

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Süleyman Ergün**

**Die Rolle des Zelladhäsionsmoleküls *Carcinoembryonic
antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1) bei der
lymphogenen Metastasierung des Prostatakarzinoms (PCa)**

Inauguraldissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Zahnmedizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Patrick Vix
aus 63654 Büdingen
Würzburg, Dezember 2021**

Referent: Prof. Dr. Süleyman Ergün
Korreferent: Prof. Dr. Harald Schulze
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch
Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2022

Der Promovend ist Zahnarzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Prostatakarzinom (PCa)	1
1.1.1	Anatomie der Prostata.....	1
1.1.2	Charakteristika des PCa.....	1
1.1.3	Diagnose des PCa	2
1.1.4	Ausbreitung des PCa	4
1.1.5	Histologische Tumorstadien	4
1.1.6	Klinische Tumorstadien des PCa	7
1.1.7	Einteilung in Risikogruppen.....	8
1.2	Lymphsystem	9
1.2.1	Aufbau des Lymphsystems	9
1.2.2	LN-Anatomie	9
1.2.3	Anatomie der Lymphgefäße	10
1.2.4	Lymphogene Metastasierung	10
1.3	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1). 11	
1.3.1	Rolle von CEACAM1 beim PCa	12
1.3.2	Rolle von CEACAM1 bei der Angiogenese.....	13
1.3.3	Rolle von CEACAM1 bei der Lymphangiogenese	13
1.3.4	Rolle von CEACAM1 bei der Tumorzellinvasion.....	14
1.4	Fragestellung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Verwendete Materialien	17
2.1.1	Instrumente und Geräte	17
2.1.2	Chemikalien	18
2.1.3	Kits.....	20
2.1.4	„Software“	20
2.1.5	Oligonukleotide	20
2.1.6	Versuchstiere	20
2.1.7	Humanes Gewebe	21
2.1.8	Antikörperliste	22

2.2	Lösungen und Puffer	23
2.2.1	Lösungen für die Genotypisierung von Mäusen.....	23
2.2.2	Lösungen für Immunhistologie	23
2.3	Methoden	25
2.3.1	Immunhistochemie (IHC).....	25
2.3.2	3,3-Diaminobenzidin-(DAB)-Färbung	27
2.3.3	Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung.....	28
2.3.4	Kernechtrot	28
2.3.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	29
2.3.6	Färbeprotokolle	29
2.3.7	Genotypisierung mit Hilfe der PCR.....	32
2.3.8	Auswertung der PCR durch horizontale Gelelektrophorese.....	34
2.4	Histologische Auswertungen.....	36
3	Ergebnisse	40
3.1	CEACAM1 bei der Angiogenese und Lymphangiogenese des PCa	40
3.2	Histologische Analyse von PCa-LN-Präparaten	45
3.2.1	CEACAM1-Expression im LN-Gewebe von PCa Patienten	47
3.2.2	CEACAM1-Expression in angiogen-aktivierten Blut- und Lymphgefäßen der PCa-LN.....	49
3.3	Eignung von PSA als Marker für Tumorzellen im PCa-Gewebe	54
3.4	Expressionsanalyse von CEACAM1 und PSA im humanen PCa-Prostatagewebe.....	58
3.5	Analyse der CEACAM1-Expression im Mausmodell.....	62
4	Diskussion	65
4.1	CEACAM1 als regulativer Mediator der Angiogenese und Lymphangiogenese	65
4.2	Cluster metastasierender PCa-Tumorzellen mit CEACAM1-Expression in PCa-LN.....	69
4.3	CEACAM1-Expression in LN-Sinusendothelzellen vor dem Auftreten von PCa-Tumorzellen.....	70
4.4	Heterogene CEACAM1- und PSA-Expression in PCa-Gewebe mit einem <i>Gleason Score</i> 3+3 und 3+4	71
4.5	CEACAM1-Expressionsmuster in den PCa-Zellclustern der LN	73

4.6	CEACAM-Expression im TRAMPC1 PCa-Mausmodell	74
5	Zusammenfassung	76
6	Literaturverzeichnis.....	78
Appendix		
I	Abkürzungsverzeichnis.....	84
II	Abbildungsverzeichnis	88
III	Tabellenverzeichnis	91
IV	Danksagung.....	92
V	Lebenslauf	93
VI	Erklärung.....	94

1 Einleitung

1.1 Prostatakarzinom (PCa)

1.1.1 Anatomie der Prostata

Die Prostata ist eine drei cm lange und vier cm breite, proximal mit der Harnblase verwachsene Drüse, die die Urethra umgibt. Ihr distaler Anteil hat Kontakt mit dem Beckenboden. Die von einer fibromuskulären Kapsel umhüllte Prostata besteht aus einem bindegewebigen Stroma mit glatten Muskelzellen und tubuloalveolären Drüsen. McNeal *et al.* (1988) haben die Prostata nach embryo- und histogenetischen Kriterien in drei Zonen aufgeteilt, die sich durch unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten der Tumorentstehung auszeichnen. In der zentrale Zone beträgt die Wahrscheinlichkeit 10 %, in der Transitionalzone 15–20 % und in der peripheren- oder posterolateralen Zone 70–75 % [1]. Die tubuloalveolären Drüsen bestehen aus einem ein- bis zweischichtigen Epithel mit in Abhängigkeit von der sekretorischen Aktivität hochprismatischen, isoprismatischen oder flachen Zellen. Die Prostata bildet mit 15–30 % einen großen Anteil am Sekret des Ejakulats. Das Prostatasekret verdünnt das Ejakulat, fungiert als Puffer und fördert die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen. Im Alter kommt es häufig im zentralen Teil zu einer gutartigen Vergrößerung der Prostata (Prostatahyperplasie). Durch dieses Prostataadenom kann die Urethra eingeengt und die Miktion erschwert werden [2].

1.1.2 Charakteristika des PCa

Das PCa ist ein vom Drüsenepithel der Prostata ausgehender, maligner Tumor. Es stellt bei Männern die häufigste Tumorerkrankung sowie die dritthäufigste krebserkrankung bedingte Todesursache dar. Die Anzahl der Neuerkrankungen ist bis 2010 kontinuierlich angestiegen, nimmt jedoch seitdem wieder leicht ab. Diese Entwicklung beruht auf einer verbesserten urologischen Diagnostik durch einen Test für da Prostata-spezifische Antigen (PSA) und einer ansteigenden Lebenserwartung. Mit dem PSA-Test werden auch Tumoren der Prostata entdeckt, die sonst bis zum Lebensende ohne Symptomatik geblieben wären. Drei von vier Tumoren der Prostata werden aktuell in einem frühen Stadium diagnostiziert. Die Sterberate hat sich bis zum Jahr 2007 kontinuierlich verringert und bleibt seitdem annähernd auf dem gleichen Niveau [3].

Die Pathogenese des PCa ist noch weitgehend unerforscht. Bisläng wurden drei Risikofaktoren identifiziert: das Alter, die ethnische Herkunft und der genetische Hintergrund [4]. Das Risiko an einem PCa zu erkranken steigt mit fortschreitendem Alter stark an. Für einen 35-jährigen Mann liegt das Risiko bei etwa 0,1 %, für einen 75-

jährigen dagegen bei 6 % [3]. Weltweit variiert die Inzidenz an PCa erkrankter Männer. Am seltensten ist die PCa mit jährlich 1–9 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner beim asiatischen Teil der Weltbevölkerung und speziell in China. In den USA liegt die Inzidenz mit 137 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr am höchsten. In Europa beträgt die Inzidenz jährlich 26–55 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner [5]. Am häufigsten tritt die Erkrankung bei afroamerikanischen Männern auf [3]. Ein weiterer Risikofaktor ist die Anhäufung von PCa-Erkrankungen in der näheren Verwandtschaft. 10–15 % der an PCa erkrankten Patienten haben unabhängig von ihrer Ethnie einen Verwandten, der ebenfalls betroffen ist [6, 7]. Das Erkrankungsrisiko steigt mit der Anzahl der in der Familie erkrankten Personen [5].

Umstritten ist, ob die Ernährung bei der Entstehung des Tumors eine Rolle spielt. Als möglicher PCa-Auslöser wird der Verzehr von Produkten mit hohem Fettgehalt, Milchprodukten und Fleisch diskutiert. Die vergleichsweise geringe Inzidenz im asiatischen Raum beruht vermutlich auf unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten [8–10].

Weiter spielen auch Androgene bei der PCa-Entstehung eine Rolle. 1966 bekam C. Huggins den Nobelpreis für seine Forschungsarbeit zum Zusammenhang zwischen Androgenen und dem PCa [11]. Zusätzliche mögliche Einflussfaktoren wie Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum, Vasektomien sowie ein geringe sportliche Aktivität wurden in zahlreichen Studien untersucht und als Nicht-Risikofaktoren für das PCa eingestuft [5].

1.1.3 Diagnose des PCa

Im Folgenden werden die gängigsten Diagnoseverfahren für das PCa beschrieben.

PSA-Wert Bestimmung

Bei dem PSA-Molekül handelt es sich um eine Serin-Protease aus der Familie der Kallikreine. Es spaltet das Substrat Semenogelin-1, wodurch sich das Ejakulat verflüssigt und folglich die Beweglichkeit der Spermatozoen erhöht wird [12]. Der PSA-Nachweis ist kein sicherer Malignitätsmarker, da es physiologisch in den Drüsen der Prostata gebildet wird. Dennoch lässt sich in vielen Fällen ein PCa über einen erhöhten PSA-Wert entdecken [13]. PSA-Normwerte liegen im Alter von 45 Jahren bei 1 ng/ml und ab einem Alter von 60 Jahren bei 2 ng/ml. Ab dem 40. Lebensjahr und einer initialen PSA Konzentration von ≥ 1 ng/ml wird ein Screening-Intervall von acht Jahren empfohlen. Ein erhöhter PSA-Wert geht nicht obligat mit einer Präkanzerose in der

Prostata einher, sondern kann auch durch eine infektionsbedingte Hyperplasie verursacht werden [13].

Digital-rektale Untersuchung

Bei der digital-rektalen Untersuchung wird die Prostata über die *Ampulla recti* palpirt. Dabei werden die Größe, die Form und die Konsistenz erföhlt [2]. Die digital-rektale Untersuchung kommt meist im Rahmen der Früherkennung zum Einsatz [1], speziell bei einer Verdachtsdiagnose „PCa“ aufgrund eines erhöhten PSA-Werts [14, 15]. Die digital-rektale Untersuchung kann ohne apparativen Aufwand erfolgen [1].

Transrektale Sonografie (TRUS)

Die transrektale Sonografie wird zur Diagnosesicherung eingesetzt [1]. Die Sensitivität und Spezifität dieses bildgebenden Verfahrens hängt von der Erfahrung des Behandlers ab [16]. Die transrektale Sonografie kann eine Biopsie nicht ersetzen, wird aber zur Bestimmung des Prostatavolumens und der Größe von Tumorarealen eingesetzt [1].

Magnetresonanz-Tomografie

Mittels Magnetresonanz-Tomografie lässt sich ein PCa am besten detektieren [1, 17]. Die Sensitivität der Technik liegt bei 76–87 %, die Spezifität bei 60–98 % [15], wobei auch bei dieser Methode die Erfahrung des Behandlers eine große Rolle spielt [18].

Knochenszintigrafie

Die Knochenszintigrafie kommt bei lokal fortgeschrittenen bzw. metastasierenden PCa-Stadien zum Einsatz. Knochenmetastasen werden mittels eines Technetium-Isotops (^{33m}Tc) detektiert. Diese Methode sollte allerdings erst bei einem PSA-Wert > 20 ng/ml, einem lokal fortgeschrittenen Tumor, einem *Gleason Score* > 7 oder bei plötzlich auftretenden Knochenschmerzen verbunden mit einem ungeklärten Anstieg der alkalischen Phosphatase angewandt werden. Bei unklaren Ergebnissen lässt sich die Diagnose mittels Magnetresonanz-Tomografie oder Computer-Tomografie sichern [1].

Transrektale Prostatastanzbiopsie

Die Standardmethode der histologischen Diagnosesicherung ist eine mittels transrektaler Sonografie geführte transrektale Prostatastanzbiopsie [19]. Die Stanzbiopsie findet unter Antibiotikaschutz und lokaler Anästhesie statt. Je nach Größe des Tumors werden 10–12 Gewebezylinder entnommen. Die Stanzbiopsie wird bei einer ausgedehnten hochgradigen prostatichen intraepithelialen Neoplasien (*High Grade PIN, HGPIN*) oder bei einem zu hohen PSA-Wert bzw. irregulären Verlauf des PSA-Wertes wiederholt [1].

1.1.4 Ausbreitung des PCa

PCa entwickeln sich überwiegend in der peripheren Zone der Prostata. Durch das lokale Wachstum kann es zur Einengung der Urethra und zu einer rektalen Obstruktion kommen [20]. Bei der lymphogenen Metastasierung werden zunächst die Lymphknoten (*lymph nodes, LN*) der *Fossa obturatoria* (Raum zwischen *Arteria* und *Vena iliaca communis, Arteria iliaca externa, Nervus obturatorius* und *Symphyse*) befallen. Es folgen die präsakralen und inguinalen LN [21].

1.1.5 Histologische Tumorstadien

Bei der histopathologischen Untersuchung lassen Architekturstörungen und Kernatypien auf ein benignes oder malignes Tumorwachstum schließen [1]. Zum Nachweis fehlender Basalzellen werden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern (*antibody, AB*) gegen p63 [22-25] und Zytokeratine durchgeführt [26, 27]. Mit PSA lässt sich die prostatiche Herkunft nachweisen [28]. Entscheidend für die Prognose ist der „*Gleason Score*“ [29, 30], die TNM-Klassifikation und der R-Status [31-35]. Der R-Status gibt Auskunft über den Resektionsrand und zeigt an, ob dieser Tumorzell-frei ist [1].

Prostatiche intraepitheliale Neoplasien (PIN) sind Vorläuferläsionen des PCa [36-39]. Charakteristisch für eine PIN-Läsion ist eine abnormale Proliferation des Epithels in luminaler Richtung der Prostatadrüsen verbunden mit einer zellulären Dysplasie ohne Stromainvasion [40-42]. PIN-Läsionen werden in drei Stadien eingeteilt, wobei Grad 1 PIN-Läsionen dem „*Low-grade-PIN*“ und Grad 2 und 3 PIN-Läsionen dem HGPIN entsprechen [43, 44]. Viele Patienten mit PIN-Läsionen entwickeln langfristig ein PCa [44]. HGPIN-Drüsen sind eine fakultative Präkanzerose [45-47]. Bei einem Nachweis von HGPIN-Drüsen in mindestens vier Proben einer Stanzbiopsie steigt das PCa-Risiko. Daher sollte nach sechs Monaten eine Kontrollbiopsie erfolgen.

Histologisch wird das PCa mit Hilfe des *Gleason Scores* in fünf Stadien unterteilt [48]. Der *Gleason Score* eines Patienten errechnet sich aus der Summe des am häufigsten und am zweithäufigsten auftretenden *Scores*. Der weltweit etablierte *Gleason Score* gibt Auskunft über die Drüsenarchitektur im Prostatagewebe während der Tumorentwicklung [49, 50] (Abb. 1; Tab. 1).

Tabelle 1: Konventioneller *Gleason Score* 1–5 und modifizierten *Gleason Score* 7a und 7b [50]

<i>Gleason Score</i> 1 (konventionell)	dicht nebeneinander liegende Drüsen mit gut umschriebenem Tumorherd
<i>Gleason Score</i> 2 (konventionell)	verstreuter liegende Drüsen mit erkennbaren Infiltrationstendenzen am Rand
<i>Gleason Score</i> 3 (konventionell)	kleine und runde Drüsen mit infiltrativem Wachstum
<i>Gleason Score</i> 4 (konventionell)	miteinander verschmolzene Drüsen
<i>Gleason Score</i> 5 (konventionell)	nicht erkennbare Drüsendifferenzierung
<i>Gleason Score</i> 7a (modifiziert)	modifizierter <i>Gleason Score</i> 3+4: Anteile des Präparates mit <i>Gleason Score</i> 3 > Anteile des Präparates mit <i>Gleason Score</i> 4
<i>Gleason Score</i> 7b (modifiziert)	Modifizierter <i>Gleason Score</i> 4+3: Anteile des Präparates mit <i>Gleason Score</i> 4 > Anteile des Präparates mit <i>Gleason Score</i> 3.

Neben dem in Tabelle 1 aufgeführten konventionellen *Gleason Score* existiert ein modifizierter *Gleason Score*. Aktuell werden Drüsenverbände mit nicht eindeutig erkennbaren Lumina nicht mehr dem *Gleason Score* 3, sondern dem *Gleason Score* 4 zugeordnet [50]. Der bei einem Patienten histologisch, durch eine entnommene Probe bestimmte *Gleason Score* stimmt mit dem bei einer Prostatektomie erhobenen *Gleason Score* nur in 45 % der Fälle überein [52, 53]. Um dieser Ungenauigkeit entgegenzuwirken, sollen *Gleason Score* 1 und 2 Tumoren nicht mehr in Stanzbiopsien diagnostiziert werden. Daher bildet der *Gleason Score* 3+3=6 den niedrigsten *Score*.

Dieser kann im Gegensatz zu den *Gleason Scores* 1 und 2 sicher diagnostiziert werden [49, 54, 55]. Nach dem „modifizierten“ *Gleason Score* wird das jeweilige Stadium als Summe angegeben. Bei einem *Gleason Score* von 3+4=7a entspricht ein höherer Anteil des Präparates dem *Gleason Score* 3. Ein *Gleason Score* 4+3=7b ist Ausdruck einer höheren Malignität des Tumors, da ein höherer Anteil des Präparates mit einem *Gleason Score* 4 bewertet wird. Die Unterscheidung zwischen *Gleason Score* 7a und *Gleason Score* 7b ist klinisch bedeutsam. Laut Studien unterscheiden sich Tumoren mit *Gleason Score* 7a und 7b in ihrer Prognose und anzuwendenden Therapien [56-58].

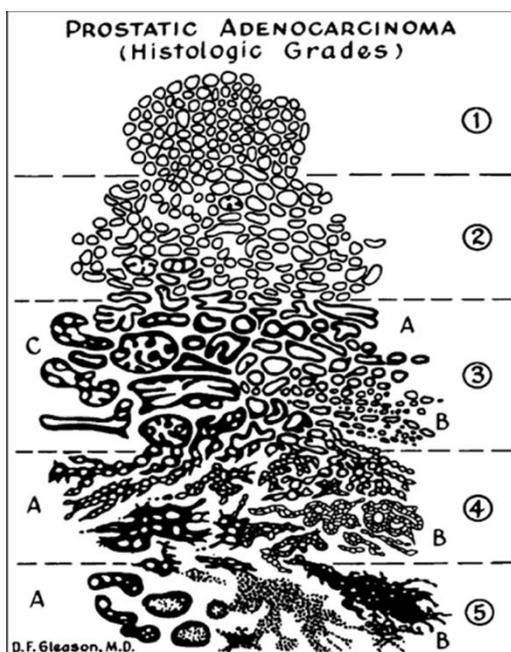


Abbildung 1: Originalzeichnung des Pathologen D. F. Gleason mit einer schematische Darstellung des nach ihm benannten *Gleason Scores* [59]

Der *Gleason Score* korreliert mit der Aggressivität des Tumors. Während bei einem *Gleason Score* 1 und 2 die Drüsen noch eine physiologische Form besitzen, kommt es ab *Gleason Score* 3 zu einem infiltrierenden Wachstum. Der Differenzierungsgrad nimmt bei einem *Gleason Score* 4 weiter ab. Bei einem *Gleason Score* 5 sind nur noch irreguläre Ansammlungen von Zellen vorhanden.

1.1.6 Klinische Tumorstadien des PCa

Die klinische Einteilung des PCa erfolgt nach der TNM-Klassifikation (s. Tab. 2 und 3).

Tabelle 2: Einteilung des Prostatakarzinoms (PCa) nach Ausdehnung (T), nach Befall der regionalen Lymphknoten (N) und nach dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M). Modifiziert nach [60]

Primärtumor (T)		
T0		kein Primärtumor vorhanden.
T1		kein klinisch sichtbarer Tumor
	T1a	histologisch nachgewiesener Tumor mit Befall von < 5 % des Gewebes
	T1b	histologisch nachgewiesener Tumor mit Befall > 5 % des Gewebes
	T1c	Entdeckung des Tumors bei einer Nadelbiopsie nach Auftreten eines erhöhten PSA-Wertes
T2		Tumorlokalisation innerhalb der Prostatakapsel
	T2a	Tumorinfiltration von weniger als 50 % des Seitenlappens
	T2b	Tumorinfiltration von mehr als 50 % des Seitenlappens
	T2c	Tumordetektion in beiden Lappen
T3		Tumorbefall der Prostatakapsel
	T3a	fehlender Befall der Samenblase
	T3b	Befall der Samenblase
T4		Befall von Nachbarstrukturen
Regionale Lymphknoten (N)		
Nx		keine Aussage möglich
N0		fehlende Lymphknotenmetastasen
N1		Metastasierung in regionäre Lymphknoten
Fernmetastasen (M)		
M1		Fernmetastasen vorhanden
	M1a	Metastasen sind in anderen nicht regionären Lymphknoten
	M1b	Knochenmetastasen
	M1c	Metastasen in anderen Organen und Strukturen

Tabelle 3: Klinische Unterteilung des Prostatakarzinoms (PCa) modifiziert nach [51].

T1–2/ N0/ M0	lokal begrenztes PCa
T3–4/ N0/ M0	lokal fortgeschrittenes PCa
N1–3/ M1	fortgeschrittenes bzw. metastasierendes PCa

M: Fernmetastasen, N: Befall der regionalen Lymphknoten, T: Ausdehnung

1.1.7 Einteilung in Risikogruppen

Die „EAU Guidelines on prostate cancer“ unterteilen das PCa in verschiedene Stadien.

„Low risk prostate cancer“

Zur Gruppe „low risk prostate cancer“ gehören Patienten mit einem T1c-PCa, einem *Gleason Score* ≤ 6 und einem PSA-Wert < 10 ng/ml. Die Therapie bei diesen Patienten besteht aus einer „aktiven Beobachtung“. Das Ziel dabei ist, ein klinisch bedeutsames Tumorwachstum frühzeitig zu diagnostizieren und ggf. zu therapieren. Ein fortschreitendes Tumorwachstum ist an einem Anstieg des PSA-Wertes > 10 ng/ml und einem *Gleason Score* > 7 erkennbar [51]. Bei stabilem *Status quo* betragen die spezifischen 20-Jahres-Überlebensraten bei einem „low-risk“ PCa 80–90 % [61, 62].

„Intermediate-risk prostate Cancer“

Diese Gruppe von PCa-Patienten wird definiert durch ein T2b-2c-PCa, ein *Gleason Score* von 7 und ein PSA-Wert von 10–20 ng/ml. Ab dieser Risikostufe werden routinemäßige Therapien wie die radikale Prostatektomie, Bestrahlungen oder Anti-Androgen-Medikationen eingesetzt [51].

„High-risk prostate Cancer“

In diese Gruppe fallen Patienten mit einem $> T3a$ -PCa, einem *Gleason Score* von 8–10 und einem PSA-Wert > 20 ng/ml [51].

Die vorliegende Arbeit adressiert den Übergang von *Gleason Score 7a* zu *Gleason Score 7b*, der in der Gruppe „intermediate-risk prostate cancer“ stattfindet. Dieser Punkt markiert therapeutisch den Übergang von einer „aufmerksamen Beobachtung“ hin zu invasiveren Methoden. Verschiedene Studien belegen für diesen Übergang Unterschiede im Hinblick auf den Behandlungserfolg [56-58].

1.2 Lymphsystem

1.2.1 Aufbau des Lymphsystems

Das Lymphsystem ist wichtiger Bestandteil des Immunsystems. Es besteht aus einem verzweigten Netzwerk aus größeren Lymphgefäßen, kleineren Lymphkapillaren und lymphatischen Organen. Lymphatische Organe werden in primäre und sekundäre lymphatische Organe unterteilt. In den primären lymphatischen Organen – dem Knochenmark und dem Thymus – findet die Reifung der B- und T-Lymphozyten statt. In den sekundären lymphatischen Organen kommt es nach Antigen-Kontakt zu einer Vermehrung der Lymphozyten und zu einer Immunantwort des Körpers. Zu den sekundären lymphatischen Organen zählen das Mukosa-assoziierte-lymphatische-Gewebe (MALT), die weiße Pulpa der Milz sowie die LN [63].

1.2.2 LN-Anatomie

LN gehören zu den Filterstationen des Lymphsystems. Sie sind Ort der Begegnung zwischen dem adaptiven Immunsystem und den Antigenen aus der Lymphe. Es werden regionäre LN und Sammel-LN unterschieden. Weiter gibt es Wächter-LN, die für ein lokal begrenztes Lymphabstrom-Gebiet zuständig sind und für die Metastasen-Bildung eine wichtige Rolle spielen. Regionäre LN bilden die erste Filterstation des jeweiligen Organs. Ihnen nachgeschaltet sind die Sammel-LN, in denen sich die vorgereinigte Lymphe verschiedener regionärer LN vereinigt. Histologisch lassen sich LN von außen nach innen in *Cortex* (B-Zone), Parakortikalzone (T-Zone) und Mark unterteilen (Abb. 2). LN sind von einer bindegewebigen Kapsel umgeben, von der aus Bindegewebszüge (Trabekel) radiär in die Rinde einstrahlen (Abb. 2). Die Lymphe erreicht die LN über die *Vasa afferentia*, die über den Randsinus in den *Intermediärsinus* bis zum Marksinus ziehen, und im Bereich des Hilums die LN über die *Vasa efferentia* wieder verlassen (Abb. 2). Der Sinus besteht aus mesenchymalen Sinuswandzellen, Sinusendothelzellen und retikulären Fasern. Hier befinden sich auch Lymphozyten und Makrophagen [63].

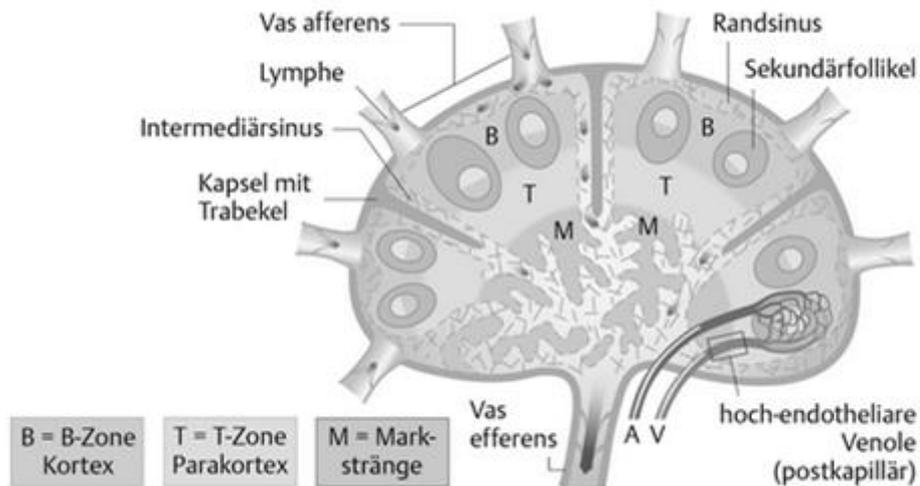


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lymphknoten-Histologie modifiziert nach [63]

A: Arterie, V: Vene

1.2.3 Anatomie der Lymphgefäße

Das lymphatische Gefäßsystem beginnt blind im Interstitium. Es ist zuständig für den Transport von Gewebsflüssigkeit, Proteinen und Zellen. Das lymphatische Kapillarsystem ist im Gegensatz zu Blutgefäßen nicht mit Perizyten ausgekleidet. Es besitzt ein einschichtiges Endothel mit einer diskontinuierlichen Basalmembran [64]. Die lymphatischen Kapillaren sind über Ankerfilamente mit dem umliegenden Gewebe verbunden und werden bei einem Anstieg des Gewebsdruckes geöffnet [65-67]. Lymphkapillaren enden in Lymphsammelgefäßen und diese wiederum in größeren Lymphgefäßen. Die glatten Muskelzellen der Lymphgefäße erlauben einen aktiven Transport der Lymphe. Wie Venen besitzen größere Lymphgefäße Klappen, die einen Rückfluss der Lymphe verhindern [66-68]. Die Wand der Lymphkapillaren kann von Gewebsflüssigkeit, Immunzellen und Tumorzellen passiert werden.

