCHEZ-MADRID, F. & LOPEZ-CABRERA, M. 2003. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med*, 348, 403-13.
- YU, G., TANG, B., YU, P. W., PENG, Z. H., QIAN, F. & SUN, G. 2010. Systemic and peritoneal inflammatory response after laparoscopic-assisted gastrectomy and the effect of inflammatory cytokines on adhesion of gastric cancer cells to peritoneal mesothelial cells. *Surg Endosc*, 24, 2860-70.
- ZECCHINI, S., BIANCHI, M., COLOMBO, N., FASANI, R., GOISIS, G., CASADIO, C., VIALE, G., LIU, J., HERLYN, M., GODWIN, A. K., NUCIFORO, P. G. & CAVALLARO, U. 2008. The differential role of L1 in ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelium. *Cancer Res*, 68, 1110-8.
- ZEILLEMAKER, A. M., MUL, F. P., HOYNCK VAN PAPENDRECHT, A. A., LEGUIT, P., VERBRUGH, H. A. & ROOS, D. 1996. Neutrophil adherence to and migration across monolayers of human peritoneal mesothelial cells. The role of mesothelium in the influx of neutrophils during peritonitis. *J Lab Clin Med*, 127, 279-86.
- Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin, 21 URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile (Stand: 17.03.2018, 11:45).
- ZHANG, X. Y., PETTENGELL, R., NASIRI, N., KALIA, V., DALGLEISH, A. G. & BARTON, D. P. 1999. Characteristics and growth patterns of human peritoneal mesothelial cells: comparison between advanced epithelial ovarian cancer and non-ovarian cancer sources. *J Soc Gynecol Investig*, 6, 333-40.
- ZHAO, Y., YAN, Q., LONG, X., CHEN, X. & WANG, Y. 2008. Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochem Funct*, 26, 571-7.
- ZIPRIN, P., ALKHAMESI, N. A., RIDGWAY, P. F., PECK, D. H. & DARZI, A. W. 2004. Tumour-expressed CD43 (sialophorin) mediates tumour-mesothelial cell adhesion. *Biol Chem*, 385, 755-61.
- ZIPRIN, P., RIDGWAY, P. F., PFISTERMULLER, K. L., PECK, D. H. & DARZI, A. W. 2003. ICAM-1 mediated tumor-mesothelial cell adhesion is modulated by IL-6 and TNF-alpha: a potential mechanism by which surgical trauma increases peritoneal metastases. *Cell Commun Adhes*, 10, 141-54.

9 Danksagung

Herrn Professor Dr. U. Schumacher möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung und Anregungen während der gesamten Zeit der Dissertation danken.

Für die ermutigenden Gespräche und die unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung, Auswertung und Verfassen dieser Arbeit gilt ein ganz besonderer Dank an Frau Privatdozentin Dr. C. Stürken.

Für das Überlassen des histologischen Materials und der Patientendaten danke ich Herrn Prof. Dr. Andreas Gocht (Praxis für Pathologie, Lübeck).

Ganz herzlich möchte ich auch allen Mitarbeitern des Instituts danken, die mich bei der technischen Durchführung der Laborarbeiten unterstützt haben: Frau T. Coellen, Frau S. Feldhaus, Frau R. Gehrke, Herr. T. Gosau, Frau L. Jenssen, Frau. K. Knies, Frau M. Märker, J. Schröder-Schwarz.

Ganz besonders danken möchte ich meinem Freund, M. Buhlheller, der mir in dieser langen Phase immer wieder aufmunternd zur Seite stand und mit seiner Hartnäckigkeit entscheidend zur Beendigung dieser Arbeit beigetragen hat.

Zum Schluss möchte ich noch meiner Familie danken, die während dieser ganzen Zeit immer an mich geglaubt hat und immer ein offenes Ohr hatte.

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11 Eidesstattliche Erklärung

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.

Hamburg, den 13.08.2020

Jamila Arianne Meret Kliege