1.2.4 Lymphogene Metastasierung

Laut Studien unterstützt die Lymphangiogenese, d. h. die Bildung neuer Lymphgefäße aus bereits bestehenden Lymphgefäßen, die Tumormetastasierung [69-71]. Die Lymphangiogenese wird durch Tumoren selbst induziert, indem sie lymphangiogene Wachstumsfaktoren sezernieren [72-75]. In malignen Tumoren ist eine

vermehrte Sekretion des *Vascular endothelial growth factors*-(VEGF)-C und VEGF-D mit einer Lymphangiogenese assoziiert. Die tumorassoziierte Lymphangiogenese steht somit möglicherweise im direkten Zusammenhang zur lymphogenen Tumorzellinvasion [69, 76-78]. Da bei invasivem Brustkrebs die peritumorale Zunahme von Lymphgefäßen mit einer Erhöhung der Wahrscheinlichkeit einer lymphogenen Metastasen-Bildung korreliert, wird prognostisch zwischen peritumoraler und intratumoraler Lymphangiogenese unterschieden [79]. Die peritumorale Lymphangiogenese ist bei Brustkrebs ein prognostischer Marker für die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten. Intratumorale Lymphgefäße kollabieren dagegen häufig, oder sind durch Tumorerfiltrate verlegt [80].

1.3 *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1)*

CEACAM1 spielt eine Rolle bei der Zellmorphogenese, bei der Immunabwehr, beim Lipid-Metabolismus, bei viralen und bakteriellen Infektionskrankheiten sowie bei der Angiogenese [81]. CEACAM1 (CD66a [82]) gehört zur *Carcinoembryonic antigen*-(CEA)-Familie [83]. Die 29 humanen CEA-Gene werden anhand ihrer Nukleotidsequenz in drei Untergruppen unterteilt [84]. Die membrangebundenen und stark glykosylierten CEA-Proteine gehören zur Immunglobulin-Superfamilie [85, 86]. CEA-Proteine sind an der Regulation des Immunsystems beteiligt und spielen eine entscheidende Rolle für die Zellerkennung und Zelladhäsion [87, 88]. Über alternatives Splicing und N-Glykosylierung werden verschiedene Isoformen mit vielfältigen zell-kommunikativen/adhäsiven Eigenschaften erzeugt. Zu den Aufgaben der CEACAM-Proteine gehört auch die Regulation des Zellwachstum, wodurch sie auch das Tumorwachstum unterdrücken können [84]. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Isoformen beruhen u. a. auf dem Vorhandensein oder Fehlen einer zytoplasmatischen Domäne. Während die kurze (CEACAM1-S, *short form*) oder lange Variante (CEACAM1-L, *long form*) einen Glycosylphosphat-Inositol-Anker aufweisen, fehlt dieser z. B. bei CEACAM6 [89]. Die CEACAM1-Expression wurden in Studien zur Entwicklung des zentralen Nervensystems und zur Wundheilung analysiert [90]. Die pro-angiogenen Effekte von CEACAM1 wurden *in vitro* an humanen Endothelzellen und *in vivo* mittels *Chorioallantoic Membrane Assay* (CAM-Assay) analysiert, wobei das aus humanen Granulozyten isolierte CEACAM1 als löslicher Faktor appliziert wurde [91]. Das von Gold und Freedmann (1965) entdeckte CEA wurde zunächst als tumorassoziiertes Antigen bei kolorektalen Karzinomen beschrieben [92]. Später wurde eine CEA-Synthese auch

in embryonalem und in gesundem Gewebe nachgewiesen. Die CEA-Konzentration steigt jedoch bei malignen Prozessen im Serum an. Der CEA-Anstieg bei Karzinomen der Lunge, der Brust und des Kolons wird als prognostischer Parameter bei progressiven Karzinomen genutzt [93]. Hixon *et al.* (1985) beschrieben erstmals die Beteiligung von CEACAM1 an der Tumorentstehung. Sie fanden eine verminderte CEACAM1-Expression in Hepatomen [94]. Später wurde dieses Verhalten von CEACAM1 im Rahmen der Tumorprogression auch beim Kolonkarzinom [95], dem PCa [96], dem Endometriumkarzinom [84] und dem Harnblasenkarzinom [97] nachgewiesen. Diese Befunde sprechen für eine tumorsuppressive Funktion von CEACAM1 in epithelialen Geweben [98].

1.3.1 Rolle von CEACAM1 beim PCa

Die CEACAM1-Expression in PCa-Zellen hemmt die Expression angiogener Faktoren [98]. Wenn das Vorkommen von CEACAM1-L in epitheliale Prostatagewebe die Gefäßneubildung unterdrückt, sollte eine Förderung der CEACAM1-L-Synthese das Tumorwachstum einschränken [98].

Hierzu wurden Studien mit verschiedenen Karzinomen unterschiedlicher Stadien durchgeführt. PCa-Studien belegen, dass im fortgeschrittenen Stadium die epitheliale CEACAM1-Expression abnimmt bzw. bei einem *Gleason Score* 5+5 fast komplett verschwindet. Laut Busch *et al.* (2002) geht der epitheliale Verlust von CEACAM1 auf der luminalen Seite der Drüsen mit einer verminderten Expression anderer Zelladhäsionsmoleküle wie E-Cadherin und Occludin einher, wodurch die Zellpolarität verloren geht [96]. Beim PCa mit einem *Gleason-Score* 1–3 ist die luminalen CEACAM1-Expression deutlich erkennbar, die Zellpolarität bleibt erhalten und die Drüsen sind klar voneinander abgegrenzt. Bei einem *Gleason Score* 4–5 ist die luminalen CEACAM1-Expression des Drüsenepithels nur schwach oder gar nicht nachweisbar, das Prostatagewebe zeigt das typische „Drüse in Drüse“ Wachstum und solide Tumorzellnester [96].

Busch *et al.* (2002) [96] konnten durch IHC-Analysen des Proliferationsmarker Ki67 zeigen, dass der CEACAM1-Verlust auf der luminalen Seite des Drüsenepithels mit einem ansteigendem Proliferationspotential einhergeht. Sie schlussfolgerten, dass die luminalen CEACAM1-Präsenz die Proliferationsaktivität des Drüsenepithels inhibiert. Daher eignet sich CEACAM1 als Marker für die Malignität beim PCa [96]. Tilki *et al.* (2006) [99] entdeckten mittels IHC-Untersuchungen an Gewebeschnitten der menschlichen Prostata, dass Blutgefäße in gesundem Prostatagewebe kein CEACAM1

exprimieren. Bereits im PIN-Stadium ist ein Verlust der luminalen CEACAM1-Expression an den neoplastischen Stellen des Epithels zu beobachten und parallel dazu ist ein Anstieg der endothelialen CEACAM1-Expression in den PIN-assoziierten Blutgefäßen nachzuweisen. Ab einem *Gleason-Score* 3, bei dem auch das Epithel der Tumordrüsen eine CEACAM1-Expression aufweist, nimmt die Anzahl CEACAM1-positiver Blutgefäße ab. Bei einem *Gleason-Score* 4–5 exprimiert die Mehrzahl der Tumor-Blutgefäße wieder CEACAM1. Bei einem *Gleason-Score* 5 kommt es zu einem Verlust der Zellpolarität; eine spezifische CEACAM1-Expression ist, außer in einem Teil der Tumorgefäße (Mikrogefäße des PCa-Gewebes) nicht mehr detektierbar. Weiter ist das Verschwinden der luminalen CEACAM1-Expression in den Prostatadrüsen mit einem VEGF-Expressionsanstieg assoziiert. Dieser potente Angiogenesefaktor wird von den Tumorzellen selbst gebildet, wirkt parakrin an den Endothelzellen benachbarter Blutgefäße, fördert die Migration bzw. Proliferation und somit die Bildung neuer Blutgefäße zur Vaskularisierung und zur Versorgung des Tumorgewebes [99].

1.3.2 Rolle von CEACAM1 bei der Angiogenese

CEACAM1 wird im Endothel angiogen aktivierter kleiner Blutgefäße verstärkt exprimiert und spielt bei der Morphogenese neuer Blutgefäße im Rahmen der Angiogenese eine entscheidende Rolle [91, 99, 100]. CEACAM1 induziert nicht nur die Bildung von kleinen Blutgefäßen in Tumoren, sondern ist auch an der Neubildung von Blutgefäßen im Rahmen der physiologischen Angiogenese (z. B. Wundheilung, endometriale Proliferation) beteiligt [91, 101]. CEACAM1 wirkt auf die Lebensdauer mikrovaskulärer endothelialer Zellen. Zellkulturversuche belegen, dass CEACAM1-exprimierende bzw. mit CEACAM1-Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-transfizierte *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells* (HDMECs) eine erhöhte Überlebensrate aufweisen [102]. Weiter beeinflusst CEACAM1 die strukturelle Morphogenese neuer Blutgefäße. In Zellkulturexperimenten bildeten Endothelzellen unter VEGF-Stimulation kapillarähnliche Röhren. Eine Inhibition der CEACAM1-Expression (RNA-Interferenz) reduzierte in Endothelzellen die durch VEGF induzierte Formation kapillarähnlicher Röhrenstrukturen signifikant [100].

1.3.3 Rolle von CEACAM1 bei der Lymphangiogenese

Laut verschiedener Studien spielt neben der Angiogenese auch die Lymphangiogenese bei der Tumorgenese und der Metastasen-Bildung eine Rolle [69, 77, 103, 104]. Die Lymphangiogenese wird durch die Bindung von VEGF-C und VEGF-

D an den Rezeptor VEGFR-3 induziert [105, 106]. CEACAM1 und VEGF fördern gemeinsam die Angiogenese [91, 107-110]. Auf der anderen Seite unterdrückt eine CEACAM1-Überexpression in Epithelzellen des Blasenkarzinoms und des PCa die VEGF-Bildung, während eine verminderte CEACAM1-Expression in diesen Epithelien die Expression pro-lymphangiogener Faktoren (VEGF-C, VEGF-D) fördert [97]. Lymphgefäße exprimieren im gesunden Gewebe Podoplanin (Lymphendothel-Zellmarker), aber kein CEACAM1. Laut CEACAM1- und Podoplanin-Immunfärbungen in frühen prostatistischen Tumorstadien weisen Tumor-assoziierte Lymphgefäße neben einer Podoplanin- auch eine CEACAM1-Expression auf. Weiter wurden in CEACAM1-positiven Lymphgefäßen Tumorzellansammlungen detektiert [125]. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass bereits etablierte Lymphgefäße kein CEACAM1 exprimieren, während angiogen-aktive Tumor-Lymphgefäße CEACAM1 bilden [125].

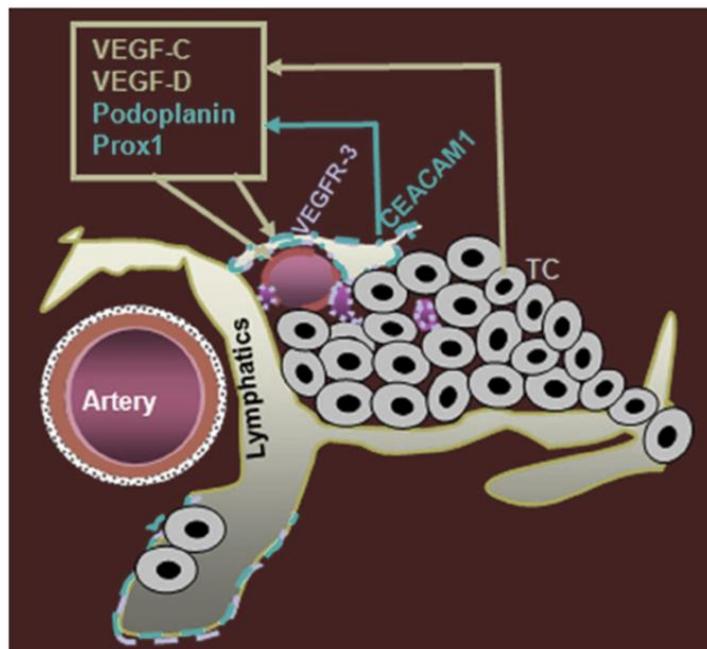


Abbildung 3: Schematische Darstellung der *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1) Expression in kleinen angiogen aktivierten Lymphgefäßen modifiziert nach Kilic *et al.* (2007) [102]

Die endotheliale CEACAM1-Expression (hellblau) in kleinen tumor-assoziierten und angiogen aktivierten Lymphgefäßen (hellblau gestrichelt) wird durch den in Tumorzellen (TC) exprimierten *Vascular endothelial growth factor*-(VEGF)-C und VEGF-D induziert. Die endotheliale Präsenz von CEACAM1 in kleinen Lymphgefäßen fördert wiederum die Expression pro-lymphangiogener Faktoren wie Podoplanin, *Prospero Homeobox 1* (Prox1), VEGF-C, VEGF-D und des Rezeptors VEGFR-3 (violett) [102].

Artery: große Blutgefäße; *Lymphatics*: teilweise stark erweiterte Lymphkapillaren

1.3.4 Rolle von CEACAM1 bei der Tumorzellinvasion

In malignen Melanomen fördert die Fehlregulation von Zelladhäsionsmolekülen vermutlich die Tumorprogression [111]. Bei Melanomen ist eine horizontale Ausbreitung günstiger als eine häufig mit einer Metastasen-Bildung verbundenen vertikalen Ausbreitung [112]. Eine CEACAM1-Expression führt in malignen Melanomen zu einer deutlichen Verschlechterung der Tumorprognose [113]. Bei humanen invasiven Tumoren (z. B. Melanom, Magenkarzinom, Lungenkarzinom) tritt eine CEACAM1-Überexpression auf [84]. Bei humanen malignen Melanomen ist an der Ausbreitungsfront des Tumors die CEACAM1-Expression am stärksten [114]. Die CEACAM1-Expression ist mit einem metastatisch aktiven Prozess assoziiert und wird als unabhängiger prognostischer Parameter genutzt [84].

1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von CEACAM1 bei der lymphogenen Metastasierung des PCa analysiert werden. Dazu wurden an humanem PCa-Prostatagewebe und an histopathologisch beurteiltem humanem PCa-LN-Gewebe immunhistologische Färbungen (CEACAM1, Podoplanin, PSA, CD31, CD34) durchgeführt. Vergleichend dazu wurde das Expressionsmuster genannter Marker in einem *transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate* (TRAMPC1)-Mausmodell überprüft. Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

- Lässt sich eine CEACAM1-Expression auf dem Lymphgefäßendothel bei PCa nachweisen?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der Tumorprogression und dem Lokalisationsmuster von CEACAM1 auf Lymphendothelzellen?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der CEACAM1-Expression und dem Auftreten von Tumorzellen in den LN?
- Beeinflusst die Tumorprogression im Primarius das CEACAM1-Expressionsmuster im LN?
- Begünstigt die CEACAM1-Expression im LN-Gewebe die Metastasenbildung?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen dem PSA- und CEACAM1-Expressionsmuster in PCa-Prostata- und -LN-Gewebe?
- Korrelieren die PSA- und CEACAM1-Expressionsmuster mit dem Malignitätszustand des Gewebes?
- Sind die PSA- und CEACAM1-Expressionsmuster als frühprognostischer Tumorzellmarker geeignet.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Instrumente und Geräte

Instrumente	Firma
Petrischale	Sarstedt
Erlenmeyerkolben 1000 ml	A. Hartenstein
Einbettkassetten	Sarstedt
Deckgläser, 24 x 50 mm	A. Hartenstein
Pipetten	Eppendorf
„Polymerase-Chain-Reaction-(PCR)-Stripes“ 0,2 ml	A. Hartenstein
„Polymerase-Chain-Reaction-(PCR)-Stripes“ Deckel 0,2 ml	A. Hartenstein
Pipettenspitzen	Sarstedt

Geräte	Firma
Keyence® BZ9000 Konfokales Mikroskop	Biorevo Leica
Digitale Präzisionswaage	Kern PLJ
Vortexer	Bender + Hobein AG
Heizblock	Gehrhardt
pH-Meter	A. Hartenstein
Wärmebad	MEDOX Nager GmbH
Durchlicht-Mikroskop	Carl Zeiss 43119126
Geldokumentationsstation	Vilber Lourmat
Mikrotom	Leica
Thermocycler	Applied Biosystems
Elektrophorese-Netzgerät	Consort
Heizschrank	Memmert
Mikrowelle	Panasonic
Rüttler	A. Hartenstein
-20 °C Tiefkühlschrank	Siemens AG
4 °C Kühlschrank	Siemens AG
Einbettautomaten	Leica
Eppendorf Reaktionsgefäße	Sarstedt
Pap Pen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG

2.1.2 Chemikalien

Polymerase Chain Reaction (PCR)	Firma
Agarose	Biozym LE Agarose
„Midori Green Advanced“	NIPPON Genetics Europe GmbH
PCR-Wasser (Reinstwasser) (dH ₂ O)	SIGMA
„Primer“ (Neomycin, NEO)	Eurofins mwg/operon
„Primer“ (<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (mCC1))	Eurofins mwg/operon
PCR-Mastermix	Genaxxon Bioscience
Taq DNA-Polymerase	Life Technologies
Ladepuffer	Fermentas
100 (Basenpaare) bp Leiter	Fermentas

Immunhistologie	Abkürzung	Firma
Destilliertes Wasser	dH ₂ O	Fa. Braun®
Vollentsalztes Wasser	dH ₂ O	Leitung Anat. Inst. Würzburg
Natriumbicarbonat	Na ₂ CO ₃	SIGMA
Natriumhydroxid pH 7,4-7,5	NaOH	Applichem®
Normales Ziegen-Serum	NGS	SIGMA
Normales Kaninchen-Serum	NRS	SIGMA
Normales Esel-Serum	NDS	SIGMA
„bovine serum albumin“	BSA	SIGMA
10 % D-Glukose		Applichem®
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	FLUKA
Nickel(II)Sulfat-Hexahydrat	NiSO ₄ x 6 H ₂ O	VWR Merck
Glukoseoxidase Typ VII (1,2 mg/ml dest. H ₂ O)	GOD Typ VII	SIGMA

3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (22,5 mg/ml)	DAB	SIGMA
Ammoniumsulfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	FLUKA
Wasserstoffperoxid	H_2O_2	Applichem
Aluminiumsulfat-Oktahydrat	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	SIGMA-Aldrich
Essigsäure 100 %		Carl ROTH
Nickel-II-Sulfat Hexahydrat	$\text{NiSO}_4 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	VWR Merck
Paraplast, Histosec® Pastillen	Paraffin	VWR Merck
Natriumchlorid	NaCl	Applichem®
Kaliumchlorid	KCl	Applichem®
Dinatriumhydrogenphosphat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	Applichem®
Dinatriumhydrogenphosphat Wasserfrei	Na_2HPO_4	Applichem®
Kaliumhydrogenphosphat	KH_2PO_4	Applichem®
Zitronensäuremonophosphat	$\text{C}_2\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	Applichem®
Natronlauge	NaOH	Applichem®
Ethylendiamintetraacetat	EDTA	Carl Roth
Ethanol 99,9 % 642	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Norbrand Nordhausen GmbH
Ethanol 96 % 641	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Norbrand Nordhausen GmbH
Ethanol 70 %, 80 %	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Verdünnung aus 99,9 %igen Ethanol
Xylol	C_8H_{10}	VWR Merck
Paraformaldehyd	PFA	Carl ROTH
Depex		Serva
Hämatoxylin		Carl ROTH
4',6'-Diamidin-2-phenylindol	DAPI	Roche
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Applichem®
Kernechtrot		VWR Merck

2.1.3 Kits

Kit	Firma
ABC-Kit	Vectastain

2.1.4 „Software“

„Software“	Verwendung	Hersteller
BZ-II Bildanalyse- „Software“ (BZ-H2AE)	Bildanalyse Programm Keyence	Biorevo
Quantum ST4. v. 16.04	Darstellung der PCR Banden	Vilber
<i>Photoshop CS 5</i>	Bildbearbeitung	<i>Adobe Systems</i>
Image J	Bildbearbeitung	Wayne Rasband
Statistica	Statistische Auswertung	StatSoft
GraphPad Prism	Visualisierung einer Statistik	GraphPad Software

2.1.5 Oligonukleotide

In der zur Genotypisierung der Mäuse durchgeführten PCR wurden die in Tabelle 4 gelisteten Primer eingesetzt.

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide für die *Polymerase-Chain-Reaction* (PCR)

Name	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>	Firma
CEACAM1- wt (mCC1)	5'-CTG CCC CTG GCG CTT GGA-3'	5'-TAC ATG AAA TCG CAC AGT CGC-3'	Eurofins mwg/operon
CEACAM1- ko NEO	5'-GCC GCC AAG CTC TTC AGC AA-3'	5'-CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC-3'	Eurofins mwg/operon

A: Adenin, C: Cytosin, CEACAM1/ mCC1: *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1*, G: Guanin, ko: *knock-out*, NEO: Neomycin, T: Thymin, wt: *Wildtyp*

2.1.6 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden C57BL/6J-Wildtyp-(wt)- und *Black6*-(B6)-CEACAM1-*knock-out*-(mCc1ko) Mäuse verwendet. Die wt-Mäuse wurden von der Firma Harlan erworben. Cc1ko-Mäuse wurden von Nicole Beauchemin generiert [115]. Zudem standen für die differenzierte Analyse der PCa-Entwicklung B6-TRAMPC1-Mäuse [Tg(TRAMP)8247Ng] zur Verfügung, die von Jax. Lab. Stock Nummer 003135 erworben wurden.

Generierung CEACAM1-defizienter Mäuse

Die Generierung der mCc1ko-Mäuse erfolgte durch Nicole Beauchemin [115]. Dabei wurden die beiden ersten Exons von CEACAM1 durch eine Neomycin-(Neo®)-Kassette ersetzt (Abb. 4). Für die Generierung von CEACAM1^{-/-}-Mäusen (Cc1ko) wurden spezifiziert-Pathogen-freie (SPF) heterozygote CEACAM1^{+/-}-Tiere aus der Tierhaltung des Zentrums für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM) der Universität Würzburg miteinander verpaart.

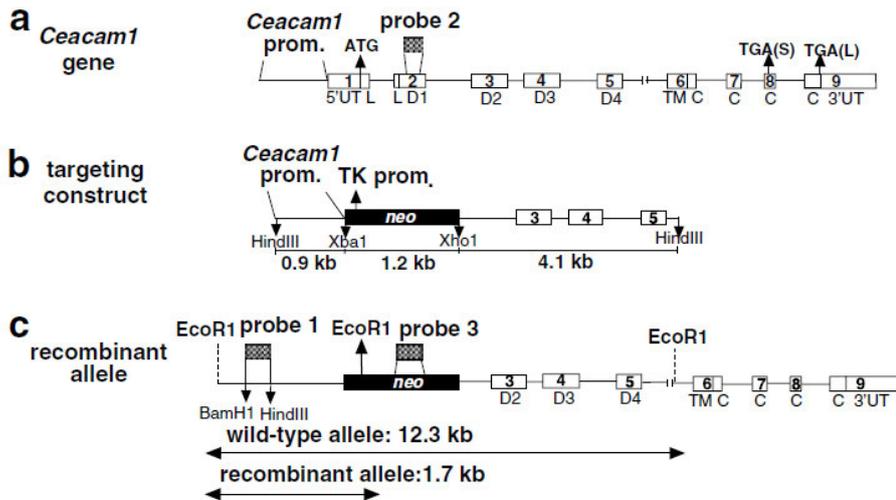


Abbildung 4: Schematische Darstellung des *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1) „knock-out-Konstruktes“ [115].

Durch homologe Rekombination von Exon 1 und 2 durch eine Neomycin-Kassette (neo) wurde das CEACAM1-Gen deletiert.

kb: Kilobasen, TK prom: Thymidin Kinase Promotor

Generierung transgener Mäuse mit spontaner PCa-Entwicklung (TRAMPC1)

Bei den TRAMP-transgenen Mäusen stehen die großen und kleinen Tumor-Antigene (Tag) des *simian virus 40* (SV40) unter die Kontrolle des Ratten-Probasin-Promotors. Greenberg *et al.* publizierten diese Maus erstmals 1995 [116].

2.1.7 Humanes Gewebe

Humanes Prostatagewebe und LN-Gewebe wurden von Frau Prof. Dr. Derya Tilki aus Großhadern, München, Frau Dr. Nerbil Kilic aus der Charité, Berlin und Herrn Prof. Dr. Andreas Rosenwald aus der Pathologie der Universität Würzburg bereitgestellt. Das Gewebe wurde im Rahmen des DFG Projekts „Diagnostische und prognostische Bedeutung von CEACAM1 bei der lymphogenen Metastasierung des Prostatakarzinoms“ mit der Ethiknummer 076-09 ausgewertet. Zur Verfügung standen

humane PCa- und LN-Gewebe von Patienten mit einem *Gleason Score* von G3+3 (pN0) (Kilic), G3+4 (pN0) (Kilic), G3+4 (pN1) (Tilki), G4+5 (pN1) (Tilki) und tumorzellfrei-diagnostiziertes LN-Gewebe von Plattenepithelkarzinom-Patienten, entnommen bei einer Lymphadenektomie („*neck-dissection*“) (Rosenwald). Die Einteilung der Patientenproben erfolgte anhand von „verblindeten“ Präparatelisten. Die in Formalin fixierten Patientenbiopsien wurden für die vorliegende Arbeit eingebettet in Paraffinblöcken zur Verfügung gestellt. Die Paraffinschnitte (4–7 µm) waren mithilfe eines Mikrotoms angefertigt, in einem 40–48 °C warmen Wasserbad gestreckt, auf „Super Frost“-Objektträger aufgezogen und zum Trocknen bei 37°C im Wärmeschrank gelagert worden.

2.1.8 Antikörperliste

Erstantikörper gegen CEACAM1

C5-1X Maus anti-Human (IgG)	selbst aufgereinigter AB Anatomie Würzburg
4D1C2 Maus anti-Human (IgG)	Andrea Horst, Hamburg
mCc1 Maus anti-Maus (IgG)	selbst aufgereinigter AB Anatomie Würzburg

Weitere Erstantikörper

Podoplanin Kaninchen anti-Human (IgG)	Relia Tech #102-PA40L
Podoplanin Schaf anti-Human (IgG)	Relia Tech #102-PA40
CD31 (Endothelzellmarker) Kaninchen anti-Human (IgG)	abcam #ab28364
CD34 (Endothelzellmarker) Maus anti-Human (IgG)	Dako #FAB7227G
PSA Schaf anti-Human & anti-Maus (IgG)	Serotec #7820-0154
SV40 Kaninchen anti-Maus (IgG)	Santa Cruz #sc-20800

Zweitantikörper

Ziege anti-Hamster syrisch biotinyliert (IgG)	Dianova #107-065-142
Ziege anti-Maus biotinyliert (IgG)	Dianova #115-065-100
Ziege anti-Kaninchen IgG biotinyliert	Vector #BA-1000
Ziege anti-Kaninchen IgG biotinyliert	Vector #BA-9400
Ziege anti-Maus (Indocarbocyanin) Cy3 (IgG)	Dianova #115-165-003
Ziege anti-Kaninchen Indocarbocyanin (Cy3) (IgG)	Dianova #111-165-003

Ziege anti-Ratte Indocarbocyanin (Cy3) (IgG)	Dianova #112-165-003
Kaninchen anti-Maus biotinyliert (IgG)	DAKO #E0354
Peroxidase- anti-Peroxidase (PAP) Kaninchen	Dianova #323-005-024
Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) Maus	Dianova #223-005-024
Esel anti-Schaf DyLight 650 (IgG)	abcam #ab96942
Esel anti-Schaf biotinyliert (IgG)	Dianova #713-065-003
Streptavidin-Alexa-555	Invitrogen #S21381

2.2 Lösungen und Puffer

2.2.1 Lösungen für die Genotypisierung von Mäusen

Substanz/ Menge/ pH	Zusammensetzung	
	Substanz	Menge
„Tail-Juice“	50 mM EDTA	10 ml
	pH 9,0	
	50 mM TRIS pH 8,0	5 ml
	0,5 % SDS	2,5 ml
	dH ₂ O	82,5 ml
1,5 % Agarose	Agarose	1,8 g
	1 x TAE Puffer	in 120 ml dH ₂ O in der Mikrowelle lösen
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) pH 8.3	TRIS	242,2 g
	EDTA	18,61 g
	Eisessig	57,1 ml

2.2.2 Lösungen für Immunhistologie

Substanz/ Menge/ pH	Zusammensetzung	
	Substanz	Menge
<i>Phosphate buffered saline</i> PBS; pH 7,2–7,4)	NaCl	40,03 g
	KCl	1 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,5 g
	KH ₂ PO ₄	1 g
	dH ₂ O	auffüllen auf 5 l
0,1 M <i>Phosphate buffer</i> (PB, pH 7,4)	KH ₂ PO ₄	4,9 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	29,2 g
	dH ₂ O	auffüllen auf 2 l
	5 N HCl	pH-Korrektur bei Bedarf

10 mM Citrat-Puffer (pH 6,0)	0,1 M Zitronensäure 0,1 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat dH ₂ O 1 N NaOH	18 ml 82 ml auffüllen auf 1 l pH-Korrektur bei Bedarf
Hämatoxylin nach Mayer	Hämatoxylin dH ₂ O Natriumjodat reines Kalialaun + Chloralhydrat kristallisierte Zitronensäure	1 g lösen in 1 l 0,2 g 50 g (blau-violett) 50 g 1 g (rot-violett)
Eosin 0,1 %	Eosin dH ₂ O Eisessig	0,1 g 100 ml 25 µl ansäuern
TRIS-EDTA, pH 9,0	dH ₂ O 1 M TRIS EDTA pH 9.0	90 ml 10 ml 2 ml
N-Propylglykol (NPG)	N-Propylgallat PBS (flüssig) Glycerol	0,3 g 8 g 20 g
Proteinkinase K (20 mg/l)	Proteinkinase K dH ₂ O	0,2 g 10 ml
0,1 % Kernechtrot in wässriger 5 % Aluminiumsulfat-Lösung	Kernechtrot 5 % Aluminiumsulfat-Lösung	0,2 g in 200 ml
5 % Aluminiumsulfatlösung	Aluminiumsulfat dH ₂ O	5 g 1000 ml
DAB-Entwicklungslösung	PB NiSO ₄ x 6 H ₂ O (4 °C) Glukose 10 % (-20 °C) NH ₄ Cl 3,3-Diaminobenzidin-(DAB) (-20 °C) Glukoseoxidase (GOD) (-20 °C)	67,5 ml 1350 µl 1350 µl 150 µl 1,5 ml 225 µl

2.3 Methoden

2.3.1 Immunhistochemie (IHC)

Das Prinzip von IHC-Färbungen beruht auf der spezifischen AB-Bindung an Antigene. Mittels IHC-Färbung kann das Vorkommen spezifischer Proteine in Geweben mikroskopisch analysiert werden.

AB sind Immunglobuline (Ig), die in verschiedene Klassen (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) eingeteilt werden. Mit ungefähr 70 % stellt IgG das häufigste Ig im Menschen dar. Im Zuge der spezifischen Immunabwehr werden AB von B-Lymphozyten (Plasmazellen) produziert und sezerniert. AB erkennen Strukturen körperfremder Antigene (Epitop, z. B. bei proteinogenen Antigenen eine Aminosäuresequenz). Als Glykoproteine bestehen AB aus Protein- (82–96 %) und Kohlenhydratanteilen (4–18 %). AB enthalten jeweils zwei schwere und leichte, über Disulfidbrücken miteinander verbundene Polypeptidketten. Schematisch lassen sich AB als Y-ähnliche Form darstellen (Abb. 5).

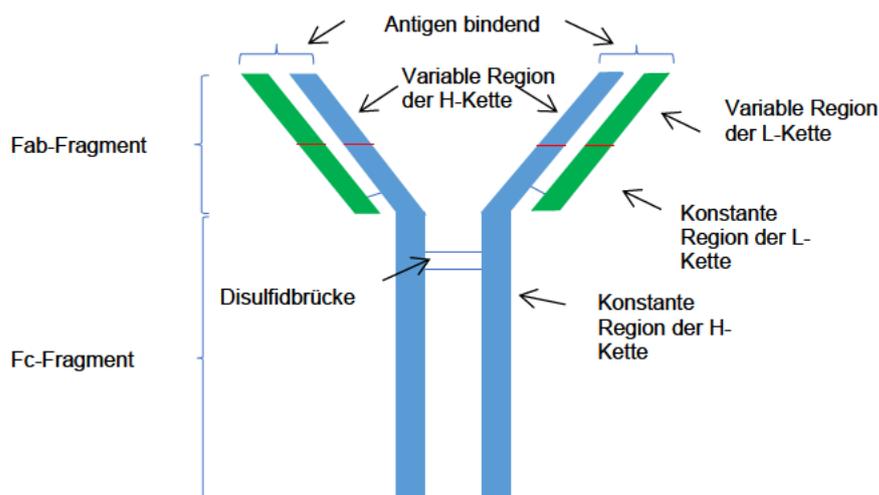


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers

Das Fab-Fragment besteht aus der leichten Kette (L, *light*, grün) und Teilen der schweren Kette (H, *heavy*, blau). Das Fc-Fragment wird aus Teilen der konstanten Region der H-Kette gebildet. Leichte und schwere Ketten, sowie die beiden schweren Ketten der konstanten Region sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Funktionell ist das Fab-Fragment für die Antikörperbindung und der Fc-Anteil für die Effektorfunktion zuständig.

Die leichten Ketten bilden zusammen mit Teilen der schweren Ketten das Fab-Fragment (Antigen bindendes Fragment). Innerhalb der Fab-Fragmente befindet sich eine Region mit einer stark ausgeprägten Hypervariabilität (Antigen-bindende Region), die die AB-Vielfalt ermöglicht. Das durch Teile der schweren Ketten gebildete Fc-Fragment (kristallisierbares Fragment; Abb. 5) vermittelt die biologische AB-Aktivität, beispielsweise durch Bindung an Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen

oder durch Bindung von Komplementfaktoren. Bei der ICH bindet hier der mit einem Chromophor oder Enzym gekoppelte Zweitantikörper.

Polyklonale AB sind gegen verschiedene Epitope des selben Antigens gerichtet. Sie werden durch verschiedene Plasmazell-Klone gebildet. Polyklonale AB werden durch Injektion von spezie fremden Antigenen in Tiere gewonnen. Die daraufhin gebildeten Antigen-spezifischen AB werden nach der Blutentnahme aufgereinigt. **Monoklonale AB** erkennen spezifisch nur ein Epitop des zur Immunisierung verwendeten Antigens. Monoklonale AB werden von einem Plasmazellklon gebildet. Für die Herstellung von monoklonalen AB wird eine solche Plasmazelle mit einer Myelomzellen fusioniert und somit immortalisiert. Diese Hybridomzellen werden zur Herstellung von monoklonalen AB kultiviert.

Bei IHC-Färbungen werden zwei Methoden unterschieden. Bei der **direkten Methode** werden die Primär-AB direkt mit einem Enzym oder einem Fluorochrom gekoppelt. Bei der **indirekten Methode** wird ein gegen das Fc-Fragment des Primär-AB gerichteter Sekundär-AB verwendet (Abb. 6). Der Sekundär- oder eventuelle Tertiär-AB ist mit dem Chromophor oder dem Enzym gekoppelt. Der Vorteil dieser Methode ist die höhere Intensität und Sensibilität der Färbung.

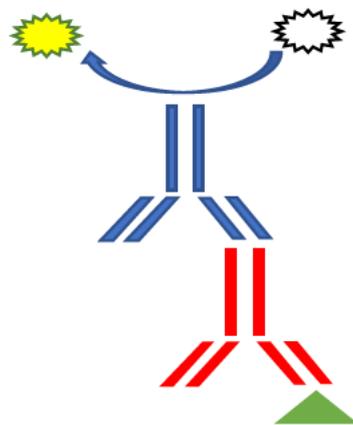


Abbildung 6: Indirekte Methode der immunhistochemischen-(IHC)-Färbung mit einem Chromophor

Der Primär-Antikörper (AB) (rot) bindet an das Antigen (grün). Der Sekundär-AB (blau) ist an ein Chromophor (schwarz, keine Füllfarbe) gekoppelt. Der Sekundär-AB bindet an den Fc-Teil des Primär-AB. Durch Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge wird das Chromophor und somit das AB-gebundene Antigen über das emittierte Licht mikroskopisch sichtbar (gelb) gemacht.

Die für die IHC-Färbung verwendeten Primär-AB sollten eine möglichst hohe Affinität zu ihrem Antigen besitzen. In einigen Fällen binden AB erst nach einer Vorbehandlung des Präparates (Demaskierung bzw. *Antigen-Retrival*).

Das vom Fluorochrom emittierte Licht wird im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Bei biotinylierten Sekundär-AB erfolgte die IHC-Detektion mittels Avidin-Enzymkomplexen und entsprechenden Substraten (s. Kap. 2.3.2).

2.3.2 3,3-Diaminobenzidin-(DAB)-Färbung

DAB ist ein Substrat der Meerrettich-Peroxidase. Das in Wasser unlösliche, braune Reaktionsprodukt kann im Rahmen der IHC mikroskopisch nachgewiesen werden. Um das IHC-Signal zu verstärken, wurden in der vorliegenden Arbeit biotinylierte Sekundär-AB (vier Biotinmoleküle/Sekundär-AB) und Streptavidin-Peroxidase-Komplexe verwendet (ABC-Methode). Dabei interagieren mehrere Streptavidin-Peroxidase-Komplexe mit dem Sekundär-AB (Abb. 7).

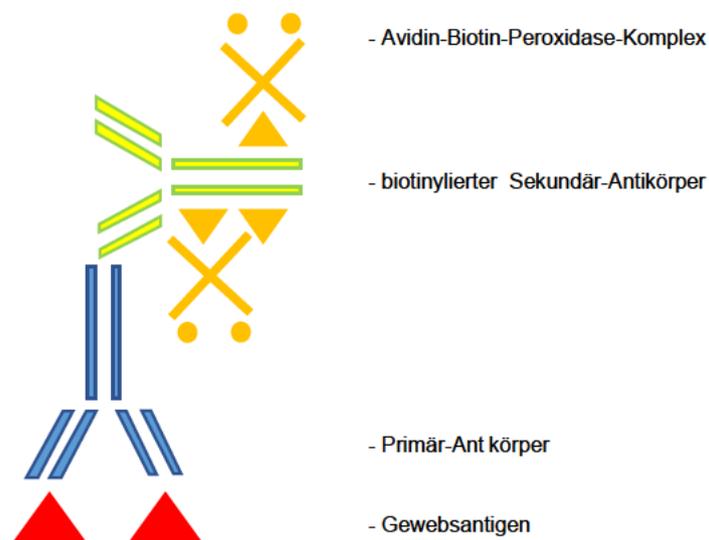


Abbildung 7: Indirekte Immunhistochemie mit der 3,3-Diaminobenzidin-(DAB)-Methode. Der Primär-Antikörper (AB) (blau) bindet an das gewebespezifische Antigen (rot). Der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (orange) bindet an den biotinylierten Sekundär-AB (gelb). Die Peroxidase setzt DAB zu einem braunen Präzipitat um, das mikroskopisch nachgewiesen werden kann.

2.3.3 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Die HE-Färbung ist eine weit verbreitete Routinefärbung für die morphologische Analyse von Gewebepreparaten. Bei der Übersichtsfärbung werden zwei Farbstoffe verwendet. **Hämatoxylin** ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum. Das daraus hergestellte Hämalaun bindet an Nukleinsäuren und ist ein in der Histologie gebräuchlicher Kernfarbstoff. Der synthetische saure Farbstoff **Eosin** färbt basische/azidophile (eosinophile) Strukturen, wie Zellplasmaproteine, rot.

Färbeprotokoll

Für die HE-Färbungen wurden humane Prostata- und LN-Präparate in Paraffin mit einer Schnittdicke von 0,4–0,7 µm verwendet. Für die Entparaffinierung wurden die Gewebepreparate in Xylol (2 x je 10 min) und danach in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x Ethanol p. a. je 5 min, 96 % Ethanol 5 min, 80 % Ethanol 5 min, 70 % Ethanol 5 min) inkubiert. Abschließend erfolgte eine Inkubation für ca. 5 min in dH₂O. Für die HE-Färbung wurden die Gewebepreparate für 10 min mit Hämalaun inkubiert und danach 10 min mit Leitungswasser gewaschen. Danach wurden die Präparate 10 min in 0,1 % Eosin-Lösung inkubiert und anschließend mit dH₂O gewaschen. Die Gewebefixierung erfolgte nach Entwässern der Proben (70 % Ethanol 1 min, 80 % Ethanol 1 min, 96 % Ethanol 1 min, Ethanol p.a. 2 x je 3 min, Xylol 2 x je 5 min) mit Depex.

2.3.4 Kernechtrot

Kernechtrot sorgt für eine Rotfärbung der Zellkerne. Für die Herstellung der Kernechtrot-Lösung wurden 0,2 g Kernechtrot in 200 ml einer 5 % Aluminiumsulfat-Lösung gelöst. Dazu wurde die Aluminiumsulfat-Lösung in einem Erlenmeyerkolben auf ca. 56–60 °C erhitzt und anschließend das Kernechtrot hinzugefügt. Die Lösung wurde lichtgeschützt aufbewahrt und nach ca. 2 Wochen filtriert. Die Lösung ist etwa ein Jahr bei RT haltbar. Für die Gebrauchslösung wurden die Kernechtrotlösung mit 1–2 Tropfen Eisessig pro 100 ml angesäuert (1 Tropfen entspricht ca. 25 µl).

Färbeprotokoll

Kernechtrot-Färbungen zur Darstellung der Zellkerne wurden im Rahmen der DAB-Färbung durchgeführt 0,4–0,7 µm dicke, humane Prostata- oder LN-Paraffinschnitte wurden nach der DAB-Färbung in PBS gestoppt und für 1 min mit der Kernechtrot-Lösung inkubiert. Danach wurden die Präparate für 7 min unter fließendem Leitungswasser gewässert, anschließend entwässert (70 % Ethanol 1 min, 80 % Ethanol

1 min, 96 % Ethanol 1 min, Ethanol p. a. 2 x je 3 min, Xylol 2 x je 5 min) und mit Depex eingedeckt.

2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der mikroskopischen Immunfluoreszenz-Analyse wird das von Quecksilber- oder Halogendampflampen abgegebene gesamte sichtbare Lichtspektrum durch einen optischen Filter (Anregungsfilter) geleitet, der das Licht ausschließlich in den für die Anregung des Fluorochroms spezifischen Wellenlängen durchlässt. Für diese Arbeit wurde das Fluoreszenzmikroskop „Keyence BZ 9000 verwendet. Hierdurch war es möglich, Doppel-Immunfärbungen zu analysieren. Folgende Fluoreszenzfarbstoffe wurden verwendet:

Indocarbocyanin (Cy3)	rotfluoreszierend
Indocarbocyanin (Cy5)	rotfluoreszierend (langwellig)
Streptavidin Alexa 488 (Cy2)	grünfluoreszierend

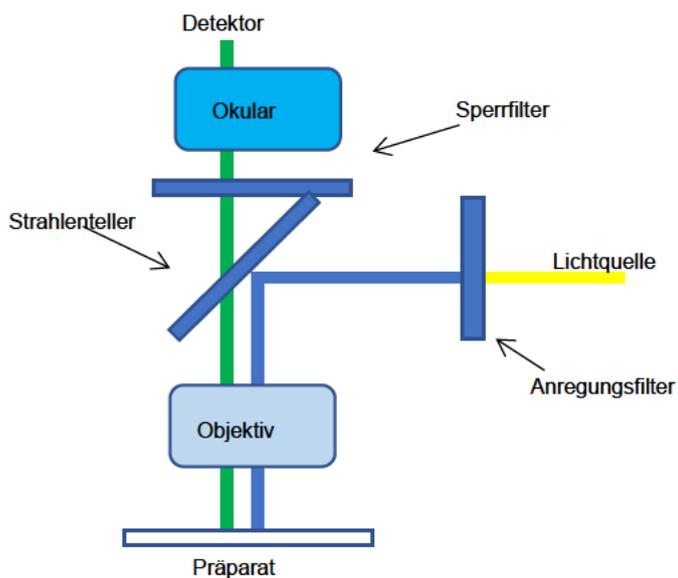


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops

2.3.6 Färbeprotokolle

Folgende Schritte wurden durchgeführt:

- Die **Entparaffinierung** erfolgte in Xylol (2 x 10 min) und dann in absteigender Alkoholkonzentration (2 x 10 min in Ethanol p. a., jeweils 5 min in 96 %, 80 %, 70 % Ethanol). Danach wurden die Präparate für 5 min in dH₂O gewässert.
- Zur Vermeidung starker Hintergrundfärbungen bei der DAB-Entwicklung wurden Gewebeperoxidasen mit Wasserstoffperoxid gesättigt, indem die Schnitte auf dem Rüttler für 10 min bei RT in 3 % Wasserstoffperoxid aus einer 30 %igen Stammlösung inkubiert wurden. Dieser **endogene Peroxidaseblock** wurde nur bei der DAB-Färbung durchgeführt.
- Die **Demaskierung** („*Antigen-Retrieval*“) von in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten legt nach einer Formalinfixierung möglicherweise veränderte („*maskiert*“) Epitope frei und macht Gewebe zugänglicher für den Primär-AB. Die saure Demaskierung in 10 mM Natriumcitrat-Puffer pH 6,0 erfolgte 6–10 min in der Mikrowelle, während die alkalische Demaskierung in 10 mM Tris EDTA, pH 8,0 nach Aufkochen in der Mikrowelle für 10 min bei 90 °C im Inkubationsofen durchgeführt wurde. Nach der Demaskierung wurden die Gewebeschnitte für ca. 30 min bei RT abgekühlt. Danach wurden die Schnitte für 10 min unter fließendem dH₂O gespült.
- Zur Vermeidung von Hintergrundfärbungen durch unspezifische Bindungen der Sekundär-AB erfolgte eine **Blockade**, indem die Schnitte 1 h in einer feuchten Kammer bei RT in 5 %-igem Blockserum (aus dem Serum des Sekundär-AB) inkubiert wurden.
- Für die IHC-Färbungen wurden die Schnitte auf den Objektträgern über Nacht mit dem **Primär-AB** in 0,2 % BSA/5 % Serum in PBS im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert (s. Tab. 5). Danach wurden die Schnitte zur Entfernung des Primär-AB mit PBS gewaschen (3 x 5 min auf dem Rüttler in einer Küvette).
- Danach wurden die Schnitte mit dem **Sekundär-AB** in 1 % Blockserum/PBS für 60 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert (s. Tab. 5).
- Danach erfolgte eine Inkubation mit einem PAP-Komplex bestehend aus zwei AB gegen Peroxidase und drei Peroxidase-Molekülen. Der Fc-Anteil der AB gegen die Peroxidase wird vom Sekundär-AB erkannt. Die **PAP-Methode** dient der Signalverstärkung. Die Inkubation mit PAP erfolgte nach der Sekundär-AB-Inkubation für 1 h bei RT.

- Danach wurden die Präparate, wenn eine **DAB-Färbung** geplant war, mit dem **Avidin-Biotin-Komplex** (AB-Komplex; 0,02 µl AB-Komplex je µl PBS) für 30 min inkubiert. Die AB-Komplexlösung reifte vor der Inkubation für 30 min bei RT im Dunkeln (0,02 µl AB-Komplex = 0,01 µl Lösung A + 0,01 µl Lösung B). Für **DAB-Entwicklung** wurden 67,5 ml PB-Puffer, 1350 µl Nickelsulfat, 1350 µl Glukose (10 %), 150 µl Ammoniumchlorid und 1,5 ml DAB in einer lichtundurchlässigen Heldal-Küvette gemischt. Um einen verfrühten Start der Reaktion zu vermeiden, wurden erst kurz vor der Entwicklung 225 µl Glukoseoxidase zugegeben. Die in PBS gewaschenen Schnitte wurden 15–30 min mit der Lösung inkubiert. Nach dem Stopp der Reaktion mit PBS wurden die Schnitte in Kernechtrot (ca. 1 min) oder Hämalaun (ca. 5 min) gegengefärbt.
- Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol 1 min, 80 % Ethanol 1 min, 96 % Ethanol 1 min, Ethanol p.a. 2 x je 3 min, Xylol 2 x je 5 min) zum Entwässern der Schnitte wurden mit Depex eingedeckt. Die Lagerung erfolgte bei RT.

Für jede Färbung wurde die Primär-AB-Konzentration und die Demaskierung vor den eigentlichen Versuchen mittels DAB-Methode optimiert. Bei der **Fluoreszenzfärbung** wurden Fluorochrom-gekoppelte Sekundär-AB oder biotinylierte Sekundär-AB, die in einem weiteren Schritt mit einem Fluorochrom gekoppelt wurden, verwendet. Die Gewebeschnitte wurden bei einer Immunfluoreszenzfärbung nicht entwässert und deshalb nach einer DAPI-Kern-Gegenfärbung mit N-Propylglykol (NPG) eingedeckt. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln bei 4–8 °C.

Bei den Doppel-Immunfärbungen wurden zwei Antigene auf einem Schnitt entweder als Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung oder als kombinierte DAB-Fluoreszenzfärbung dargestellt.

Tabelle 5: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper mit eingesetzter Verdünnung, Demaskierung, Blockierung

Primärer AB, Verdünnung (Firma)	Sekundärer AB, Verdünnung (Firma)	Demaskierung	Blockserum
CD31 <i>rabbit α-human</i> , 1:25 (Santa Cruz)	<i>Goat-α-rabbit</i> 1:1600 (Dianova) Cy3,	6 min Citrat	1 h 5 % NGS

C5-1X <i>mouse</i> α - <i>human</i> , 1:50 (Essen)	<i>Goat-α-mouse</i> 1:250, 1:2500 (Dianova)	Biotin,	6 min Citrat	1 h 5 % NGS
4D1C2 <i>mouse</i> α - <i>human</i> , 1:200 (A. Horst)	<i>Goat-α-mouse</i> 1:250, 1:2500 (Dianova)	Biotin,	6 min Citrat	1 h 5 % NGS
CD34 <i>rat</i> α - <i>human</i> , 1:50 (Abcam)	<i>Goat-α-rat</i> 1:2500 (Vector)	Biotin, 1:800,	6 min Citrat	1 h 5 % NGS
Podoplanin <i>rabbit</i> α - <i>human</i> , 1:25 (Relia Tech)	<i>Goat-α-rabbit</i> 1:2500 (Vector)	Biotin,	6 min Citrat	1 h 5 % NGS
PSA <i>sheep</i> α - <i>human</i> , 1:1000 (ABD Serotech)	<i>Donkey-α-sheep</i> 650, 1:250 (Abcam)	DyLight	6 min Citrat	1 h 5 % NDS
PSA <i>rabbit</i> α - <i>human</i> , 1:1000 (Abcam)	<i>Goat-α-rabbit</i> 1:250 (Vector)	Biotin,	6 min Citrat	1 h 5 % NGS
SV40 <i>rabbit</i> α - <i>mouse</i> , 1:50 (Santa Cruz)	<i>Goat-α-rabbit</i> 1:250 (Vector)	Biotin,	6 min Citrat	1 h 5 % NGS 0,1 % Triton X- 100
mCc1, 1:100 (Anatomie Würzburg)	<i>Goat-α-mouse</i> +Maus PAP 1:250 + 1:500 (Dianova)	Biotin	6 min Citrat	1 h 5 % NGS

α : anti, CD31/CD34: Endothelzellmarker, Cy3: Indocarbocyanin, mCc1: CEACAM1-Antikörper für Mäuse
NDS / NGS / NKS: normales Esel / Ziegen / Kaninchen Serum, PSA: Prostata-spezifisches Antigen, SV40:
simian virus 40, PAP: Peroxidase- anti Peroxidase,

2.3.7 Genotypisierung mit Hilfe der PCR

Die PCR-Ansätze hatten ein Gesamtvolumen von 30 μ l, bestehend aus 15 μ l PCR-Mastermix (auf Eis pipettiert) und 5 μ l, 10 μ l und 15 μ l des 1:20 verdünnten Biopsielysats. Die Differenz zum Gesamtvolumen wurde mit dH₂O aufgefüllt (s. Tab. 6).

Tabelle 6: Pipettierschema für den *Polymerase-chain-reaction*-(PCR)-Mastermix

Mastermix					
dH₂O	10 x PCR-Puffer + 15 mM MgCl₂	2 mM dNTP-Mix	<i>Forward Primer</i> 20 pmol	<i>Reverse Primer</i> 20 pmol	DNA Polymerase
9,05 µl	3 µl	0,6 µl	1 µl	1 µl	0,35 µl

dH₂O: doppelt entsalztes Wasser; DNA: Desoxyribonukleinsäure; dNTP: Desoxynukleotidtriphosphate

Der Nukleotidmix (dNTP-Mix) bestand aus den Nukleotiden Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Desoxycytosintriphosphat (dCTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP). Die *Primer* der PCR-Reaktion wurden jeweils in einer Endkonzentration von 20 pmol eingesetzt. Das Pipettieren der Ansätze erfolgte in der Reihenfolge PCR-Mastermix, *DNA-Template* (verdünntes Lysat) und zum Schluss das Enzym. Die PCR (s. Tab. 7) wurde unmittelbar daran anschließend durchgeführt.

Tabelle 7: Polymerase-chain-reaction-(PCR)-Programme

Programm	Temperatur	Neomycin (NEO)	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (mCC1)	
Länge des Amplifikats		~249 bp	~550 bp	
Initialdenaturierung	3 min	94 °C	94 °C	
DNA-Denaturierung	30 sec	94 °C	94 °C	30 Zyklen
Hybridisierung	30 sec	62 °C	62 °C	
Elongation	30 sec	72 °C	72 °C	
	10 min	72 °C	72 °C	
	unendlich	4°C	4°C	

2.3.8 Auswertung der PCR durch horizontale Gelelektrophorese

Die PCR-Amplifikate wurden mittels 1,5 %-iger Agarose-Gele analysiert (s. Kap. 2.1.6.3). Agarose ist ein aus Rotalgen gewonnenes Polysaccharid aus D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose. In Abhängigkeit von der Größe der erwarteten DNA-Fragmente wird die Agarose in unterschiedlichen Konzentrationen (kleinere Fragmente / höhere Konzentrationen) eingesetzt, um eine gute Auftrennung zu gewährleisten. Für ein 1,5 %-iges Agarose-Gel wurden 1,8 g Agarose in 120 ml 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach dem Abkühlen wurden 1 µl „*MidoriGreen Advanced*“ je 10 ml Agarose zugefügt. Das Agarose-Gel härtete anschließend in einem Gelträger mit Kamm (Ausparung der Auftragstaschen) bei RT oder 4–8 °C aus. Die Gele konnten in einer Plastikhülle, im feuchten Zustand über mehrere Tage bei 4–8 °C gelagert werden. Das Agarose-Gel wurde zum Beladen mit den PCR-Proben in eine mit 1 x TAE-Puffer befüllte Gelelektrophorese-Kammer platziert. Nach Entnahme des Kamms wurden die Auftragstaschen mit den DNA-Proben und einem DNA-Größenstandard (100 bp Leiter) beladen. Dabei wurde darauf geachtet, dass ein Überlaufen der Auftragstaschen vermieden wurde. Die Elektrophorese erfolgt bei 120 V/300 mA für ca. 30–40 min, um eine ausreichende Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe im Gel zu gewährleisten. Anschließend wurde das Agarose-Gel in eine Gel-Dokumentationskammer positioniert und die DNA durch den interkalierten Fluoreszenzfarbstoff (*Midori-Green Advanced*) nach UV-Anregung visualisiert. Zu Dokumentationszwecken wurden die fluoreszierenden Agarose-Gele digitalisiert. Neben den zu analysierenden DNA-Proben wurden immer Positiv- (Lysate

aus wt- bzw. CC1ko-Mäusen) und Negativ-Kontrolle (PCR-Mastermix + dH₂O) parallel auf demselben Gel analysiert.

2.3.9 Genotypisierung der Mäuse

Die Genotypisierung von mCc1ko-Mäusen erfolgte 3–4 Wochen postnatal über eine PCR mit aus Schwanzbiopsien gewonnener DNA (s. Abb. 9 und Tab. 8).

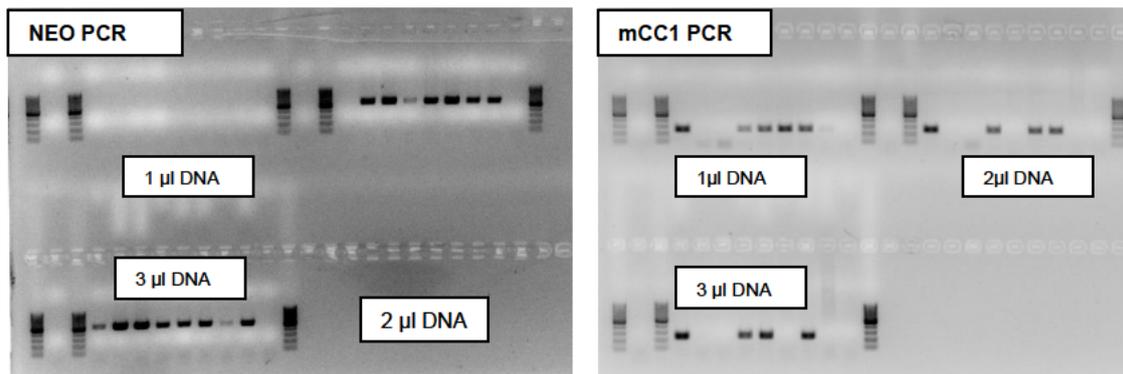


Abbildung 9: Polymerase-Chain-Reaction (PCR) zur Genotypisierung der Versuchstiere

Agarosegel einer Neomycin-(NEO)-PCR (links) und einer *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1*-(mCC1)-PCR (rechts). Mithilfe beider PCRs lässt sich feststellen, ob es sich bei den Versuchstieren um homozygote oder heterozygote Mäuse handelt. Zur Abschätzung der Amplifikatgröße diente als Größenmarker eine 100 (Basenpaare) bp Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Leiter. Innerhalb der 100 bp DNA-Leiter entspricht die verstärkt auftretende Bande der 500 bp-Bande. Die Amplifikate wurden in drei Konzentrationen analysiert (1 µl, 2 µl bzw. 3 µl DNA).

Tabelle 8: Ladeschema für die Polymerase-Chain-Reaction-(PCR)-Gele aus Abb. 5

Ladeschema	Neomycin-(NEO)-PCR	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> -(mCC1)-PCR
Leiter	X	X
Wasserprobe	X	X
Leiter	X	X
Wildtyp-Probe	X	wt-Positivkontrolle
knock-out-Probe	„knock-out“-Positivkontrolle	X
Probe 1	„knock-out“	„knock-out“
Probe 2	heterozygot	heterozygot
Probe 3	heterozygot	heterozygot
Probe 4	„knock-out“	„knock-out“

Probe 5	heterozygot	heterozygot
Probe 6	„knock-out“	„knock-out“
Probe 7	„knock-out“	„knock-out“
Leiter	X	X

2.4 Histologische Auswertungen

Die lichtmikroskopischen Auswertungen und die Auswertungen der mit fluoreszierenden AB markierten Schnitte wurden mit Hilfe eines invertiertem Fluoreszenz-/Phasenkontrastmikroskops von Keyence (BZ-9000) durchgeführt. Dabei wurden Objektive (Nikon) zur 10-, 20- und 40-fachen Vergrößerung verwendet. Mehrfachfärbungen wurden mittels *BZ-Analyser II* übereinander gelagert (*merge*) und auf eine mögliche Kollokalisierungen hin überprüft. Die Auswertung der Cc1/CD31-Doppel-Immunfluoreszenzfärbung an humanem PCa-Prostatagewebe und die Cc1/Podoplanin-Doppel-Immunfluoreszenzfärbung an humanem LN-Gewebe erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop von Leica mit einem 20-x-Objektiv. Folgende Versuchsreihen wurden durchgeführt:

Etablierung des Nachweises von CEACAM1

Die optimalen Bedingungen (CEACAM1-AB-Konzentration (C5-1X), optimale Demaskierungsmethode) wurden über DAB-Färbungen an humanem Prostata- und LN-Gewebe etabliert. Tests mit einem weiteren AB gegen das humane CEACAM1 (4D1C2) ergaben keine besseren Ergebnisse.

CEACAM1- und CD31-Expression in PCa

Zur Bestätigung der von Tilki *et al.* (2006) [99] nachgewiesenen CEACAM1-Expression auf dem Endothel kleiner Blutgefäße beim PCa wurden Doppel-Immunfluoreszenz-Analysen von CEACAM1 und dem Endothelzellen-Marker CD31 an PCa-Prostatagewebe mit einem *Gleason Score* (G) von $G \leq 7$ und $G > 7$ durchgeführt. Die gefärbten Schnitte wurden freundlicherweise von Tanja Reimer (Medizinisch-Technische Angestellte) und Dr. Verena Pfeiffer aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie in Würzburg zur Verfügung gestellt.

CEACAM1- und Podoplanin-Expression in PCa

Zur Analyse des potentiellen Zusammenhangs des PCa-Stadiums und der Lymphangiogenese wurden Prostatapräparate von Patienten mit einem *Gleason Score* $G \leq 7$ und $G > 7$ immunhistologisch mit einem AB gegen das humane CEACAM1 (C5-1X) und einem AB gegen den Lymphendothelmarker Podoplanin angefärbt und quantitativ analysiert. Dazu wurden >20 Lymphgefäße je Patient auf einem Prostatagewebeschnitt in verschiedenen Arealen (Tumorumgebung (*Tumor surrounding*, T.s.), PIN-Areale, G3-Areale (G3+3), G4-Areale (G4+4) und G5-Areale (G5+5) untersucht. Die gefärbten Schnitte wurden freundlicherweise von Frau Dr. Heike Bömmel vom Institut für Anatomie und Zellbiologie in Würzburg zur Verfügung gestellt. Die quantitative Analyse wurde teilweise von Frau Dr. Verena Pfeiffer unterstützt.

CEACAM1-Expression in PCa-LN

Zur Analyse des potentiellen Zusammenhangs von metaplastischen Veränderungen der LN und einer verstärkten CEACAM1-Expression wurden PCa-LN-Präparate von Patienten mit einem $G \leq 7$ (pN0), $G \leq 7$ (pN1) und $G > 7$ (pN1) immunhistologisch mit einem AB gegen das humane CEACAM1 (C5-1X) angefärbt und analysiert.

CEACAM1- und CD31-Expression in PCa-LN

Zur Analyse der potentiell verstärkten Expression von CEACAM1 in angiogen aktivierten Blutgefäßen in PCa-LN-Gewebe wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von CEACAM1 und dem Endothelzellmarker CD31 bei Geweben von Patienten mit einem $G \leq 7$ (pN1) und $G > 7$ (pN1) durchgeführt. Die gefärbten Schnitte wurden freundlicherweise von Tanja Reimer (Medizinisch-Technischen Angestellte) und Dr. Verena Pfeiffer aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie in Würzburg zur Verfügung gestellt.

CEACAM1- und Podoplanin-Expression in PCa-LN

Zur Analyse der Rolle von CEACAM1 bei der Lymphangiogenese in den PCa-LN wurden LN-Präparate von Patienten mit einem $G \leq 7$ und $G > 7$ immunhistologisch mit einem AB gegen das humane CEACAM1 und dem Lymphendothelmarker Podoplanin angefärbt und anschließend quantitativ analysiert. Die gefärbten Schnitte wurden freundlicherweise von Frau Dr. Heike Bömmel vom Institut für Anatomie und Zellbiologie in Würzburg zur Verfügung gestellt.

CEACAM1- und PSA-Expression in PCa-LN

Zur Analyse der Eignung von CEACAM1 und PSA als Marker für Tumorzellen in den PCa-LN wurden LN-Präparate (n=17), in zwei separaten Analysen, von Patienten mit einem G \leq 7 pN0 (n=4), G \leq 7 pN1 (n=6) und G $>$ 7 pN1 (n=7) immunhistologisch mit einem AB gegen PSA (Nachweis durch DAB) und gegen das humane CEACAM1 (Cc1) zunächst als Einzel-DAB-Färbungen und dann als gekoppelte DAB + Immunfluoreszenzfärbung [Cc1 (DAB) + PSA (IF)] angefärbt und anschließend analysiert. Laut dem humanen Proteinatlas [117] weisen gesunde LN keine CEACAM1-Expression auf, weshalb bei dieser Auswertung kein gesundes Gewebe als Referenz benötigt wurde.

CEACAM1- und PSA-Expression in PCa

Zur Analyse einer potentiellen Korrelation zwischen dem CEACAM1- und PSA-Expressionsmuster in der Prostata und der Malignität des Tumors wurden PCa-Prostatapräparate von Patienten mit einem G \leq 7 (G3+3 und G3+4, pN0), G \leq 7 (G3+4, pN1) und G $>$ 7 (G4+5, pN1) immunhistologisch mit AB gegen CEACAM1 und PSA angefärbt und quantitativ analysiert. Die Analyse der pN0-Patienten erfolgte durch Frau Dr. Verena Pfeiffer aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie in Würzburg. Für die quantitative Analyse wurden in den PCa-Prostatapräparaten die Morphologie der Drüsen und Intensität der CEACAM- und PSA-Expression ausgewertet. Die Auswertung nach folgenden Kriterien:

1. normale Prostatadrüsen (ein- bis zweischichtiges Drüsenepithel):
 - a) mit CEACAM1- (Cc1⁺) und PSA-Expression (PSA⁺)
 - b) mit CEACAM1-Expression (Cc1⁺) und verminderter PSA-Expression (PSA^{low})
 - c) mit verminderter CEACAM1-Expression (Cc1^{low}) und PSA-Expression (PSA⁺)

2. G3-Tumordrüsen (einschichtige runde Drüsen):
 - a) mit CEACAM1- (Cc1⁺) und PSA-Expression (PSA⁺)
 - b) mit vermindertet CEACAM1-Expression (Cc1^{low}) und mit PSA-Expression (PSA⁺)
 - c) mit CEACAM1-Expression (Cc1⁺) und verminderter PSA-Expression (PSA^{low})

2.5 Statische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde von Frau Dr. Verena Pfeiffer vorgenommen. Über das Programm Statistica wurde überprüft, ob die Werte normalverteilt sind und ein T-Test durchgeführt. War keine Normalverteilung vorhanden, wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt. Die Werte wurden mit dem Graphikprogramm GraphPad Prism visualisiert.

3 Ergebnisse

3.1 CEACAM1 bei der Angiogenese und Lymphangiogenese des PCa

Vorausgegangene Analysen der Arbeitsgruppe von Professor Süleymann Ergün Ergün (Anatomie und Zellbiologie, Würzburg) belegen die Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 für die Angiogenese. Die Arbeit von Tilki *et al.* (2006) [99] konzentrierte sich auf die Rolle von CEACAM1 während der frühen Phase des PCa. Das prämaligne PIN-Stadium ist eine mögliche Vorstufe des invasiven Adenokarzinoms, bei der sich das ein- bis zweischichtige Prostatadrüsenepithel durch intraazinäre Proliferation zu einem teilweise hochprismatischen Epithel entwickelt [99]. Normale Prostatadrüsen weisen eine epitheliale, nach luminal gerichtete CEACAM1-Expression auf. Laut Tilki *et al.* (2006) [99] gehen PIN-spezifische Veränderungen des Prostatadrüsenepithels mit einer epithelial verminderten CEACAM1-Expression einher, wodurch eine spezifische CEACAM1-Immunfärbung in solchen Arealen des Prostataepithels kaum mehr nachweisbar ist. Parallel dazu zeigen Blutgefäße, deren Endothel im gesunden Prostatagewebe kein CEACAM1 exprimiert, in der engen Umgebung des PIN-Areals eine CEACAM1-Expression [99].

Zum Nachweis der potentiell verstärkten CEACAM1-Expression in angiogen-aktivierten Blutgefäßen des der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden PCa-Materials wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von CEACAM1 und dem Endothelzellmarker CD31 an PCa-Gewebe von 14 Niedrig- bis Hochrisiko-PCa-Patienten mit einem $G \leq 7$ (n=8) und $G > 7$ (n=6) durchgeführt (s. Kap. 2.4). Die Analyse ergab eine deutliche CEACAM1-Expression in angiogen-aktivierten Blutgefäßen in den PCa-Geweben der Prostata (Abb. 10).

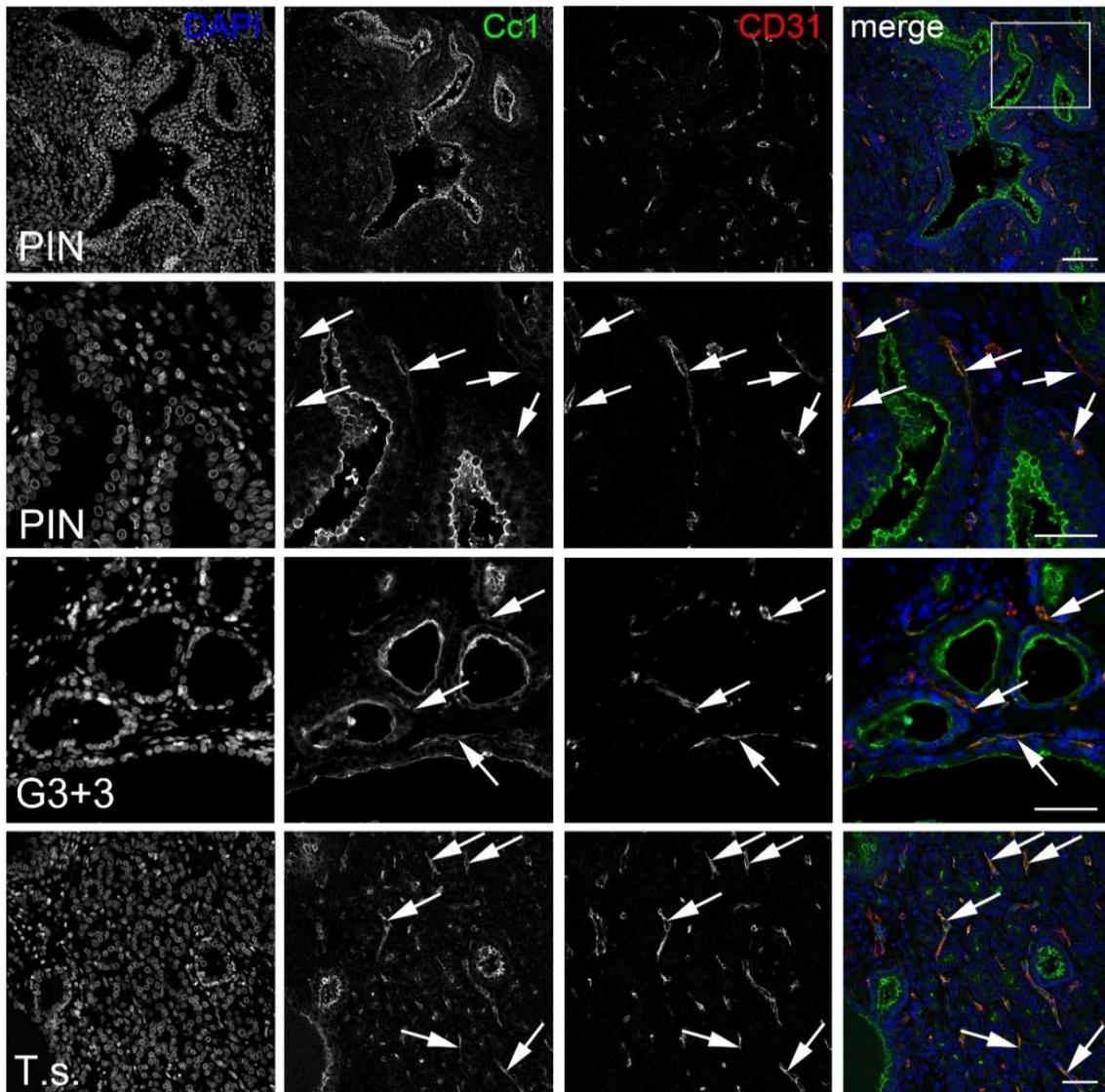


Abbildung 10: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1, Cc1) und CD31 in humanem PCa-Gewebe
 CEACAM1-Färbung: Cc1, Streptavidin Alexa 488 (Cy2), grün. CD31-Färbung: Indocarbocyanin (Cy3), rot.
merge: übereinander gelagerte Bilder. Weiße Pfeile: CEACAM1-positive Blutgefäße. Kernfärbung mit 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau). *Scale-bar*=100 μ m. **Erste Reihe:** repräsentatives Prostatagewebe mit Prostatischem intraepitheliales Neoplasie-(PIN)-Areal. Ausschnitt (Kasten „*merge*“) wurde vergrößert. **Zweite Reihe:** Ausschnittvergrößerung des PIN-Areals mit CEACAM1-positiven Blutgefäßen. **Dritte Reihe:** repräsentatives Prostatagewebe mit einem *Gleason-Score* (G)3 (G3+3)-Areal. **Vierte Reihe:** repräsentative Prostatagewebe einer Tumorumgebung (*Tumor surrounding*, T.s.) eines G>7 Patienten.

Laut den Untersuchungen von Kilic *et al.* (2007) werden auch angiogen-aktivierte Lymphgefäße beim Vorhandensein eines PCa CEACAM1-positiv [102].

Zur Analyse des potentiellen Einflusses des PCa-Stadiums auf die Lymphangiogenese wurden Doppelimmunfärbungen mit CEACAM1 und dem Lymphendothelmarker Podoplanin an Prostata- und LN-Gewebeschnitte von 13 Niedrig- bis Hochrisiko-PCa-Patienten mit einem G \leq 7 (n=6) und G>7 (n=7) durchgeführt.

Anschließend wurde die Anzahl CEACAM1-positiver Lymphgefäße quantifiziert (s. Kap. 2.4). Dazu wurden > 20 Lymphgefäße je Patient und Areal [T.s., PIN, ausschließlich G3 (G3+3), ausschließlich G4 (G4+4) und ausschließlich G5 (G5+5)] ausgewertet.

Die Auswertung der CEACAM1/Podoplanin-Doppelimmunfärbungen zeigte eine deutlich erhöhte CEACAM1-Expression in angiogen-aktivierten Lymphgefäßen in den PCa-Gewebepräparaten (n=13) (Abb. 11). Die quantitative Analyse ergab signifikante Unterschiede bei der Anzahl CEACAM1-positiver Lymphgefäße zwischen den Areal-Typen (T.s., PIN, G3+3, G4+4) (Abb. 11). Die Anzahl CEACAM1-positiver Lymphgefäße nahm mit steigendem *Gleason Score* signifikant ab. In G5-Arealen (G5+5) waren keine Podoplanin-positiven Lymphgefäße nachweisbar (Abb. 11, vierte Reihe). Die meisten CEACAM1-positiven Lymphgefäße waren in der T.s. und in den PIN-Arealen lokalisiert (T.s.>91 %, PIN-Areal 100 %). Bereiche von Prostatadrüsen mit einem G3 (G3+3) und G4 (G4+4) zeigten deutlich weniger CEACAM1-positiv Lymphgefäße als PIN- und T.s.-Gebiete (Abb. 11, Grafik).

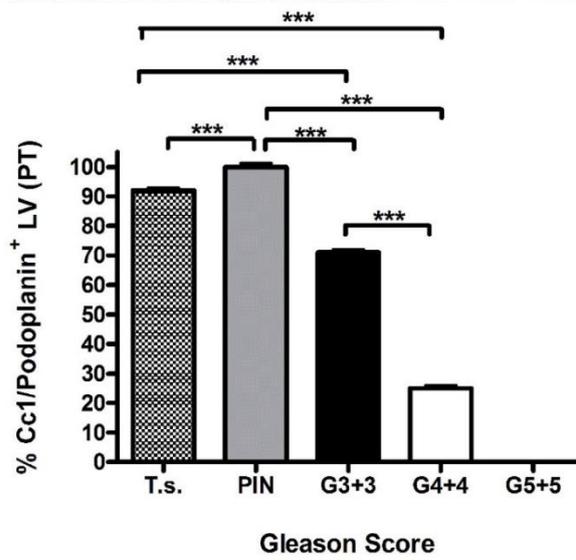
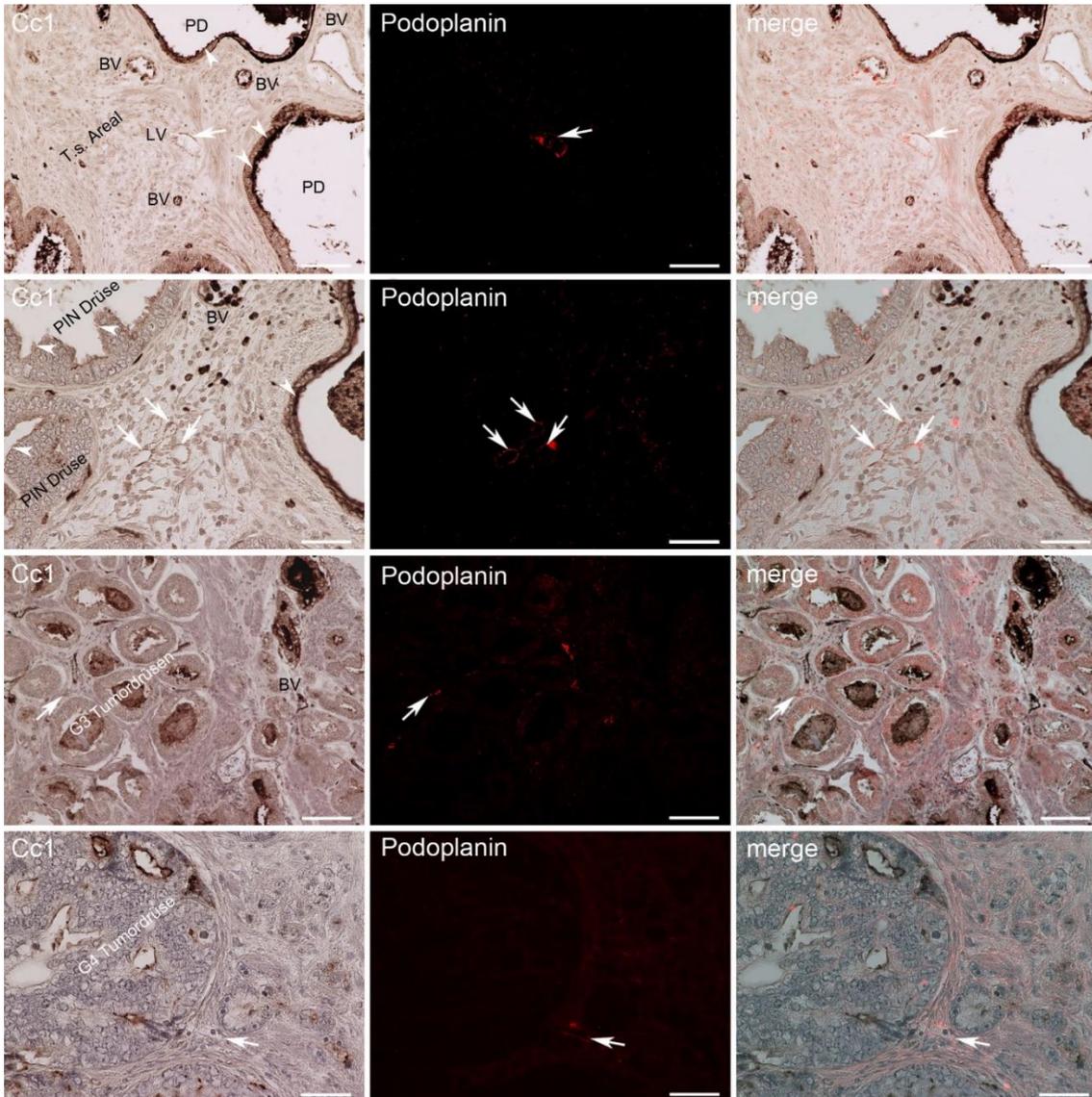


Abbildung 11: Doppelimmunfärbung von *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1, Cc1) und Podoplanin in humanem PCa-Gewebe. CEACAM1-Färbung: Cc1, 3,3-Diaminobenzidin (DAB) braun, Podoplanin-Färbung: Indocarbocyanin (Cy3), rot. *merge*: übereinander gelagerte Bilder. BV: Blutgefäße, PD: Prostatastrüsen; Weiße Pfeile: Podoplanin-positive Lymphgefäße (mittleres Bild) mit CEACAM1-Expression (erstes Bild). Weiße Pfeilköpfe: CEACAM1-positive Prostatastrüsenepithelien. Gegenfärbung mit Hämalaun. *Scale-bar*=100 µm. **Erste Reihe:** Kolokalisation von Podoplanin und CEACAM1 im Endothel von Lymphkapillaren in der Tumorumgebung (T.s.), gesunde PD (weiße Pfeilköpfe). CEACAM1-positive BV (Cc1-Bild links). **Zweite Reihe:** Kolokalisation von Podoplanin und CEACAM1 in der Umgebung von PIN-Drüsen. CEACAM1-positives BV in der Nähe einer PIN-Drüse (Cc1-Bild links). PIN-Drüsen mit deutlich verminderter CEACAM1-Expression (weiße Pfeilköpfe, Cc1-Bild links) und normale PD mit starker CEACAM1-Expression (weißer Pfeilkopf, Cc1-Bild rechts). **Dritte Reihe:** Kolokalisation von Podoplanin und CEACAM1 in der Umgebung von G3-Tumordrüsen. CEACAM1-positives BV zwischen den G3-Tumordrüsen (Cc1-Bild links). **Vierte Reihe:** Kolokalisation von Podoplanin und CEACAM1 in der Umgebung von kribriformen G4-Tumordrüsen. **Grafik:** Quantitative Analyse des Anteils (%) CEACAM1-positiver Lymphgefäße (LV) im PCa-Gewebe (PT). PIN-Areale zeigten signifikant mehr CEACAM1-positive Lymphgefäße als Tumorumgebungen (T.s.) ($p < 0,0001$), Gleason Score G3-(G3+3)- ($p < 0,0001$) und G4-(G4+4)-Arealen ($p < 0,0001$). In der T.s. gab es signifikant mehr CEACAM1-positive Lymphgefäße als in G3-(G3+3)- ($p < 0,0001$) und G4-(G4+4)-Arealen ($p < 0,0001$). G3-(G3+3)-Arealen zeigten signifikant mehr CEACAM1-positive Lymphgefäße als G4-(G4+4)-Arealen ($p < 0,0001$). In G5-(G5+5)-Arealen wurden keine Podoplanin-positiven Lymphgefäße gefunden.

3.2 Histologische Analyse von PCa-LN-Präparaten

Bisherige Analysen zur Rolle von CEACAM1 bei der Lymphangiogenese beim PCa beschränkten sich hauptsächlich auf das Prostatagewebe [102]. Im Folgenden lag der Fokus auf der Analyse von humanen PCa-LN-Geweben. Auf der Basis der pathologischen Charakterisierung der „verblindeten“-Präparatelisten wurden die zur Verfügung stehenden humanen PCa-LN in drei Gruppen eingeteilt:

- LN von $G \leq 7$ PCa-Patienten ohne LN-Metastasen (pN0)
- LN von $G > 7$ PCa-Patienten ohne LN-Metastasen (pN0)
- LN von $G > 7$ PCa-Patienten mit LN-Metastasen (pN1)

Die in Paraffin-eingebetteten LN-Gewebeblöcke wurden geschnitten, mit HE gefärbt und anschließend mikroskopisch analysiert.

Die Analyse der PCa-LN-Präparate zeigte in der HE-Übersichtsfärbung morphologische Unterschiede wie eine „Drüsenbildung“ in einigen PCa-(pN1)-LN (Abb. 12), die in pN0 PCa-LN ($G \leq 7$ und $G > 7$) nicht auftraten. Bei pN1-LN-Präparaten von Patienten im fortgeschrittenen PCa-Stadium mit morphologischer Veränderung des Parenchyms („Drüsenbildung“) war keine anatomische LN-Gliederung in Kortex, Parakortex und Mark erkennbar (Abb. 12 untere Reihe). In einigen Fällen war der LN nahezu vollständig mit dem „drüsig“ imponierenden Tumor durchsetzt, wobei die Drüsen teilweise den G3-Tumordrüsen im PCa-Prostatagewebe ähnelten (LN: Abb. 12 mittlere Reihe; Prostata: Abb. 11 vierte Reihe). Bei anderen pN1-LN waren diese „Tumordrüsen“ eher länglich und verzweigt. Zwischen den „Tumordrüsen-Arealen“ lag ein „Tumorstroma“ mit teilweise zahlreichen Gefäßanschnitten (Abb. 12 mittlere Reihe, schwarze Pfeilköpfe).

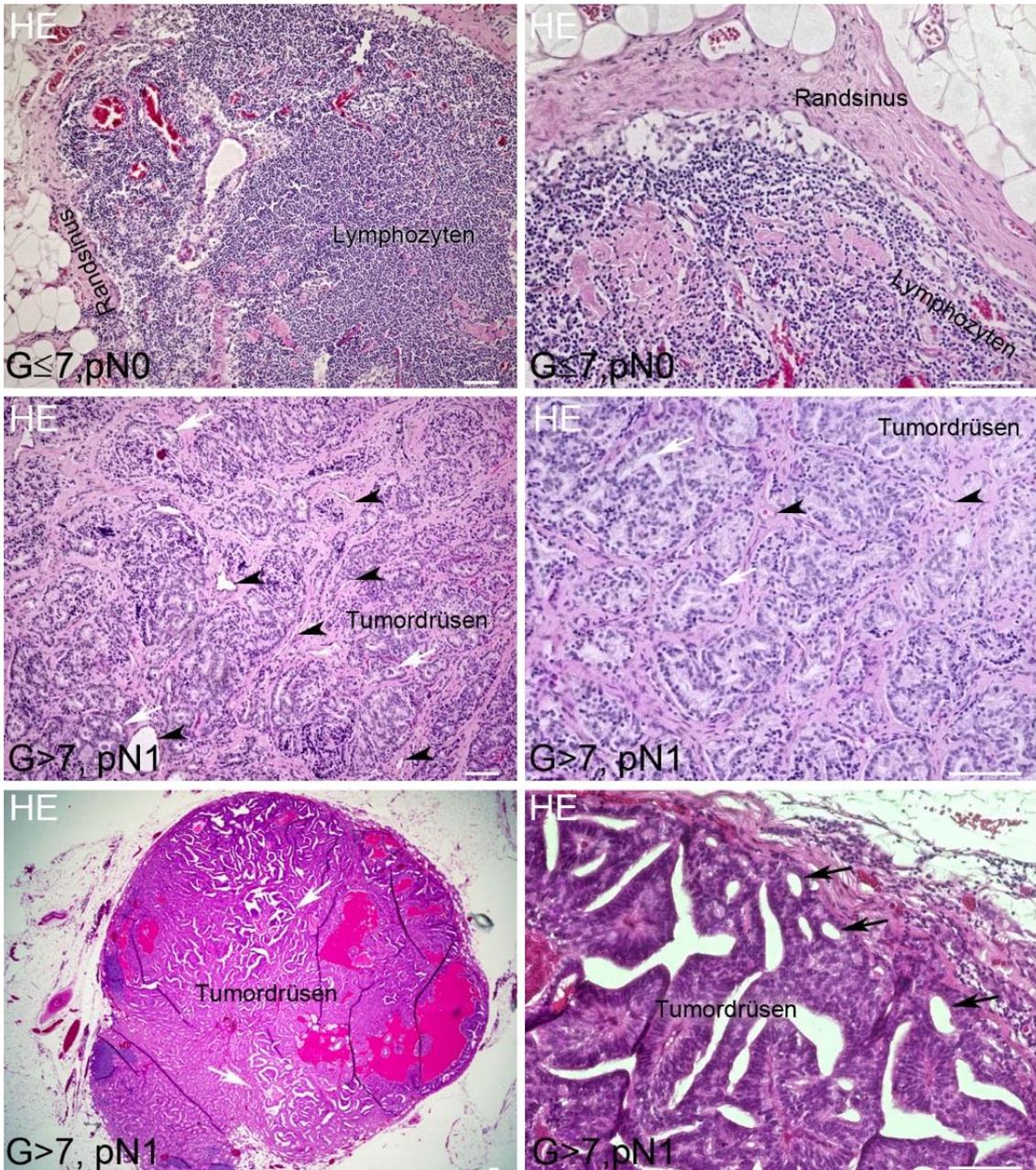


Abbildung 12: Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Übersichtsfärbung von humanem PCa-LN-Gewebe aus Patienten mit unterschiedlichem *Gleason-Score* (G) und LN-Status (pN0/pN1)

Exemplarische LN (Bilder links: G ≤ 7 /pN0; G > 7 /pN0; G > 7 /pN1) mit Ausschnittvergrößerung (Bilder rechts). *Scale-bar*=100 μ m. **Obere Reihe:** repräsentatives LN-Gewebe eines G ≤ 7 /pN0-Patienten; LN-Präparat ohne morphologische Veränderung; Randsinus und Lymphozyten deutlich voneinander abgrenzbar. **Mittlere Bildreihe:** repräsentatives LN-Gewebe eines G > 7 /pN1-Patienten mit starken morphologischen Veränderungen wie kleine, rundliche Tumordrüsen (weiße Pfeile, exemplarisch); zwischen den „drüsigen“ Arealen Tumorstroma mit Blutgefäßen (schwarze Pfeilköpfe). **Untere Reihe:** repräsentative LN-Gewebe eines G > 7 /pN1-Patienten; LN-Präparat mit starken morphologischen Veränderungen wie länglichen Tumordrüsen (Pfeile exemplarisch) und stellenweise nicht mehr vom Parakortex abgrenzbarem Randsinus (Bild rechts).

3.2.1 CEACAM1-Expression im LN-Gewebe von PCa Patienten

Im Folgenden wurde eine potentielle Assoziation zwischen den metaplastischen Veränderungen der LN und einer verstärkten CEACAM1-Expression analysiert. Hierzu wurden PCa-LN-Präparate von Patienten ($G \leq 7/pN0$: $n=4$, $G \leq 7/pN1$: $n=6$, $G > 7/pN1$: $n=7$) immunhistologisch mit einem AB gegen das humane CEACAM1 (C5-1X) angefärbt und auf eine mögliche CEACAM1-Expression analysiert (Abb. 14 Tab. 9). Aus nicht publizierten Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Süleyman Ergün und dem humanen Proteinatlas [132] war bekannt, dass gesunde humane LN kein CEACAM1 exprimieren.

Laut Immunfärbung (Abb. 14) wird CEACAM1 im humanen PCa-LN-Gewebe bereits bei $G \leq 7/pN0$ -Patienten in den Sinusendothel- und fibroblastischen Retikulumzellen des Rand- und Intermediärsinus exprimiert (Abb. 14, obere Reihe). Zudem wiesen auch $G > 7/pN1$ -PCa-LN-Präparate ohne erkennbare morphologische Veränderungen eine starke CEACAM1-Expression in den Sinusoiden der LN auf (Abb. 14, mittlere Reihe links). Humane $G > 7/pN1$ -PCa-LN-Präparate zeigten teilweise eine „drüsige“ Struktur ($n=4/7$). Hierbei wurde eine luminal CEACAM1-Expression hauptsächlich im juxtakapsulären Bereich beobachtet ($n=1$) (Abb. 14, mittlere Reihe rechts), während „drüsige“ LN-Präparate negativ für CEACAM1 waren ($n=3$) (Abb. 14, untere Reihe links). LN aus den Anfangsstadien mit einer „drüsig“-tumorösen Veränderung, die noch erkennbare LN-Sinusoide aufwiesen, zeigten eine positive CEACAM1-Expression in den Sinusendothelzellen ($G \leq 7/pN1$: $n=6/6$, $G > 7/pN$: $n=3/7$) (Tab. 9).

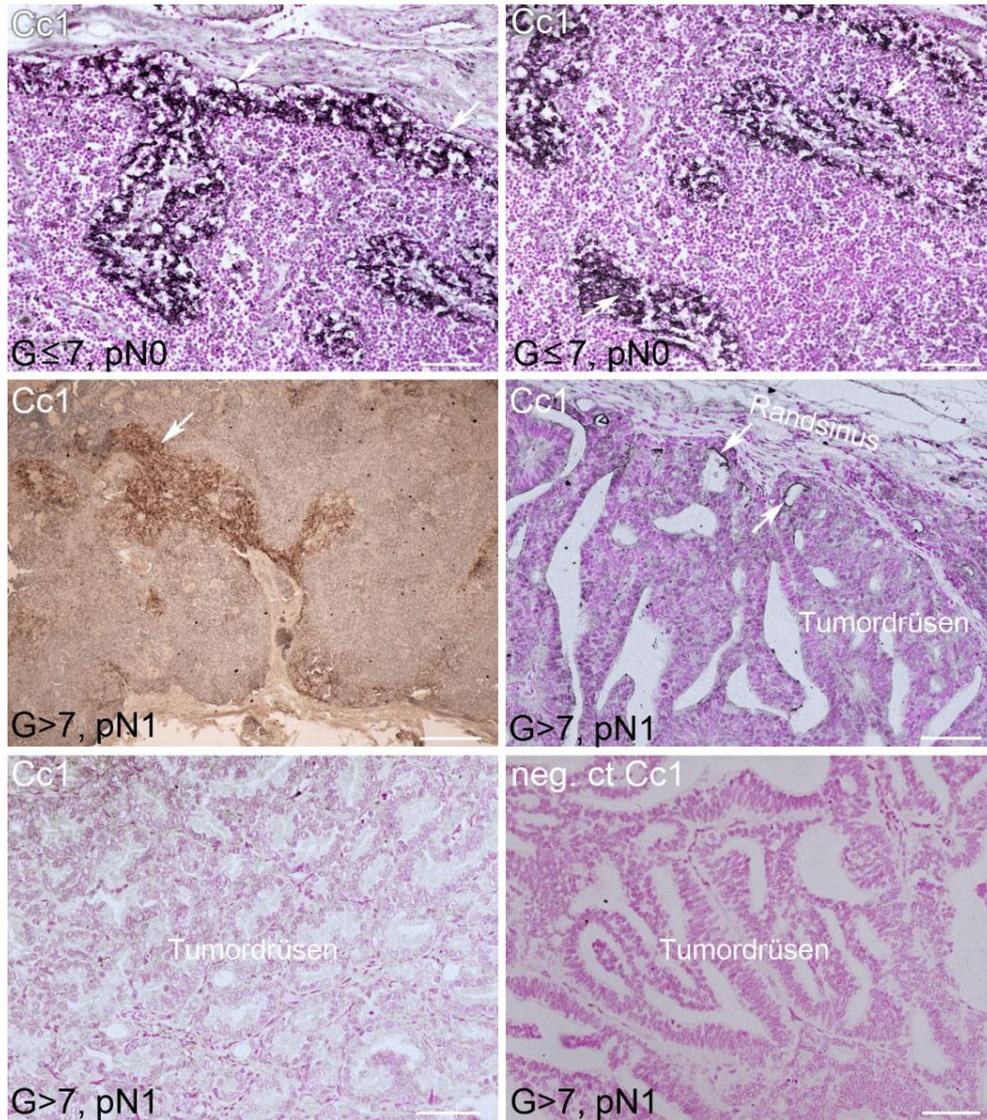


Abbildung 13: *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1 (Cc1) Expression in LN-Gewebe von PCa-Patienten mit unterschiedlichem Gleason-Score (G) und LN-Status (pN0/pN1)

CEACAM1-Färbung: C5-1X, 3,3-Diaminobenzidin (DAB) braun. Weiße Pfeile: CEACAM1-Expression. Scale-bar=80 µm. Gegenfärbung mit Kernechtrot (Ausnahme Bild G>7/pN1; 2. Reihe links, Hämalaun). **Obere Reihe:** repräsentative LN-Gewebe von G≤7/pN0-Patienten; CEACAM1-Expression im Rand- (weißer Pfeil) (links) und Intermediärsinus (links & rechts, weißer Pfeil) vor allem in den Sinusendothel- und fibroblastischen Retikulumzellen. **Mittlere Reihe:** repräsentative LN-Gewebe von G>7/pN1-Patienten; (links) LN-Präparat ohne erkennbare morphologische Veränderungen mit starker CEACAM1-Expression im Intermediärsinus (weißer Pfeil); (rechts) LN-Präparat mit starken morphologischen Veränderungen und Tumordrüsen; luminale CEACAM1-Expression in den Drüsen im Randbereich (Randsinus/Kapsel) des LN (weiße Pfeile). **Untere Reihe:** repräsentative LN-Gewebe von G>7/pN1-Patienten; (links) Bereich eines LN mit Tumordrüsen ohne CEACAM1-Expression; (rechts) Negativkontrolle (*neg. ct*) der CEACAM1-Immunfärbung ohne Primär-Antikörper (am LN-Gewebe aus mittlerer Reihe, rechts).

Tabelle 9: Analyse der *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1) Expression im LN-Gewebe (iliacal & pelvin) von PCa-Patienten mit unterschiedlichem *Gleason-Score* (G) und LN-Status (pN0/pN1)

Gleason Score	Anzahl LN	CEACAM1-Expression	CEACAM1⁺ Sinus	„drüsig“	CEACAM1⁺ Drüsen
G≤7 (pN0)	4	2x Cc1-positiv	4	keine	keine
G≤7 (pN1)	6	6x Cc1-positiv	6	keine	keine
G>7 (pN1)	7	4x Cc1-positiv	3	4	1

Die Einteilung der Patientenproben nach dem *Gleason Score* (G) und der LN-Pathologie (pN0/pN1) erfolgte anhand der „verblindeten“ Präparatliste aus Großhadern. Analysiert wurden die Expression und die Lokalisation der CEACAM1-Expression (Cc1-positiv). Zusätzlich wurde die Häufigkeit von morphologischen Veränderungen („drüsige“ Strukturen) und deren CEACAM1-Expression analysiert.

3.2.2 CEACAM1-Expression in angiogen-aktivierten Blut- und Lymphgefäßen der PCa-LN

Nach dem Nachweis einer CEACAM1-Expression in angiogen-aktivierten Blutgefäßen in PCa-Prostatapräparaten (Abb. 10) wurden eine mögliche vaskuläre CEACAM1-Expression in den LN-Präparaten untersucht. Hierzu wurden LN-Gewebeschnitte von Patienten mit verschiedenen *Gleason Scores* und LN-Metastasierungsstatus (G≤7/pN0 (n=8), G>7/pN0 (n=2), G>7/pN1 (n=4)) immunhistologisch mit einer Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung gegen das humane CEACAM1 (C5-1X) und einem Blutgefäßmarker (Endothelzellmarker CD31) angefärbt und mikroskopisch analysiert (Abb. 14).

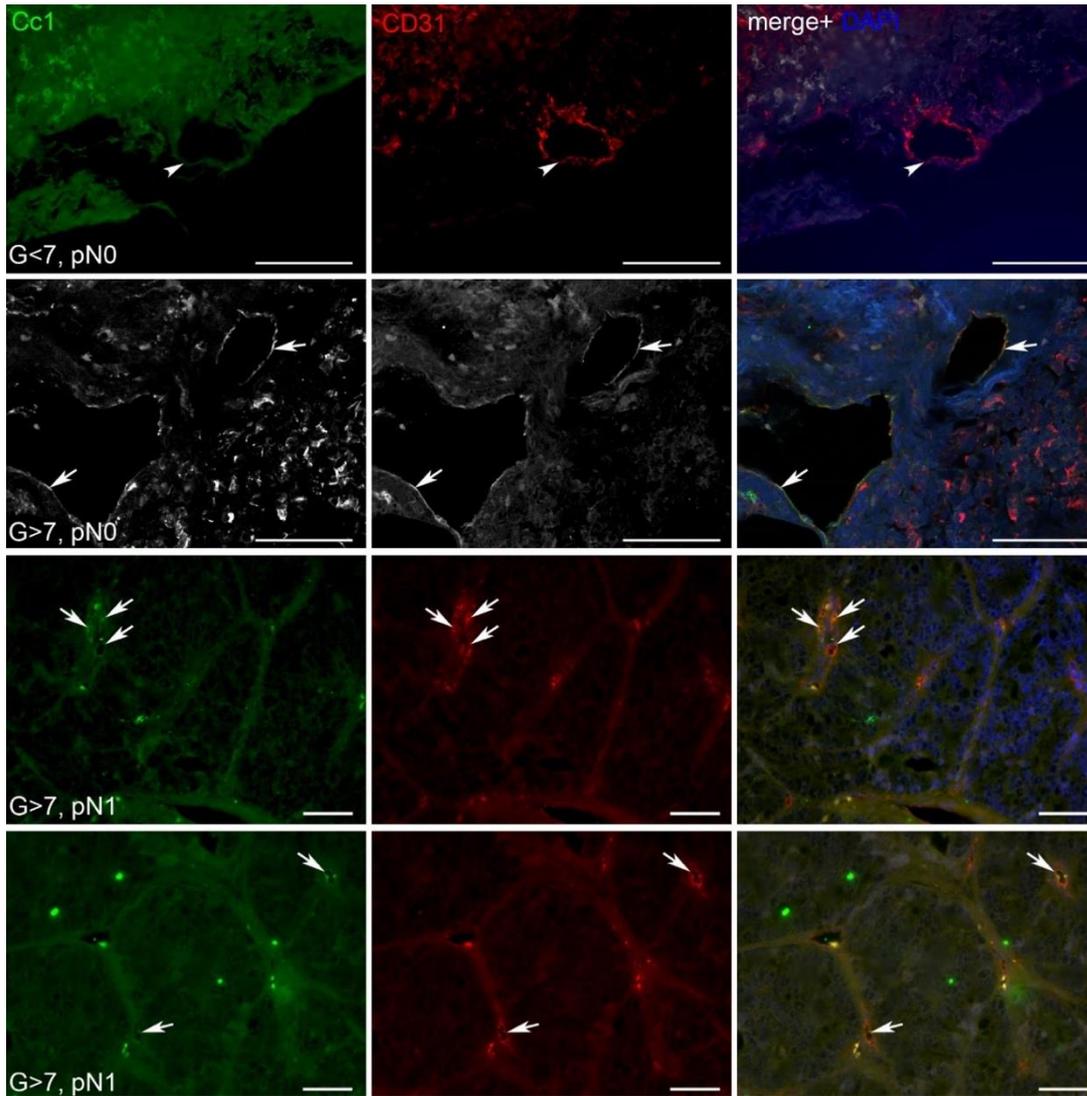


Abbildung 14: Doppel-Immunfluoreszenzfärbung von *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1, Cc1) und dem Endothelzellmarker CD31 in LN-Gewebeschnitten von PCa-Patienten mit unterschiedlichem *Gleason-Score* (G) und LN-Status (pN0/pN1)

CEACAM1-Färbung: Cc1, Streptavidin Alexa 488 (Cy2) grün, CD31-Färbung: Indocarbocyanin (Cy3), rot. *merge*: übereinander gelagerte Bilder. BG = Blutgefäße. Weiße Pfeile: CEACAM1-positive CD31⁺-BG. Weiße Pfeilköpfe: CEACAM1-negative CD31⁺-BG. Kernfärbung mit 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau). *Scale-bar*=100 µm. **Erste Reihe:** repräsentative LN-Gewebe von G<7/pN0-PCa-Patienten; weißer Pfeilkopf: CD31⁺-BG (rot, 2. & 3. Bild) ohne CEACAM1-Expression (1. Bild). **Zweite Reihe:** repräsentatives LN-Gewebe eines G>7/pN0-PCa-Patienten; weiße Pfeile: zwei CEACAM1-positive (1. Bild) CD31⁺-BG (2. & 3. Bild). **Dritte und vierte Reihe:** repräsentative LN-Gewebe von zwei G>7/pN1-PCa-Patienten. weiße Pfeile: CEACAM1-positive (1. Bild) CD31⁺-BG (2. & 3. Bild); PCa-LN-Gewebe mit starken morphologischen Veränderungen und tumoröser „Drüsenbildung“ in gefäßreichem Tumorstroma; deutliche CEACAM1-Expression der CD31⁺-BG im Tumorstroma.

Laut CEACAM1/CD31 Doppel-Immunfluoreszenzfärbung wies das PCa-LN-Gewebe von G<7/pN0-Patienten keine CEACAM1-positiven Blutgefäße auf (n=8) (Abb. 14, erste Reihe). In einigen PCa-LN-Präparaten von G>7/pN0-Patienten traten dagegen

CEACAM1-positive/CD31⁺-Blutgefäße auf (n=2) (Abb. 14, zweite Reihe). Besonders viele angiogen-aktivierte CEACAM1-positive Blutgefäße zeigten die PCa-LN-Präparate von G>7/pN1-Patienten und das „drüsige“ Areale umgebende Tumorstroma (Abb. 14, dritte & vierte Reihe).

Die Arbeit von Kilic *et al.* (2007) [102] über die Rolle von CEACAM1 bei Hodenkrebs belegt, dass tumorassoziierte Lymphgefäße CEACAM1 exprimieren und häufig mit Tumorzellen in den Lymphgefäßen assoziiert sind [102]. Zur Analyse der potentiellen Rolle von CEACAM1 bei der Lymphangiogenese in PCa-LN wurden (n=13) LN-Präparate von Patienten mit einem G≤7 (n=7) (pN0) und G>7 (pN1) (n=6) histologisch mit einem AB gegen CEACAM1 und dem Lymphendothelmarker Podoplanin mittels Doppel-Immunfärbung quantitativ analysiert (Abb. 15).

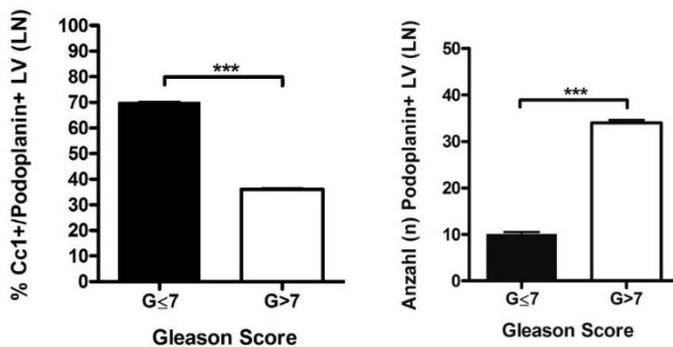
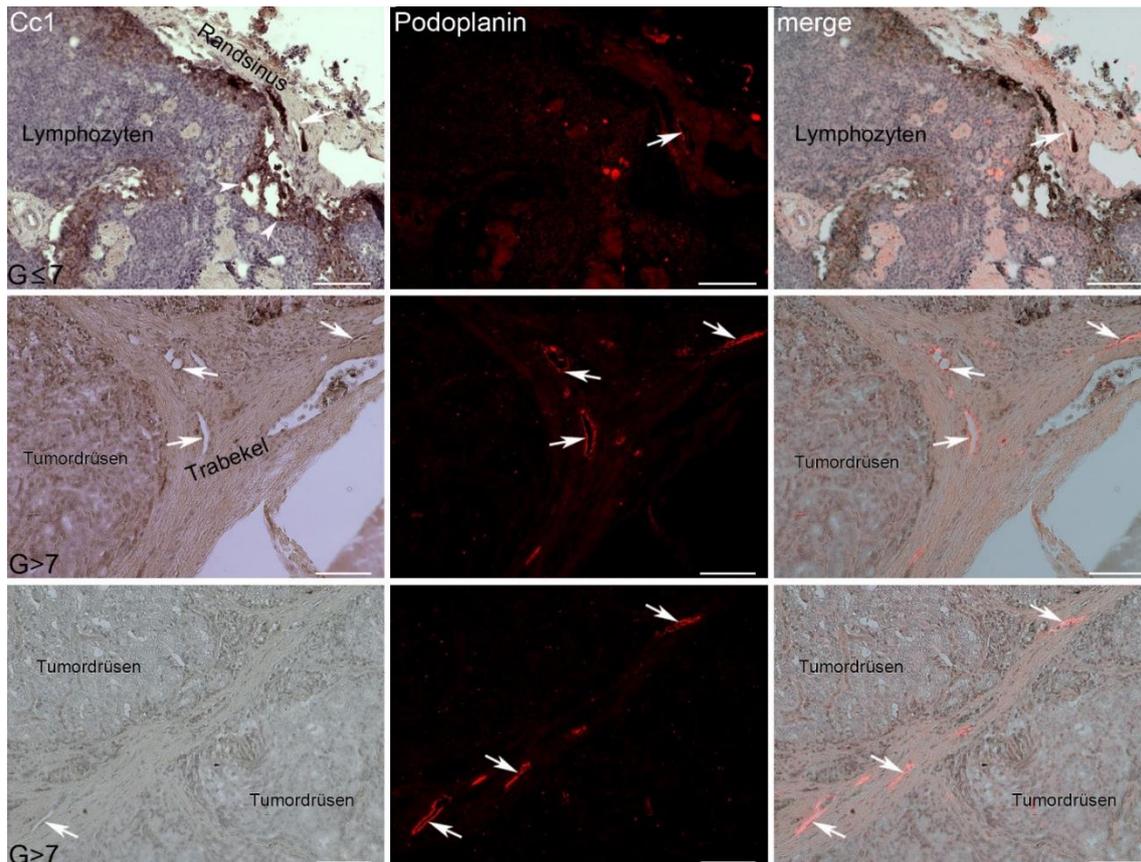


Abbildung 15: *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1, Cc1) und Podoplanin Doppelimmunfärbung an humanem LN-gewebe von PCa-Patienten mit unterschiedlichem Gleason-Score und LN-Status (G \leq 7/pN0, G $>$ 7/pN0, G $>$ 7/pN1)

CEACAM1-Färbung: Cc1, 3,3-Diaminobenzidin (DAB), braun, Podoplanin-Färbung: Indocarbocyanin (Cy3), rot. *merge*: übereinander gelagerte Bilder. Weiße Pfeile: CEACAM1-positive Lymphgefäße, Gegenfärbung mit Hämalaun. Scale-bar=100 μ m. **Obere Reihe:** repräsentatives LN-Gewebe eines G \leq 7/pN0-Patienten; CEACAM1-Expression (braun) im Sinusendothel des Randsinus (weiße Pfeilköpfe), Intermediärsinus und in einem Podoplanin-positiven Lymphgefäß (weißer Pfeil) im Randsinus/Kapselbereich des LN; Lymphozyten im morphologisch unveränderten Gewebe. **Mittlere Reihe:** repräsentatives LN-Gewebe eines G $>$ 7/pN1-Patienten; CEACAM1-Expression in Podoplanin-positiven Lymphgefäßen (weiße Pfeile) im Tumorstroma im Randbereich (Kapsel) des LN-Gewebes; gut abgrenzbare Trabekel zwischen den „drüsigen“ Tumorarealen (Tumordrüsen). **Untere Reihe:** repräsentatives LN-Gewebe eines weiteren G $>$ 7/pN1-Patienten; CEACAM1-Expression in mehreren Podoplanin-positiven Lymphgefäßen im Tumorstroma zwischen den „drüsigen“ Arealen (Tumordrüsen). **Grafik (links):** Quantitative Analyse

CEACAM1/Podoplanin-doppelt-positiver LymphgefäÙe (LV) in (%) in Abhängigkeit vom *Gleason Score*. Ausgewertet wurde jeweils ein LN-Schnitt/Patient. Analysiert wurden alle Podoplanin-positiven LymphgefäÙe eines Präparats. Anschließend wurden diese auf eine mögliche CEACAM1-Expression untersucht. Die y-Achse zeigt den Mittelwert der Fraktion (%-Anteil) CEACAM1/Podoplanin-doppelt-positiver LymphgefäÙe der untersuchten $G \leq 7/pN0$ - ($n=7$) und $G > 7/pN1$ - ($n=6$) LN-Präparate. LN der $G \leq 7/pN0$ -Patienten ($n=7$) zeigten im Vergleich zu LN aus $G > 7/pN1$ -Patienten ($n=6$) einen signifikant höheren Anteil an CEACAM1-positiven LymphgefäÙen ($p < 0,0001$). **Grafik (rechts):** Quantitative Analyse der Anzahl an Podoplanin-positiven LymphgefäÙen (LV) im LN-Gewebe von PCa-Patienten in Abhängigkeit vom *Gleason Score*. PCa-LN-Gewebe von $G > 7/pN1$ -Patienten ($n=6$) zeigte im Vergleich zu LN-Gewebe aus $G \leq 7/pN0$ -Patienten ($n=7$) eine vermehrte Anzahl an LymphgefäÙen/Podoplanin-positiven LymphgefäÙen im Tumorstroma ($p < 0,0001$).

Die Analyse der CEACAM1/Podoplanin-Doppelimmunfärbung in den PCa-LN ($n=13$) zeigte, dass CEACAM1 auch in angiogen-aktivierten LymphgefäÙen exprimiert wird (Abb. 15). $G \leq 7/pN0$ -Patienten ($n=7$) wiesen im Vergleich zu $G > 7/pN1$ -Patienten ($n=6$) signifikant mehr CEACAM1-positive LymphgefäÙe in ihren LN auf ($p < 0,0001$) (Abb. 15, links). Zudem waren bei $G > 7/pN1$ -Patienten ($n=6$) im Vergleich zu $G \leq 7/pN0$ -Patienten ($n=49$) signifikant mehr ($p < 0,0001$) Podoplanin-positive LymphgefäÙe im Tumorstroma-Bereich der LN detektierbar (Abb. 15, rechts).

In zusätzlich durchgeführten CEACAM1/Podoplanin-Doppelimmunfluoreszenzfärbungen an Gewebeschnitten einzelner PCa-LN-Präparate bestätigte sich die CEACAM1-Expression in angiogen-aktivierten Podoplanin-positiven LymphgefäÙen (Abb. 16, weißer Pfeil) sowie eine hohe CEACAM1-Expression in einzelnen Zellen des LN-Gewebes (Abb. 16, weißer Pfeilkopf) sowie im Lumen von Podoplanin-negativen BlutgefäÙen (Abb. 16 weißer Pfeilkopf). Zur Klärung der Frage, ob es sich bei diesen Zellen möglicherweise um CEACAM1-positive Tumorzellen handelt, musste ein geeigneter Tumorzellmarker gefunden werden.

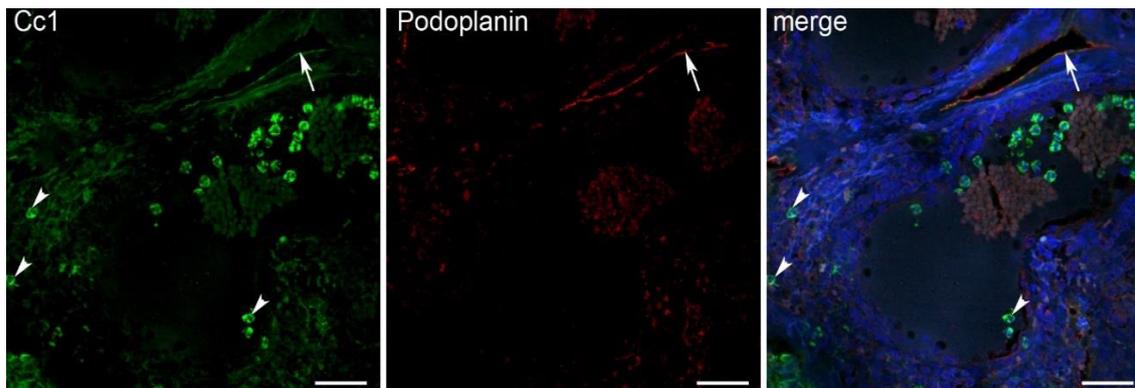


Abbildung 16: *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1, Cc1) und Podoplanin Doppelimmunfluoreszenzfärbung an humanem LN-gewebe eines Patienten mit PCa

CEACAM1-Färbung: Cc1, Streptavidin Alexa 488 (Cy2) grün, Podoplanin-Färbung: Indocarbocyanin (Cy3), rot. *merge*: übereinander gelagerte Bilder. Weißer Pfeil: CEACAM1-positives Lymphgefäß. Weiße Pfeilköpfe: CEACAM1-positive Zellen (vermutlich Granulozyten mit CEACAM1-Expression) im LN-Gewebe und im Lumen eines Podoplanin-negativen Blutgefäßes. Kernfärbung mit 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau). *Scale-bar*=50 μ m.

3.3 Eignung von PSA als Marker für Tumorzellen im PCa-Gewebe

Ein möglicher Marker zum spezifischen Nachweis von Tumorzellen im LN-Gewebe ist PSA. Aus der „Interdisziplinären Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms“ geht hervor, dass PSA in Metastasen zur Bestimmung der Herkunft aus der Prostata genutzt wird [1].

In der vorliegenden Arbeit sollte mit PSA die Frage beantwortet werden, ob es sich bei den CEACAM1-positiven Zellen in den PCa-LN um metastasierte PCa-Zellen handelt (Abb. 16 weiße Pfeilköpfe). Hierzu wurden LN-Präparate (n=17) von PCa-Patienten mit verschiedenen *Gleason Scores* und LN-Metastasierungsstatus ($G \leq 7/pN0$ (n=4), $G \leq 7/pN1$ (n=6), $G > 7/pN1$ (n=7)) immunhistologisch mit einem AB gegen PSA angefärbt. Anschließend erfolgte eine quantitative Analyse der PSA-Expression (Tab. 10).

Tabelle 10: Analyse der Expression des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im LN-Gewebe von Patienten mit PCa in Abhängigkeit vom *Gleason Score* (G) und LN-Metastasierungsstatus (pN0/pN1)

Gleason Score / LN-Metastasierungs-status	n	PSA-Expression	drüsig	Lokalisation der PSA-Expression	
				im LN-Sinus	in „drüsigen“ Arealen
G≤7 (pN0)	4	keine	nein	keine	keine
G≤7 (pN1) 3+4 (pN1)	6	keine	nein	keine	keine
G>7 (pN1)	7	4	4	keine	4

Die Einteilung der Patientenproben erfolgte anhand der „verblindeten“ Präparatliste aus Großhadern. n: Anzahl der LN-Präparate (n=1 LN-Schnitt/Patient); PSA-Expression: Anzahl der positiven Präparate; drüsig: Anzahl der Präparate mit morphologischen Veränderungen, Lokalisation der PSA-Expression: Anzahl der Präparate in verschiedenen Arealen

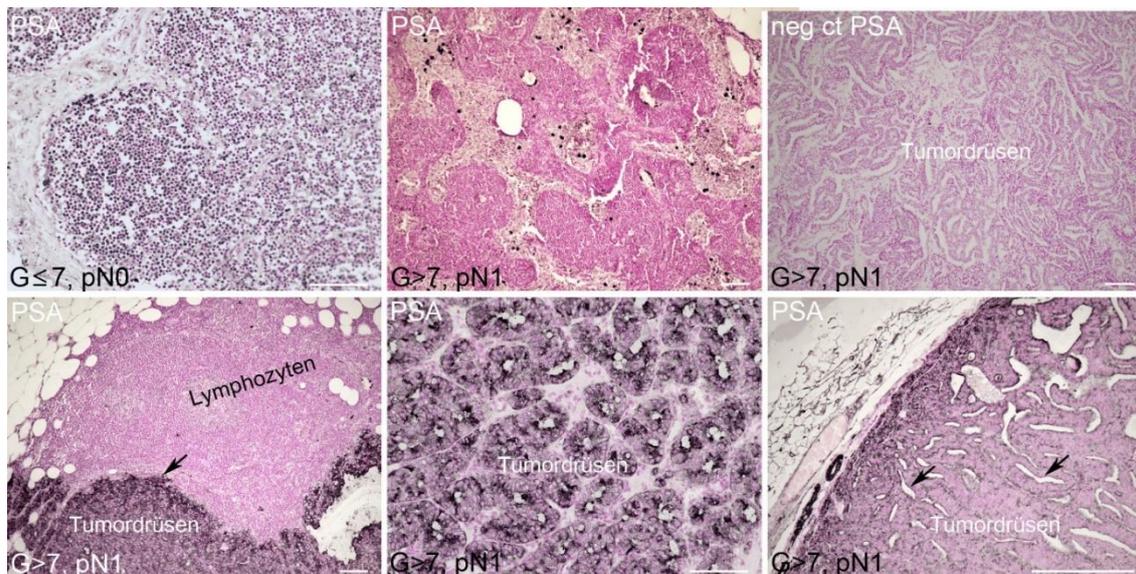


Abbildung 17: Prostata-spezifisches Antigen (PSA) Immunfärbung (3,3-Diaminobenzidin (DAB), schwarz) in humanem LN-Gewebe von PCa-Patienten mit unterschiedlichem Gleason-Score (G) und LN-Status (pN0/pN1)

PSA-Färbung: Diaminobenzidin (DAB) schwarz. Gegenfärbung mit Kernechtrot. Schwarze Pfeile: PSA-positive Bereiche im LN-Gewebe, Lokalisation ausschließlich in den Tumordrüsen. Scale-bar=100 µm.

Obere Reihe: (von links nach rechts) Bild 1: repräsentatives LN-Gewebe eines $G \leq 7/pN0$ -Patienten; keine morphologischen Veränderungen oder PSA-positive-Strukturen. Bild 2: repräsentatives LN-Gewebe eines $G > 7/pN1$ -Patienten; keine morphologischen Veränderungen oder PSA-positiven-Strukturen. Bild 3: Negativ-Kontrolle (*neg ct*), $G > 7/pN1$ -LN, Ansatz ohne PSA-Antikörper, morphologische Veränderungen (Tumordrüsen) **Untere Reihe:** (von links nach rechts): repräsentatives LN-Gewebe eines $G > 7/pN1$ -Patienten. Bild 1: Übergang von nativem LN-Gewebe (mit Lymphozyten) zu metaplastischem drüsenartigem Gewebe (Tumordrüsen); Beschränkung der PSA-Färbung auf drüsige Abschnitte. Bild 2/3: PSA-positive Tumordrüsen im LN-Gewebe mit starken morphologischen Veränderungen. Bild 2: LN mit G3-ähnlichen PSA-positiven Tumordrüsen mit starker PSA-Färbung. Bild 3: PSA-positive Tumordrüsen mit länglicher, PSA-positiver Drüsenstruktur.

Die PSA-Immunfärbung (Abb. 17) der PCa-LN-Präparate mit (pN1) und ohne (pN0) LN-Metastasen zeigte, dass PSA ausschließlich in pN1-LN mit metastasierten Tumorzellen und dort nur in den Tumorzellen, die drüsige Formationen bildeten, exprimiert wurde (n=4) (Tab. 10 und Abb. 17), pN0-LN-Präparate von PCa-Patienten mit einem $G \leq 7$ und $G > 7$ wiesen keine PSA-Immunfärbung auf (Tab. 10 und Abb. 17).

Die Immunfärbung (Abb. 17) bestätigte die Eignung des PSA zum Nachweis von PCa-Zellen in der Prostata im LN-Gewebe. Im Folgenden sollte der Zusammenhang zwischen der frühen CEACAM1-Expression im noch Tumorzell-„frei“ diagnostizierten LN (pN0) und der positiven PSA-Expression nach erfolgter Tumorzell-Metastasierung und „Drüsenbildung“ untersucht werden. Das Ziel dabei war zu evaluieren, ob die verstärkte CEACAM1-Expression im LN-Sinusendothel dem Nachweis PSA-positiver Tumorzellen vorausgeht. Hierzu wurden LN-Präparate von PCa-Patienten mit verschiedenen

Gleason Scores und LN-Metastasierungsstatus ($G \leq 7/pN0$, $G \leq 7/pN1$, $G > 7/pN1$) mittels Doppel-Immunfärbung mit AB gegen CEACAM1 und PSA mikroskopisch analysiert (Abb. 18).

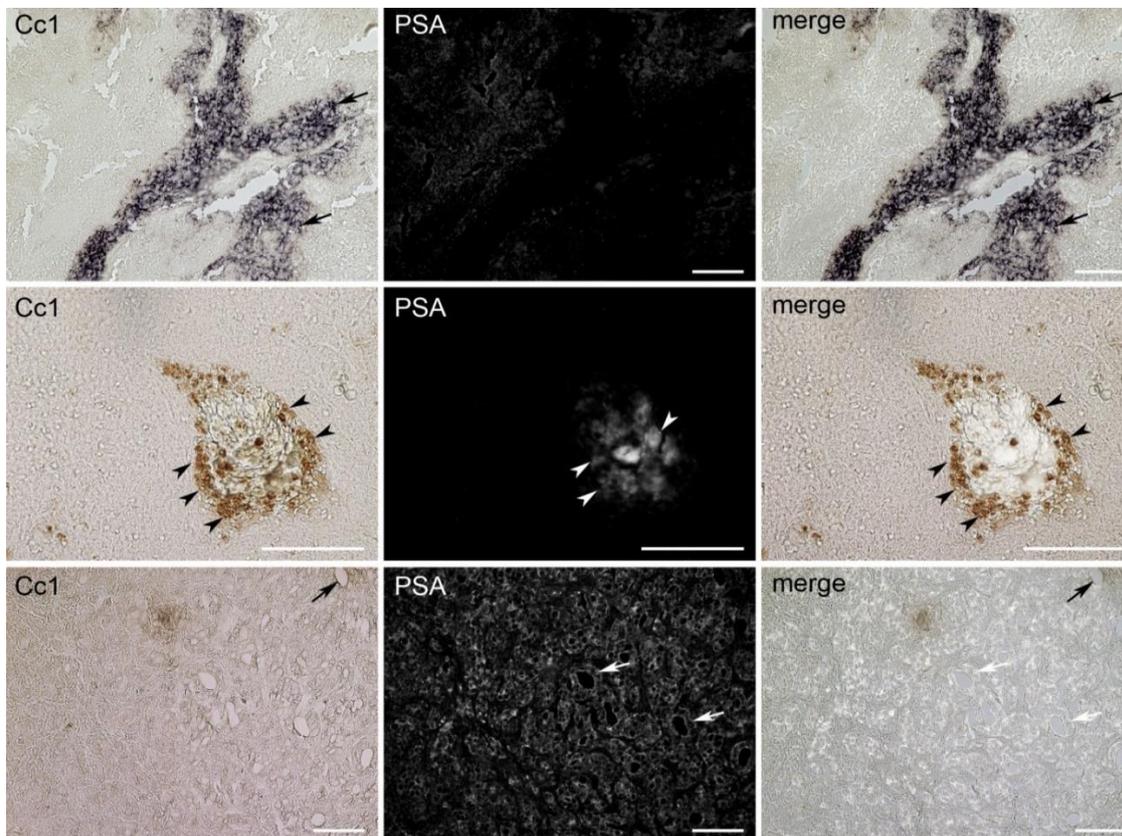


Abbildung 18: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1, Cc1,) und Prostata-spezifisches Antigen (PSA) Doppel-Immunfärbung an LN-Gewebeschnitten von PCa-Patienten mit unterschiedlichem Gleason-Score (G) und LN-Status (pN0/pN1)

CEACAM1-Färbung: Cc1, 3,3-Diaminobenzidin (DAB) braun/schwarz, PSA-Färbung: Indocarbocyanin (Cy5), weiß. *merge*: übereinander gelagerte Bilder. Gegenfärbung mit Hämalaun. Schwarze Pfeile: CEACAM1-positive Bereiche im LN-Gewebe; schwarze Pfeilköpfe: CEACAM1-positive Zellen; weiße Pfeile: PSA-Expression in PCa-Zellen im LN; weiße Pfeilköpfe: PSA-positive Zellen. *Scale-bar*=100 µm. **Obere Reihe:** repräsentatives LN-Gewebe eines $G \leq 7/pN0$ -Patienten: CEACAM1-positives/PSA-negatives Sinusendothel im Intermediärsinus. **Mittlere Reihe:** repräsentatives LN-Gewebe eines $G > 7/pN1$ -Patienten: Zellansammlung im Intermediärsinus: äußere CEACAM-positive Zellreihe und zentral gelegene PSA-positive Zellen. **Untere Reihe:** repräsentatives LN-Gewebe eines $G > 7/pN1$ -Patienten: LN-Präparat mit starker morphologischer Veränderung durch die metastasierten PCa-Zellen mit deutlich ausgeprägter „Drüsenbildung“; „drüsig“, stark PSA-positive Bereiche teilweise mit luminaler CEACAM1-Expression.

Nach der CEACAM1/PSA-Doppel-Immunfärbung wird CEACAM1 im humanen PCa-LN-Gewebe von $G \leq 7/pN0$ -Patienten in den Sinusendothelzellen des Rand- und Intermediärsinus der PSA-negativen LN exprimiert (Abb. 18, obere Reihe). Bemerkenswert war, dass diese LN-Präparate eine positive CEACAM1-Immunreaktion

im Sinusendothel aufwiesen, bevor eine histopathologisch nachweisbare Tumorzell-Metastasierung (pN0) stattgefunden hatte. Bei einigen LN von G>7-Patienten traten Zellansammlungen mit einem speziellen CEACAM1/PSA-Expressionsmuster mit außen liegenden stark CEACAM1-positiven Zellen und zentralen stark PSA-positiven Zellen auf (Abb. 18 mittlere Reihe). LN-Präparate von G>7/pN1-Patienten mit starker morphologischer Veränderung (Drüsen mit vergleichbarer Morphologie wie G3-Tumordrüsen in der PCa-Prostata) zeigten eine starke PSA-Expression. Nur vereinzelt wiesen diese Tumordrüsen eine luminaire CEACAM1-Expression (Abb. 18 untere Reihe, schwarze Pfeile).

3.4 Expressionsanalyse von CEACAM1 und PSA im humanen PCa-Prostatagewebe

Zur Analyse eines potentiellen Zusammenhangs zwischen dem CEACAM1-/PSA-Expressionsmuster in der Prostata und der Malignität des PCa-Gewebes wurden PCa-Prostatapräparate von G≤7/pN0-Patienten (G3+3 und G3+4, n=5), G≤7/pN1-Patienten (G3+4, n=3) und G>7/pN1-Patienten (n=3) immunhistologisch mit AB gegen CEACAM1 und PSA angefärbt und quantitativ analysiert (Abb. 19 und Abb. 20). Für die quantitative Analyse wurden bei jedem PCa-Prostatapräparat alle Prostatadrüsen hinsichtlich ihrer Morphologie und der Intensität der CEACAM1- und PSA-Expression ausgewertet. Bei der Auswertung wurden die Prostatadrüsen nach folgenden Kriterien klassifiziert:

normale ein- bis zweischichtige Prostatadrüsen:

- mit deutlicher CEACAM1- (Cc1⁺) und PSA-Expression (PSA⁺)
- mit deutlicher CEACAM1- (Cc1⁺) und verminderter PSA-Expression (PSA^{low})
- mit verminderter CEACAM1- (Cc1^{low}) und deutlicher PSA-Expression (PSA⁺)

G3-Tumordrüsen:

- mit deutlicher CEACAM1- (Cc1⁺) und PSA-Expression (PSA⁺)
- mit verminderter CEACAM1- (Cc1^{low}) und deutlicher PSA-Expression (PSA⁺)
- mit deutlichere CEACAM1- (Cc1⁺) und verminderter PSA-Expression (PSA^{low})

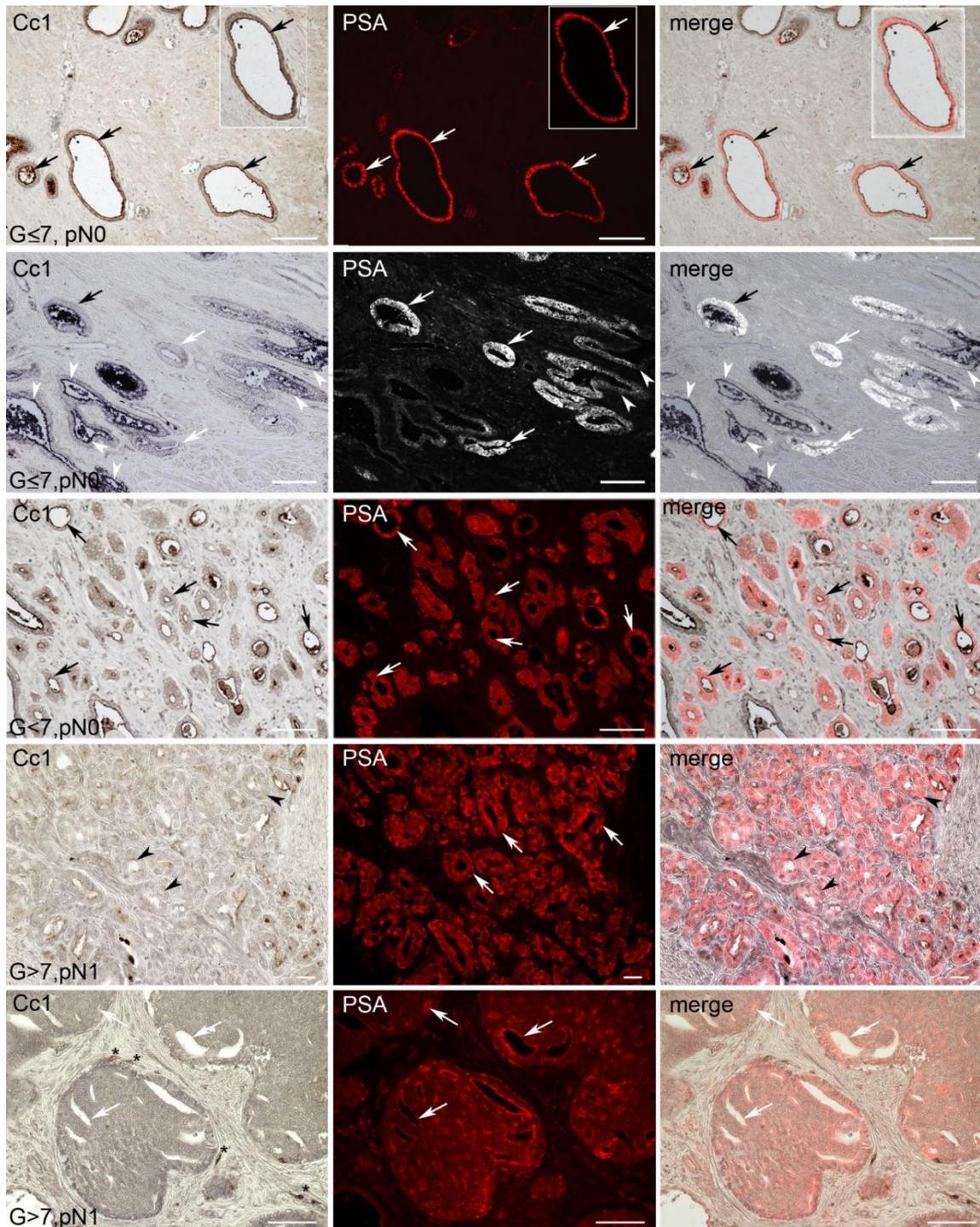


Abbildung 19: *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1, Cc1) und Prostata-spezifisches Antigen (PSA) Doppelimmunfärbung an humanem PCa-Prostatagewebe von Patienten mit unterschiedlichem *Gleason-Score* (G) und LN-Status (pN0/pN1)

CEACAM1-Färbung: Cc1, 3,3-Diaminobenzidin (DAB) braun/schwarz, PSA-Färbung: Indocarbocyanin (Cy3/Cy5), rot-weiß. *merge*: übereinander gelagerte Bilder. Cc1⁺/PSA⁺: deutliche Cc1/PSA-Expression; Cc1^{low}/PSA^{low}: verminderte Cc1/PSA-Expression. Gegenfärbung mit Hämalaun. **Erste Reihe:** PCa-Gewebe eines G \leq 7/pN0-Patienten mit normalen ein- bis zweischichtigen Prostatadrüsen (rechts im Bild und Zoom-Inset) und einer G3-Tumordrüse (unten links im Bild) mit Cc1⁺/PSA⁺-Expression (schwarze/weiße Pfeile) *Scale-bar*=100 μ m. **Zweite Reihe:** PCa-Gewebe eines G \leq 7/pN0-Patienten mit

heterogenem Cc1/PSA-Expressionsmuster: 1) Cc1⁺/PSA⁺-Prostatadrüsen (schwarze (erstes und letztes Bild) / weiße (mittleres Bild) Pfeile); 2) Cc1^{low}/PSA⁺-Prostatadrüsen (weiße Pfeile in allen drei Bildern); 3) Cc1⁺/PSA⁻-Prostatadrüsen (weiße Pfeilköpfe in allen drei Bildern). **Dritte Reihe:** PCa-Gewebe eines G_≤7/pN0-Patienten mit G3-Tumordrüsen mit Cc1⁺/PSA⁺-Expression (schwarze/weiße Pfeile). *Scale-bar*=100 µm. **Vierte Reihe:** PCa-Gewebe eines G_≤7/pN1-Patienten mit deutlicher Anreicherung von G3-Tumordrüsen und einem verminderten Stroma-Anteil, G3-Tumordrüsen mit Cc1^{low}/PSA⁺-Expression (schwarze Pfeilköpfe (erstes und letztes Bild)/ weiße Pfeile (mittleres Bild) aufweisen. *Scale bar*=40 µm. **Fünfte Reihe:** PCa-Gewebe eines G_>7/pN1-Patienten mit G4-Tumordrüsen mit Cc1^{low}/PSA⁺-Expression (weiße Pfeile in allen Bildern; * benachbarte Cc1⁺-Gefäße. *Scale-bar*=100 µm.

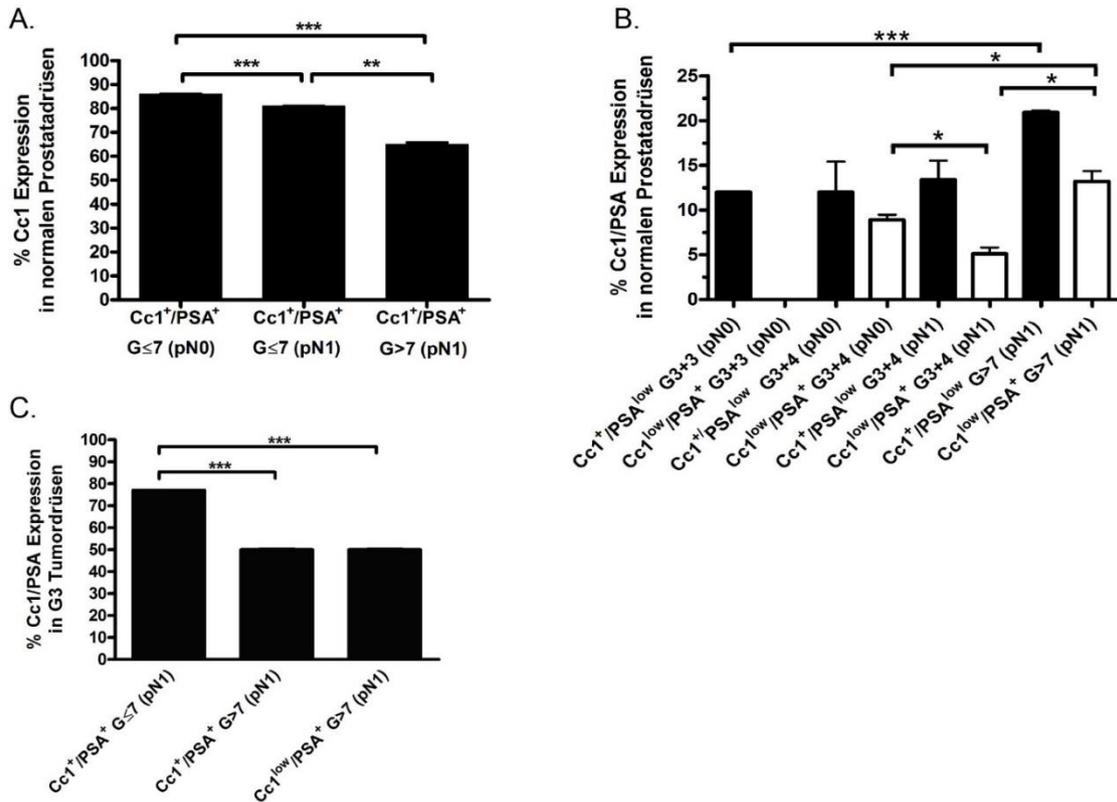


Abbildung 20: Quantitative Analyse des Expressionsmusters des *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1/CC1) und des Prostata spezifischen Antigens (PSA) an PCa-Prostatagewebe von Patienten mit verschiedenen *Gleason Scores* (G≤7/G>7) und mit- und LN-Metastasen (pN0/pN1)

Cc1⁺/PSA⁺: deutliche CEACAM1/PSA-Expression; Cc1^{low}/PSA^{low}: verminderte CEACAM1/PSA-Expression. **A. Cc1-Expression in normalen ein- bis zweischichtigen Prostataedrüsen:** Anteil (%) der normalen ein- bis zweischichtigen Prostataedrüsen mit Cc1⁺/PSA⁺-Expression: G≤7/pN0 > G≤7/pN1 (p=0,0002); G≤7/pN0 > G>7/pN1 (p=0,0027); G≤7/pN1 > G>7/pN1 (p>0,0001). Die epitheliale Cc1⁺-Expression nimmt in normalen ein- bis zweischichtigen deutlich PSA⁺-Prostataedrüsen mit zunehmender Malignität signifikant ab. **B. Cc1- und PSA-Expression in normalen ein- bis zweischichtigen Prostataedrüsen:** Heterogene CEACAM1/PSA-Expression in normalen ein- bis zweischichtigen Prostataedrüsen. Schwarze Balken: Anteil (%) an Prostataedrüsen mit Cc1⁺/PSA^{low}-Expression, weiße Balken: Anteil (%) an Prostataedrüsen mit Cc1^{low}/PSA⁺-Expression. Ausgewertet wurden G3+3 (pN0; n=2), G3+4 (pN0; n=3), G3+4 (pN1; n=3) und G>7 (pN1; n=3) PCa-Prostata schnittpräparate. G3+3/pN0-PCa-Patienten wiesen keine normalen ein- bis zweischichtigen Prostataedrüsen mit Cc1^{low}/PSA⁺-Expression auf, dieses heterogene Expressionsmuster trat erstmals bei den G3+4/pN0-Patienten auf. Der Anteil an Prostataedrüsen mit Cc1⁺/PSA^{low}-Expression nahm mit zunehmendem Malignitätsgrad (von G3+3 bis G>7) zu. Signifikante Unterschiede: Cc1⁺/PSA^{low}-Expression – G3+3/pN0-Patienten < G>7/pN1-Patienten (p=0,0006); Cc1^{low}/PSA⁺-Expression – G3+4/pN0-Patienten < G3+4/pN1-Patienten (p=0,0252); G3+4/pN0 < G>7/pN1) Patienten (p= 0.0291); G3+4/pN1-Patienten < G>7/pN1) Patienten (p=0,0144). **C. Cc1- und PSA-Expression in G3-Tumordrüsen:** heterogene Cc1/PSA-Expression in G3-Tumordrüsen. Analysiert wurden n=2377 G3-Tumordrüsen in G≤7/pN1- und n=52 G3-Tumordrüsen in G>7/pN1-Patienten. Mit zunehmendem Malignitätsgrad nahm die Anzahl an G3-Tumordrüsen und die Anzahl der Cc1⁺/PSA⁺-Tumordrüsen ab. Signifikante Unterschiede: Cc1⁺/PSA⁺-Tumordrüsen – G≤7/pN1-Patienten > G>7/pN1-Patienten (p<0,0001). G>7/pN1-Patienten – Cc1^{low}/PSA⁺-Tumordrüsen < Cc1⁺/PSA⁺-Tumordrüsen (p<0,0001).

Laut der Auswertung der CEACAM1/PSA-Expression (Abb. 19 und 20) in humanem PCa-Prostatagewebe mit unterschiedlichem *Gleason Score* nahm der Anteil an normalen ein- bis zweischichtigen Cc1⁺/PSA⁺-Prostata-drüsen mit zunehmendem Malignitätsgrad der Patienten ($G \leq 7/pN0 > G \leq 7/pN1 > G > 7/pN1$) signifikant ab (Abb. 20.A). Daher wurde das Muster der CEACAM1- und PSA-Expression mit zunehmendem *Gleason Score* der Patienten heterogener. Es traten sowohl Cc1^{low}/PSA⁺-Drüsen als auch Drüsen mit Cc1⁺/PSA^{low}-Drüsen auf (Abb. 19, zweite Reihe und Abb. 20.B). Bei G3+3/pN0-PCa-Patienten fehlten normale ein- bis zweischichtige Cc1^{low}/PSA⁺-Prostata-drüsen. Dieses Expressionsmuster trat erstmals bei G3+4/pN0-Patienten auf (Abb. 20.B). Weiterhin nahm der Anteil an normalen ein- bis zweischichtigen Cc1⁺/PSA^{low}-Prostata-drüsen mit zunehmendem Malignitätsgrad (von G3+3 bis G>7) zu (Abb. 20.B). Sowohl G3+4/pN0- als G3+4/pN1 Patienten zeigten im Vergleich zu G>7/pN1-Patienten signifikant geringere Anteile an normalen ein- bis zwei-schichtigen Cc1^{low}/PSA⁺-Prostata-drüsen (Abb. 20.B).

G3-Tumordrüsen weisen eine ähnliche Morphologie wie die normalen ein- bis zweischichtigen Prostata-drüsen auf, waren aber immer einschichtig (Abb. 19, dritte und vierte Reihe). Mit zunehmendem Malignitätsgrad der Patienten nahm der Anteil an Cc1⁺/PSA⁺-G3-Tumordrüsen ab (Abb. 20.C; $G \leq 7/pN0$ -Patienten = 100 % (Abb. 19, dritte Reihe, n=3320 Drüsen) $G \leq 7/pN1$ -Patienten = 77 %, $G > 7/pN1$ -Patienten = 50 %). $G \leq 7/pN1$ -Patienten zeigten erstmals Cc1^{low}/PSA⁺-G3-Tumordrüsen (Abb. 20.C). Bei $G > 7/pN1$ -Patienten betrug der Anteil der Cc1^{low}/PSA⁺- G3-Tumordrüsen 50 % (Abb. 19 vierte Reihe, Abb. 20.C). Die G4-Tumordrüsen (Abb. 19, fünfte Bildreihe), die vorwiegend bei $G > 7/pN1$ -Patienten vorkamen, zeigten ein Cc1^{low}/PSA⁺-Expressionsmuster. Weiter wurden in der näheren Umgebung der G4-Tumordrüsen Cc1-positive angiogen-aktivierte Gefäße (Abb. 19 fünfte Reihe, *) detektiert.

3.5 Analyse der CEACAM1-Expression im Mausmodell

Analog zu den humanen Gewebeproben wurden auch murine Prostata- und LN-Präparate hinsichtlich ihrer CEACAM1-Expression analysiert. Dabei zeigten B6.J-wt-Tiere eine deutliche epitheliale CEACAM1-Expression im Prostata-drüsenepithel (Abb. 21), während benachbarte Blutgefäße CEACAM1-negativ waren (Abb. 21). In Cc1ko-Mäusen ließ sich keine positive Immunreaktion im Prostata-drüsenepithel detektieren (Abb. 21). In den LN trat weder in den wt- noch in den Cc1ko-Mäusen eine positive Immunreaktion auf (Abb. 21).

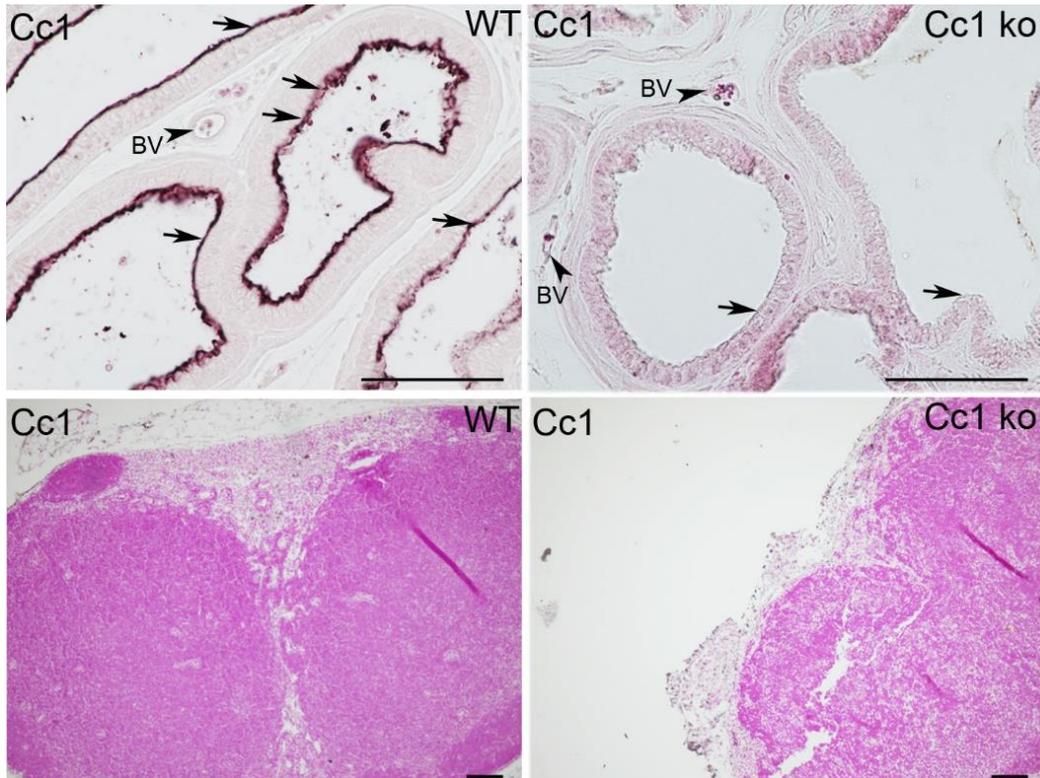


Abbildung 21: *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1, Cc1), Immunfärbung an Prostata- (oben) und LN-Gewebe (unten) von normalen B6.J-Wildtyp-(wt)- und CEACAM1-*knock-out*-(Cc1ko)-Mäusen

CEACAM1-Färbung: Cc1, 3,3-Diaminobenzidin (DAB) braun/schwarz. Gegenfärbung mit Kernechtrot. *Scale bar*=100 µm. **Obere Reihe, links:** Prostata-drüsenepithel einer B6.J-wt-Maus mit deutlicher luminaler Cc1-Färbung (schwarze Pfeile), benachbartes Blutgefäß (BV) Cc1-negativ (schwarzer Pfeilkopf); **Obere Reihe rechts:** fehlende Cc1-Immunfärbung im Prostata-drüsenepithel (schwarze Pfeile) und in den angrenzenden BV (schwarzer Pfeilkopf) in Cc1ko-Mäusen; **Untere Reihe:** fehlende Cc1-Immunreaktion in Gewebe pelviner LN von B6.J-wt-Mäusen (links) und Cc1ko-Tieren (rechts)

Für die Analyse der CEACAM1-Expression in den Lymphgefäßen wurde eine CEACAM1/Podoplanin-Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung an B6.J-wt-Prostatapräparaten durchgeführt (Abb. 22). Podoplanin-positive Lymphgefäße der normalen gesunden Prostata exprimierten kein CEACAM1 (Abb. 22).

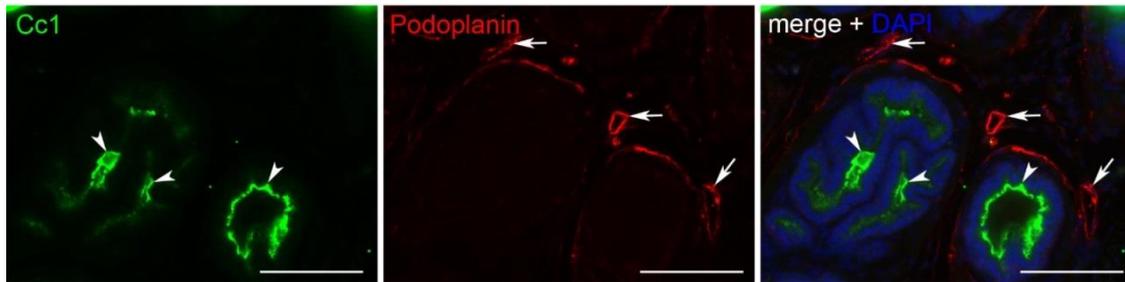


Abbildung 22: *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1, Cc1), und Podoplanin Doppel-Immunfluoreszenzfärbung an normalem B6.J-Wildtyp-Prostatagewebe

CEACAM1-Färbung: Cc1, Streptavidin Alexa 488 (Cy2) grün, Podoplanin-Färbung: Indocarbocyanin (Cy3), rot. *merge*: übereinander gelagerte Bilder. Weiße Pfeilköpfe: Cc1-positives Prostatadrüsenepithel (Cc1, *merge*), weiße Pfeile: benachbart liegende Podoplanin-positive Lymphgefäße (Podoplanin, *merge*). Podoplanin-positive Lymphgefäße exprimierten kein Cc1 (*merge*). Kernfärbung mit 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau); *Scale-bar*=100 µm.

Im folgendem wurde das transgene Maus-PCa-Modell TRAMPC1 von Greenberg *et al.* [116] analysiert, bei dem die Tiere Androgen-abhängig mit Beginn der Geschlechtsreife orthotop ein PCa entwickeln. Die PCa-Tumorzellen lassen sich über einen SV40-AB detektieren (Abb. 23, links). In frühen PCa-Stadien (HGPIN) wurde CEACAM1 im Sinusendothel der LN verstärkt exprimiert (Abb. 23, Mitte) noch bevor eine Tumorzell-Metastasierung stattgefunden hatte (Abb. 23, rechts).

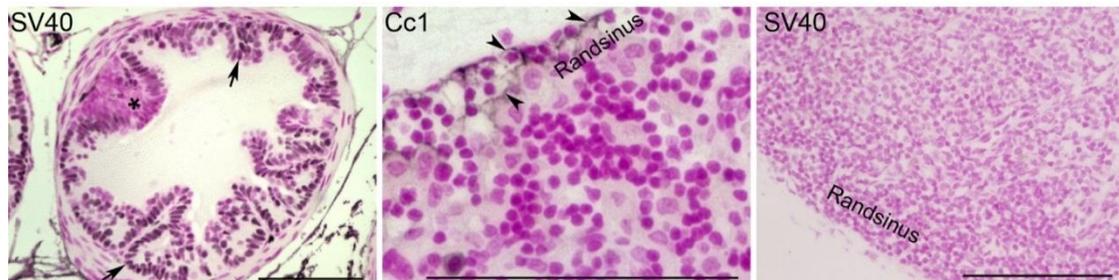


Abbildung 23: *Simian virus 40* (SV40) und *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1, Cc1) Einzel-Immunfärbungen an Prostata- und LN-Gewebe einer *Transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate*-(TRAMPC1-Maus im „*highgrade*“ prostatiche intraepitheliale Neoplasie (HGPIN)-Stadium im Alter von 12 Wochen postnatal

SV40-/CEACAM1-Färbung: Cc1, 3,3-Diaminobenzidin (DAB) braun/schwarz. Gegenfärbung mit Kernechtrot. *Scale-bar*=100 µm. **links:** Die SV40-Immunfärbung des Prostatagewebes zeigte eine murine Prostatadrüse mit HGPIN (*) mit einer deutlichen Expression des SV40-Tumor-Antigens (Tag) (schwarzer Pfeil). **Mitte:** Cc1 Immunfärbung an pelvinem LN-Gewebe. schwarze Pfeilköpfe: Cc1-positiver Randsinus. **rechts:** SV40-Immunfärbung an demselben LN-Schnitt wie in der CEACAM1-Immunfärbung. Das LN-Präparat war Tumorzell-frei, und zeigte keine SV40-positiven metastasierten Tumorzellen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 für die Lymphangiogenese analysiert. Dazu wurde die CEACAM1-Expression im Prostatagewebe von Patienten mit metastasiertem bzw. nicht-metastasiertem PCa und in den zum diagnostischen *Staging* entnommenen LN (potenzielle Metastasierungsorte) untersucht. Zudem wurde die Eignung von CEACAM1 und PSA als Prädiktoren der LN-Metastasierung und als Tumormarker evaluiert. Hierfür wurde humanes PCa- und LN-Gewebe von Niedrig-Risiko-PCa-Patienten ($G \leq 6$) von Patienten mit mittlerem Risiko ($G = 7$) und von Hoch-Risiko-PCa-Patienten ($G > 7$) Patienten [4] mit Hilfe von IHC-Färbungen analysiert und quantitativ ausgewertet. Aus den vorliegenden Befunden lassen sich folgende Aussagen ableiten:

- 1.) CEACAM1 ist beim PCa an der Regulation der Angiogenese und Lymphangiogenese beteiligt.
- 2.) Metastasierende PCa-Tumorzellen bilden in PCa-LN teilweise CEACAM1-exprimierende Zellkluster.
- 3.) Die durch ein primäres PCa in den LN-Sinusendothelzellen ausgelöste CEACAM1-Expression ist vor dem histologischen Nachweis von PCa-Tumorzellen bereits im pN0-Stadium detektierbar.
- 4.) PCa-Prostatadrüsen zeigen bei einem *Gleason Score* 3+3 und 3+4 eine heterogene CEACAM1- und PSA-Expression.
- 5.) Die CEACAM1-Expression in PCa Zellkluster in LN ist auf die äußeren Zellreihen beschränkt.
- 6.) Im TRAMPC1 PCa-Mausmodell ließen sich die die humanen Daten hinsichtlich der frühzeitigen CEACAM1-Expression in LN im Zuge der Metastasierung bestätigen.

4.1 CEACAM1 als regulativer Mediator der Angiogenese und Lymphangiogenese

Das für die Regulation der epithelialen Zellproliferation zuständige CEACAM1 ist im normalen Prostatagewebe auf der zum Lumen gerichteten Seite der Drüsenepithelzellen lokalisiert [96]. Die HGPIN stellt eine fakultative Präkanzerose des PCa dar. HGPIN-Areale weisen in der direkten Drüsenumgebung eine höhere Gefäßdichte auf [118, 119]. Während normale Prostatadrüsen mit starker luminaler CEACAM1-Expression keine CEACAM1-positiven Gefäße in der Drüsenumgebung besitzen [99], beobachteten Tilki

et al. (2006) parallel zur Verringerung der epithelialen CEACAM1-Expression in den HGPIN-Drüsen eine verstärkte endotheliale CEACAM1-Expression in benachbarten kleinen Blutgefäßen [99]. Weiterhin fanden die Autoren vereinzelt CEACAM1-positive Blutgefäße innerhalb von G3-(G3+3)-PCa-Arealen, in denen die Tumordrüsen eine starke epitheliale CEACAM1-Expression aufwiesen [99]. In einer weiteren Arbeit zeigten Kilic *et al.* (2007), dass beim PCa umliegende Lymphgefäße, die im normalen Prostatagewebe kein CEACAM1 exprimierten, CEACAM1-positiv wurden, wenn sie in enger Nachbarschaft zum PCa-Tumorgewebe lagen [102]. Die CEACAM1-Expression war besonders in den Lymphgefäßen der Tumorumgebung (T.S.) in einer gewissen Entfernung vom eigentlichen Tumor stark ausgeprägt [102]. In noch nicht publizierten Voruntersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe – ähnlich wie die hier präsentierten Befunde zum PCa – in menschlichem Harnblasenkarzinomgewebe neben einer starken CEACAM1-Expression im Lymphendothel, CEACAM1-positive-Tumorzellcluster im Lumen der CEACAM1-positiven Lymphgefäße nachweisen. Dabei fiel besonders auf, dass die randständigen Tumorzellen des Zellclusters eine starke CEACAM1-Expression aufwiesen, während Tumorzellen im Inneren des Zellclusters eine eher moderate CEACAM1-Expression zeigten. Basierend auf diesen Vorergebnissen stellte sich die Frage nach der potentiellen Rolle von CEACAM1 bei der lymphogenen Metastasierung des PCa. Zur Validierung der Befunde dieser Vorstudien wurde in der vorliegenden Studie in Gewebepräparaten von PCa-Patienten die Expression von CEACAM1 in Blut- und Lymphgefäßen untersucht. Hierzu wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit einem humanen CEACAM1-AB und dem Blutgefäßendothelmarker CD31 bzw. Lymphgefäßmarker Podoplanin durchgeführt.

Laut den CEACAM1/CD31-Doppelimmunfluoreszenzfärbungen exprimierten angiogen-aktivierte Blutgefäßen bereits bei fakultativen Präkanzerosen (PIN-Stadium) in der Nähe der PIN-Drüsen CEACAM1, wobei diese PIN-Drüsen eine verminderte epitheliale CEACAM1-Expression aufwiesen. Zudem wurden angiogen-aktivierte CEACAM1-positive Blutgefäße in der Tumorumgebung und in der Nähe von G3-Arealen (Abb.10) detektiert.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es in präkanzerogenen PCa-Stadien (PIN-Arealen) und in der Tumorumgebung zu einer gesteigerten angiogenen Aktivität in den kleinen Blutgefäßen kommt. Eine CEACAM1-Expression in großen Blutgefäßen wurde dagegen nicht beobachtet. Vermutlich begünstigt eine frühe Vaskularisierung und damit erhöhte Nährstoffversorgung in den PIN-Arealen das Tumorwachstum. Eine effiziente Vaskularisierung der Tumorumgebung ist für das Wachstum des Primarius

unverzichtbar. In Bereichen um G3-Tumordrüsen waren deutlich weniger angiogen-aktive Blutgefäße vorhanden als in den PIN-Arealen oder der Tumorumgebung. In der Nachbarschaft von G4-(4+4)-Tumordrüsenarealen wurden nur noch wenige CEACAM1-positive Blutgefäße detektiert. Die aufgrund der stark fortgeschrittenen Dedifferenzierung moderate Angiogenese in späten Tumorstadien begrenzt die weitere lokale Ausbreitung des Tumors.

Laut Tilki *et al.* (2006) [99] geht die verminderte epitheliale CEACAM1-Expression in den HGPIN-Drüsen mit einem Anstieg der VEGF-Konzentration und einer endothelialen CEACAM1-Expression in kleinen Blutgefäßen einher, was zu einer erhöhten Angiogenese-Rate führt. Auch eine VEGF-Stimulation in kleinen Blutgefäßen bewirkt eine verstärkte endotheliale CEACAM1-Expression [91]. Bei einer verminderten epithelialen CEACAM1-Expression in G3-Tumordrüsen kommt es dagegen vermutlich nur zu einem moderaten Anstieg der VEGF-Konzentration in den kleinen Blutgefäßen und folglich auch zu einer CEACAM1-Expression in einem Teil der assoziierten Blutgefäße [99]. G4-Areale zeigen lediglich eine moderate CEACAM1-Expression in den an den Tumordrüsen angrenzenden kleinen Blutgefäßen [99].

Die CEACAM1-Podoplanin-Doppelimmunfärbung an humanem PCa-Gewebe zeigte in der vorliegenden Studie eine verstärkte endotheliale CEACAM1-Expression in Podoplanin-positiven Lymphgefäßen. Die quantitative Analyse ergab deutliche Unterschiede bei der lymphendothelialen CEACAM1-Expression in verschiedenen Tumorearealen (Tumorumgebung, PIN-Areale, G3-Areale, G4-Areale und G5-(5+5)-Areale). Die Ergebnisse belegten eine signifikant erhöhte CEACAM1-Expression in den angiogen-aktivierten Lymphgefäßen im Bereich der Tumorumgebung und in den PIN-Arealen im Vergleich zu G3- und G4-Arealen (Abb. 11). Der Vergleich der G3- und G4-Areale ergab eine signifikant höhere Anzahl CEACAM1-positiver Lymphgefäßen in G3-Arealen (Abb. 11). In G5-Arealen wurden keine CEACAM1-positiven Lymphgefäße nachgewiesen (Abb. 11).

Somit unterstützen die vorliegenden Ergebnisse die These, dass CEACAM1 beim PCa eine wichtige Rolle bei der Lymphangiogenese spielt. Die Bedeutung der Lymphangiogenese scheint mit dem Fortschreiten der Dedifferenzierung des PCa-Tumorgewebes immer weiter abzunehmen, da die Anzahl an CEACAM1-positiven Lymphgefäßen in den G3- und G4-Arealen im Vergleich zur Tumorumgebung und in den PIN-Arealen signifikant reduziert war (Abb. 11). In G5-Arealen waren Podoplanin-positiven Lymphgefäßen nicht mehr nachweisbar. Dies könnte durch den Anstieg des interstitiellen Drucks in solchen soliden Tumormassen erklärt werden, weil

Lymphkapillaren einem solchen Druck nicht standhalten und dadurch bis zur Funktionslosigkeit komprimiert werden können. Da LN-Metastasen pathogenetisch erste Symptome einer gesteigerten Malignität des Tumors darstellen und bei ihrem Auftreten die Prognose betroffener Patienten deutlich sinkt [64], kann davon abgeleitet werden, dass Lymphgefäße maßgeblich am Transport der Tumorzellen in umliegendes lymphatisches Gewebe beteiligt sind und damit am Anfang der Metastasenbildung von entscheidender Bedeutung sind.

Zahlreiche Studien belegen die Bedeutung einer ausreichenden Gefäß- und Lymphangiogenese für das Tumorwachstum [69, 77, 103, 104]. Vergleichbar mit den Befunden der vorliegenden Arbeit wiesen Kilic *et al.* (2007) beim Harnblasenkarzinom, in CIS-Arealen beim Hodenkrebs sowie in PCa-PIN-Arealen die Bedeutung von CEACAM1 für die Lymphangiogenese nach [102]. Weiter zeigten die Autoren, dass eine endotheliale CEACAM1-Überexpression in einer humanen Lymphendothel-Zelllinie zu einer gesteigerten VEGFR-3-Expression führt [102] und dass eine verminderte epitheliale CEACAM1-Expression im Harnblasenkarzinomgewebe die Expression prolymphangiogener Faktoren (VEGF-C, VEGF-D) erhöht [97, 99]. Ähnliche Ergebnisse wurden *in vivo* bei der humanen PCa-Zelllinie *DU-145* beobachtet [97, 99]. Die Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D binden mit hoher Affinität an VEGFR-3 und stimulieren die Lymphangiogenese [69, 76-78, 106, 120]. Eine erhöhte VEGF-C- und VEGF-D-Expression fördert in Tumoren die Lymphangiogenese und erhöht das Risiko einer LN-Metastasierung [69, 76-78].

Weiter zeigten Padera *et al.* (2002), dass intratumorale Lymphgefäße kollabieren [80], was die vorliegende Beobachtung erklären könnte, dass bei Patienten mit einem höheren *Gleason Score* Podoplanin-positive Lymphgefäße weniger bzw. nicht mehr nachweisbar waren (Abb. 11). Lymphkapillaren werden durch eine Endothelzellschicht und eine darunterliegende diskontinuierliche Basalmembran gebildet, und sind im Gegensatz zu Blutgefäßen nicht mit zirkulären Perizyten ausgestattet [121]. Daher neigen lymphatische Kapillaren bei höherem Gewebsdruck eher zum Kollabieren als Gefäßkapillaren.

In der vorliegenden Studie nahm die CEACAM1-Expression mit Zunahme des *Gleason Scores* in den angiogen-aktivierten Lymphgefäße deutlicher ab als in den angiogen-aktivierten Blutgefäßen. Dieser Befund lässt sie Schlussfolgerung zu, dass sowohl die Gefäßangiogenese als auch Lymphangiogenese in non-invasiven Präkanzerosen (PIN) und in der Tumorumgebung eine wichtige Rolle für die

Tumorgenese spielt. In späten PCa-Stadien (G4) und in intratumoralen Arealen ist jedoch ausschließlich die Gefäßangiogenese von Bedeutung.

4.2 Cluster metastasierender PCa-Tumorzellen mit CEACAM1-Expression in PCa-LN

Aufgrund seiner verminderten Expression in verschiedenen Tumoren (Kolonkarzinom [122], PCa [123]) wurde CEACAM1 eine tumorsuppressive Wirkung zugeschrieben [123]. Der Fokus bisheriger PCa-Studien lag hauptsächlich auf der Analyse von humanem PCa-Prostatagewebe [102]. In der vorliegenden Dissertation sollte daher die Rolle von CEACAM1 bei der lymphogenen Metastasierung von PCa analysiert werden. Hierzu wurde humanes LN-Gewebe, das bei einer radikalen retropubischen Prostatektomie entnommen wurde, auf einer frühen Metastasierung untersucht. Auf der Basis histopathologischer Befunde wurden Schnittpräparate mit (pN1) bzw. ohne lymphogene Metastasierung (pN0) unterschieden.

Zunächst erfolgte eine morphologische Analyse der humanen PCa-LN mit einer HE-Übersichtsfärbung. Humane PCa-LN mit Tumorzellinfiltration (pN1) wiesen morphologische Veränderung bis hin zur Bildung von „Tumordrüsen“ auf (Abb. 12). In den Bereichen zwischen den „Tumordrüsen“ im Tumorstroma lagen zahlreiche Gefäße (Abb. 12). In LN mit einer starken „Drüsenbildung“ waren die in pN0-LN-Präparaten nachweisbaren Sinusoide (Abb. 12 obere Reihe) aufgrund der fortgeschrittenen Dedifferenzierung des lymphatischen Gewebes nicht mehr erkennbar (Abb. 12 und Abb. 13).

Mittels IHC-Analysen mit einem CEACAM1-AB wurde anschließend CEACAM1 in den Sinusendothelzellen und fibroblastischen Retikulumzellen der lymphatischen Sinusoide in PCa-pN0-LN-Geweben nachgewiesen (Abb. 13 obere Reihe, Tab. 9). Auch in den pN1-LN-Präparate ohne „Drüsenbildung“ waren CEACAM1-positive Zellen nachweisbar (Abb. 13 mittlere Reihe, links, Tab. 9). PCa-pN1-LN mit „Drüsenbildung“ (Abb. 13 mittlere Reihe, rechts) zeigten eine deutlich geringere CEACAM1-Expression im Vergleich zu pN1-LN ohne „Drüsenbildung“ (Abb. 13 obere Reihe und mittlere Reihe, links). Dabei beschränkte sich die CEACAM1-Expression der pN1-LN mit „Drüsenbildung“ vorwiegend auf die „Drüsenlumina“ des LN-Randbereichs in der Nähe der Kapsel (Abb. 13 mittlere Reihe, rechts). Diese Lokalisation entsprach in etwa der Lokalisierung der CEACAM1-Expression in normalen Prostatadrüsen und G3-Tumordrüsen [99].

4.3 CEACAM1-Expression in LN-Sinusendothelzellen vor dem Auftreten von PCa-Tumorzellen

Aus IHC-Untersuchungen (Ergün *et al.* nicht publiziert, Daten des *Humanen Protein Atlas* [117]) ist bekannt, dass gesunde humane LN kein CEACAM1-exprimieren. Daher war der vorliegende Nachweis der CEACAM1-Expression in Tumorzell-freien“ pN0-LN ein möglicher Indikator für eine Mikrometastasierung. Auch in dem hier verwendeten murinen PCa-Tumormodell war in den LN eine CEACAM1-Expression nachweisbar bevor die Tumorzellen das Gewebe erreichten (s. Abb. 23).

Zirkulierende Tumorzellen, die sich noch nicht im LN-Gewebe niedergelassen haben, könnten Faktoren sezernieren, die zu einer Expression von CEACAM1 im pN0-LN-Sinus führen und so die LN auf eine bevorstehende Metastasierung vorbereiten. Die frühe Expression des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 im Lymphsinus könnte die Ansiedlung metastasierender Tumorzellen begünstigen.

In der vorliegenden Arbeit zeigten pN1-LN-Gewebe mit „Drüsenbildung“ an den der Lymphkapsel nahen Drüsen (Abb. 13 mittlere Reihe, rechts) eine luminale CEACAM1-Expression, wie sie auch in G3-Tumordrüsen im PCa-Prostatagewebe detektiert wurde (Abb. 11 und Abb. 19 dritte Reihe). Im PCa-Prostatagewebe (Abb. 19) kam es nach der Ausbildung von G3-Tumordrüsen mit zunehmender Malignität ($G>7$) zu einer deutlichen Suppression der CEACAM1-Expression (Abb. 19 vierte Reihe, Abb. 20 Grafik rechts unten, Tab. 9) und zu einer Dedifferenzierung der physiologischen Zellstrukturen [96].

Da in der HE-Übersichtsfärbung der humanen PCa-LN-Präparate eine auffällige Gefäßdichte im Tumorstoma der „drüsigen“ pN1-LN-Präparate (Abb. 12 mittlere Reihe) beobachtet wurde, sollte eine CEACAM1-/CD31-Doppel-Immunfluoreszenzfärbung weiteren Aufschluss über eine mögliche Beteiligung von CEACAM1 bei der Angiogenese im PCa-LN-Gewebe geben. Analog zum PCa-Prostatagewebe (Abb. 10) war auch im PCa-LN-Gewebe (Abb. 14) CEACAM1 an der Angiogenese beteiligt. Die meisten CEACAM1-positiven angiogen-aktivierten Blutgefäße wurden bei Hochrisiko PCa-Patienten im Tumorstroma zwischen den „drüsigen“ Arealen detektiert (Abb. 14 weiße Pfeile).

Zur Analyse der Rolle von CEACAM1 bei der Lymphangiogenese im PCa-LN-Gewebe wurden Doppelimmunfärbungen mit CEACAM1 und Podoplanin durchgeführt. Die quantitative Auswertung (Abb. 18) zeigte einen signifikant höheren Anteil an CEACAM1/Podoplanin doppelt-positiven Lymphgefäße in humanem PCa-LN-Gewebe bei $G\leq 7$ Patienten im Vergleich zu $G>7$ Patienten (Abb. 18 Grafik links). Dagegen war die Anzahl an Podoplanin-positiven Lymphgefäßen bei $G>7$ Patienten im Vergleich zu

G \leq 7 Patienten signifikant größer (Abb. 18 Grafik rechts). Die erhöhte Anzahl an Podoplanin-positiven Lymphgefäßen im LN von G $>$ 7 Patienten war auf die erhöhte Gefäßdichte im Tumorstroma zwischen den „drüsigen“ Arealen zurückzuführen (Abb. 18 untere Reihe; HE-Übersichtsfärbung: Abb. 12 mittlere Reihe). Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass ähnlich wie im PCa-Prostatagewebe auch im LN-Gewebe CEACAM1 bei der Lymphangiogenese mit steigender Malignität an Bedeutung verliert.

Die beobachtete CEACAM1-Expression in angiogen-aktivierten Blut- und Lymphgefäßen bei pN0- und pN1-PCa-LN könnte über den oben beschriebenen Effekt einer erleichterten Ansiedlung von Tumorzellen aufgrund der Expression des Zelladhäsionsmoleküls einen weiteren Metastasierungsvorteil bieten. Die gesteigerte Gefäßneubildung garantiert möglicherweise ein optimales Versorgungsmilieu für die beginnende Metastasierung. Vom Primarius produzierte Wachstumsfaktoren (VEGF-C, VEGF-D) fördern die Gefäß- und Lymphangiogenese im LN-Gewebe und stellen das Überleben der ankommenden Tumorzellen sicher [124-127]. Auch ein gut ausgebildetes Tumorstroma begünstigt im tumorösen LN die Gefäß- und Lymphangiogenese und damit die CEACAM1-Expression in angiogen-aktivierten Gefäßen. Dies könnte der gesteigerten Gefäß- und Lymphangiogenese in der Tumorumgebung der PCa-Prostata entsprechen (Abb. 10 und Abb. 11).

Insgesamt lassen die vorliegenden Befunde darauf schließen, dass die frühe CEACAM1-Expression in den als „Tumorzell-frei“ diagnostizierten LN als Vorbereitung auf die Tumorzellinvasion dient. Möglicherweise lässt sich die bereits im pN0-LN-Gewebe nachweisbare CEACAM1-Expression als Indikator für eine Mikrometastasierung nutzen. Tumorpatienten mit einer CEACAM1-Expression im LN-Sinus sollten unter besonderer Beobachtung stehen.

4.4 Heterogene CEACAM1- und PSA-Expression in PCa-Gewebe mit einem *Gleason Score* 3+3 und 3+4

In den IHC-Analysen an humanem PCa-LN zeigten einzelne Zellen im Gewebe (Abb. 16) und in den Gefäßlumina eine deutliche CEACAM1-Expression. Da auch Lymphozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen CEACAM1 exprimieren [128-131], sollte ein geeigneter Marker gesucht werden, um CEACAM1-positive Zellen als Tumorzellen zu klassifizieren. PSA wird bereits als Serummarker in der Diagnostik von PCa-Patienten eingesetzt und wird als sicherer Prädiktor eingestuft [132-134]. In IHC-Analysen wird PSA als Marker für PCa-Prostatagewebe verwendet [28, 135-138].

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Eignung von PSA als Marker für metastasierende Tumorzellen evaluiert werden.

Dazu wurde zunächst die PSA-Expression in humanem PCa-Prostatagewebe mittels Doppelimmunfärbungen analysiert. In den Prostatadrüsen von Niedrigrisiko-PCa-Patienten (Abb. 19 erste Reihe) war eine gleichmäßig verstärkte CEACAM1- und PSA-Expression nachweisbar. In Prostatadrüsen von Mittel- und Hochrisikopatienten entwickelten sich die CEACAM1-/PSA-Expressionsmuster dagegen teilweise gegenläufig (Abb. 19 zweite Reihe). Neben zweischichtigen Prostatadrüsen mit einer reduzierten PSA-Expression (PSA^{low}) und einer starken CEACAM1-Expression (Cc1⁺) kamen auch PSA-positive Drüsen (PSA⁺) mit einer reduzierten CEACAM1-Expression (Cc1^{low}) vor (Abb. 19 zweite Reihe, Abb. 20 Grafik links). Der Anteil an CEACAM1 und PSA doppelt positiven Drüsen (Cc1⁺/PSA⁺) nahm mit steigendem *Gleason Score* der Patienten signifikant ab (Abb. 20 Grafik rechts oben).

Ähnliche Unterschiede zwischen Hochrisiko- und Mittel- bzw. Niedrigrisiko-PCa-Prostatagewebe waren auch bei den G3-Tumordrüsen detektierbar (Abb. 19 dritte und vierte Reihe). Während die meisten G3-Tumordrüsen ähnlich wie die normalen zweireihigen Prostatadrüsen (Abb. 19 dritte Reihe) bei Niedrigrisiko PCa-Patienten eine deutliche CEACAM1- und PSA-Expression (Cc1⁺/PSA⁺) zeigten, wurden bei Mittel- und Hochrisiko PCa-Patienten auch G3-Tumordrüsen mit einer deutlich verminderten CEACAM1-Expression (Cc1^{low}/PSA⁺) detektiert (Abb. 20 Grafik rechts unten). G4-Tumordrüsen zeigten in den verbleibenden Drüsenlumina neben einer starken PSA-Expression eine verminderte CEACAM1-Expression (Cc1^{low}/PSA⁺) (Abb. 19 fünfte Reihe). Eine CEACAM1-Expression wurde primär in den angrenzenden kleinen Gefäßen im Stroma beobachtet (Abb. 19 fünfte Reihe).

Somit könnte das CEACAM1- und PSA-Expressionsmuster möglicherweise Aufschluss über den lokalen PCa-Malignitätsgrad geben. Eine Abnahme des Anteils CEACAM1/PSA-doppeltpositiver, zweireihiger Prostatadrüsen (Abb. 20 Grafik rechts oben) spricht für einen zunehmenden Malignitätsgrad. Zweireihige Prostatadrüsen mit einer reduzierten CEACAM1-Expression traten erst bei PCa-Patienten mit einem intermediären Risiko ab einem *Gleason Score* von G3+4 auf (Abb. 20 Grafik links) und waren bei Niedrigrisiko PCa-Patienten mit einem *Gleason Score* von G3+3 nicht nachweisbar (Abb. 20 Grafik links). Auch dieser Unterschied könnte zur Abschätzung der Malignität verwendet werden. Laut Busch *et al.* (2002) [96] zeigen PIN-Drüsen bereits eine deutlich herabgesetzte CEACAM1-Expression. Laut den vorliegenden Analysen bleibt trotz einer verminderten epithelialen CEACAM1-Expression die PSA-

Expression in PIN-Drüsen erhalten. Das erstmals bei PCa-Patienten mit intermediärem Risiko auftretende heterogene CEACAM1/PSA-Expressionsmuster (entweder Cc1⁺/PSA^{low} oder Cc1^{low}/PSA⁺) ist ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zu den Niedrigrisiko PCa-Patienten (Abb. 19 zweite Reihe, Abb. 20 Grafik links).

Auch eine Cc1-/PSA-Expressionsanalyse der G3-Tumordrüsen im PCa-Prostatagewebe könnte Hinweise auf das zu erwartende Metastasierungsverhalten des Tumors geben. Es bestand ein deutlicher Unterschied innerhalb der intermediären Risiko-Gruppe bei PCa-Patienten ohne (pN0) und mit (pN1) LN-Metastasen. Während G3-Tumordrüsen in G₃/pN0-PCa-Patienten in nahezu 100 % eine starke CEACAM1- und PSA-Expression (Cc1⁺/PSA⁺) aufwiesen, wurde bei G₃/pN1-Patienten ein deutlicher Rückgang dieses Expressionsmusters beobachtet. Auch Hochrisiko-PCa-Patienten besaßen signifikant weniger starke G3-Tumordrüsen mit einer starken CEACAM1- und PSA-Expression (Cc1⁺/PSA⁺) als G₃/pN1-Patienten (Abb. 19 dritte und vierte Reihe, Abb. 20 Grafik rechts unten). Diese Unterschiede könnten dazu genutzt werden innerhalb der intermediären Risiko-PCa-Patientengruppe zwischen Patienten mit hoher und geringer LN-Metastasierungswahrscheinlichkeit zu unterscheiden.

Da CEACAM1 nur in normalen zweireihigen und tubulären G3-Tumordrüsen exprimiert wird [96] und G4-Tumordrüsen nahezu keine CEACAM1-Expression mehr aufweisen [96], belegt die beobachtete moderate PSA-Expression in G4-Tumordrüsen [139] die fortgeschrittene Malignität (Abb. 19 fünfte Reihe).

4.5 CEACAM1-Expressionsmuster in den PCa-Zellclustern der LN

Im Anschluss an die PCA-Expressionsanalyse in den PCa-Geweben sollte die Eignung von PSA als Marker für metastasierende Tumorzellen im LN-Gewebe analysiert werden. Hierzu wurden Immunfärbungen für PSA bzw. Doppelimmunfärbungen für CEACAM1 und PSA an humanem PCa-LN-Gewebe mit und ohne LN-Metastasen durchgeführt.

Die PSA-Immunfärbung ergab ein deutliches Signal in den „Tumordrüsen“ in pN1-LN (Abb. 17 untere Reihe), während in pN0-LN und in pN1-LN ohne „Drüsenbildung“ keine PSA-positiven Zellen detektiert wurden (Abb. 17 obere Reihe). Die PSA-Expression in den „drüsigen“ Arealen der pN1-LN entsprach der PSA-Expression in den G3-Tumordrüsen des PCa-Prostatagewebes. Die CEACAM1/PSA-Doppelimmunfärbungen sollten weiteren Aufschluss über den exakten Status der LN-Gewebe geben. Dabei zeigte sich in pN0-LN eine starke CEACAM1-Expression im Sinusendothel ohne PSA-Expression (Abb. 18 obere Reihe), während in pN1-LN ohne erkennbare

morphologische Veränderungen lokale Ansammlungen von Tumorzellclustern mit einer starken CEACAM1- und PSA-Expression (Cc1⁺/PSA⁺) (Abb. 18 mittlere Reihe) beobachtet wurde. Dabei waren die nach außen gerichteten Zellen der Tumorzellcluster CEACAM1-positiv, während zentral gelegene Tumorzellen PSA-positiv waren (Abb. 18 mittlere Bildreihe). pN1-LN mit ausgeprägter „Drüsenbildung“ (Abb. 18 untere Reihe, Mitte) waren analog zu den G3-Tumordrüsen im Prostatagewebe von G>7/pN1-Patienten (Abb. 19 vierte Reihe) PSA-positiv mit moderater CEACAM1-Expression (Abb. 18 untere Reihe).

Das vergleichbar starke CEACAM1- und PSA-Expressionsmuster der „Tumordrüsen“ in den G3-Arealen der Prostata und in den „drüsigen“ pN1-LN lässt den Schluss zu, dass der Tumor an beiden Lokalisationen Mechanismen entwickelt, um sich vor der Reaktion der umgebenden Zellen zu schützen. Auch in anderen humanen invasiven Tumoren (z. B. Melanom, Magenkarzinom, Lungenkarzinom) wurde eine CEACAM1-Expression beobachtet [84]. Beim malignen Melanom förderte eine CEACAM1-Expression an der invasiven Front die fortschreitende Metastasierung [113, 114]. Aufgrund der Beschränkung der CEACAM1-Expression auf die randständigen Zellen der Tumorzellcluster ist beim PCa von einem ähnlichen, die Metastasierung fördernden Effekt auszugehen.

Laut Queisser *et al.* (2015) [28] kann PSA zur Detektion von PCa-LN-Metastasen verwendet werden. Durch die zusätzliche Nutzung von CEACAM1 ist eine exakte Klassifizierung des LN-Status möglich, da nicht nur bislang unerkannte Mikrometastasen detektiert, sondern auch spätere Differenzierungsstadien gut gegeneinander abgrenzbar sind. Die zusätzliche Analyse von Tumorzellmarkern wie Zytokeratine [26, 27] und den Androgenrezeptor [140, 141] könnte ebenfalls dazu beitragen, den Prozess der PCa-LN-Metastasierung besser zu verstehen.

4.6 CEACAM-Expression im TRAMPC1 PCa-Mausmodell

Zunächst wurde die CEACAM1-Expression in Schnittpräparaten von gesundem Gewebe einer B6.J-wt-Maus untersucht. Es zeigte sich eine deutliche luminale CEACAM1-Expression im Prostatadrüsenepithel (Abb. 21, 1. Reihe links; Abb. 22), während die umliegenden Blut- (Abb. 21, 1. Reihe links) und Lymphgefäße (Abb. 22) keine CEACAM1-Expression aufwiesen. Das Fehlen einer CEACAM1-Immunreaktion in Geweben von Cc1ko-Mäusen bestätigte die Spezifität des verwendeten CEACAM1-AB (Abb. 21, 1. Reihe rechts).

In den LN-Präparaten der B6.J-wt- (Abb. 21, 2. Bildreihe, links) und Cc1ko-Mäuse (Abb. 21, 2. Reihe, rechts) war ebenfalls kein CEACAM1 nachweisbar. Damit entsprach die CEACAM1-Expression im gesunden murinen Prostata- und LN-Gewebe dem Expressionsmuster im gesunden humanen Gewebe.

In dem von Greenberg *et al.* [116, 142] entwickelten TRAMPC1-Maus-PCa-Modells lässt sich die PCa-Entwicklung und lymphogene Metastasierung untersuchen. Männliche TRAMPC1-Mäuse exprimieren ab der Geschlechtsreife das SV40-Onkogen im Prostatadrüsenepithel, entwickeln im Alter von ~12 Wochen HGPIN, im Alter von ~24 Wochen PCa und ab ~30 Wochen LN-Metastasen, die sich mit Hilfe des SV40-AB detektieren lassen [116]. In der vorliegenden Studie sollte mit dem transgenen TRAMPC1-Maus-PCa-Modell die Rolle von CEACAM1 bei der lymphogenen Metastasierung des PCa analysiert werden.

Männliche TRAMPC1-Mäuse zeigten – wie von Greenberg *et al.* beschrieben – im Alter von 12 Wochen eine deutliche SV40-Immunfärbung im Prostatadrüsenepithel (Abb. 23, 1. Bild links) mit deutlichen HGPIN-Bereichen (Abb. 23, 1. Bild links). In den regionalen pelvinen LN war eine deutliche CEACAM1-Expression im Sinusendothel der LN, insbesondere im Randsinus-Bereich erkennbar (Abb. 23, 2. Bild, Mitte), noch bevor eine Tumorzell-Metastasierung (Nachweis über SV40-Expression) stattgefunden hatte (Abb. 23, 3. Bild links).

Damit waren die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der CEACAM-Expression im Rahmen der PCa-LN-Metastasierung im humanen und murinen System vergleichbar: Gesunde LN exprimieren kein CEACAM1. Bereits in frühen PCa-Stadien vor einer histopathologisch nachweisbaren LN-Metastasierung wird das Sinusendothel CEACAM1-positiv, was auf eine frühe Mikrometastasierung hindeuten könnte. Somit könnte CEACAM1 als früher diagnostischer Marker für einen tendenziell zu erwartende lymphogene Metastasierung beim PCa herangezogen werden. Durch die präzisere prognostische Einschätzung könnten frühzeitig Patienten identifiziert werden, die von einer engmaschigeren Kontrolle profitieren.

Zukünftige Analysen am Mausmodell mit Hilfe von miteinander gekreuzten TRAMPC1- und Cc1ko-Mäusen, könnten weiteren Aufschluss über die Rolle von CEACAM1 bei der PCa-Entstehung und lymphogenen Metastasierung geben. Somit wäre es möglich den Zusammenhang zwischen der epithelialen CEACAM1-Expression im Prostatadrüsenepithel, die tumorsupprimierend wirkt, und der CEACAM1-Expression im Sinusendothel der LN besser zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Der epithelialen Präsenz des *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1) in Prostatadrüsen wird eine tumorsupprimierende Funktion zugeschrieben. Maligne Veränderungen des Prostatadrüsenepithels bei einem PCa führen zu einer Abnahme der epithelialen CEACAM1-Expression, zu einem Verlust der Zellpolarität und zu einer erhöhten Zellproliferation (prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN)). Während des PIN-Stadiums exprimieren benachbarte Blut- und Lymphgefäße CEACAM1. CEACAM1 selbst wirkt pro-angiogen und stimuliert die Gefäßneubildung und auch die Neubildung von Lymphgefäßen, Lymphangiogenese. Seine Rolle in der Tumor-Lymphangiogenese und dadurch bedingten Metastasierung von Tumoren wurde bisher nicht ausreichend geklärt. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von CEACAM1 bei der lymphogenen PCa-Metastasierung anhand von immunhistochemischen (IHC) Analysen am humanem PCa-Prostata- und Lymphknoten-(LN)-Gewebe, sowie im Mausmodell zu analysieren.

Laut den Immunfluoreszenzanalysen traten in den PIN-Arealen signifikant mehr CEACAM1-positive Blut- und Lymphgefäße auf, als in den darauffolgenden Tumorstadien. Weiter wurde eine CEACAM1-Expression in LN-Sinusgewebe bereits bei Niedrig-Risiko-Patienten (pN0) detektiert. Diese frühe CEACAM1-Expression trat auch in den LN im PCa-Mausmodell auf. Weiter wurde im LN-Gewebe von „Hoch-Risiko“-Patienten (pN1) eine luminale CEACAM1-Expression innerhalb der aus Tumorzellen bestehenden Drüsen beobachtet, die mit der CEACAM1-Expression in nativen Prostatadrüsen vergleichbar ist. Auch das angiogen-aktivierte Gefäßendothel von pN0- und pN1-LN war CEACAM1-positiv. Bei Hoch-Risiko-Patienten (pN1) nahmen die CEACAM1-positiven Blut- und Lymphgefäße im Tumorstroma mit zunehmender Dedifferenzierung des Gewebes ab. Die CEACAM1/PSA-Doppelimmunfluoreszenzanalysen ergaben eine heterogene Expression der beiden Marker bei *Intermediate-risk*-Patienten und mit zunehmender Dedifferenzierung des Tumorgewebes einen epithelialen Verlust der CEACAM1-Expression in den PSA-positiven G3-Tumordrüsen. Das Fehlen von PSA in pN0-LN und die nachweisbare Expression von PSA in pN1-LN bestätigten PSA als geeigneten PCa-Zellmarker in LN. In pN1-LN ohne Drüsenbildung traten Zellansammlungen mit einer nach außen gerichteten CEACAM1-positiven Front und einem im Zentrum liegenden PSA-positiven Bereich auf. Diese Befunde belegen einen Zusammenhang zwischen der endothelialen CEACAM1-Expression im Sinus und der Mikrometastasierungswahrscheinlichkeit im pN0-LN-Gewebe von PCa-Patienten. Potentiell lässt sich daher im Niedrig-Risiko-PCa-

Patientenkollektiv über eine CEACAM1-Bestimmung in LN das Risiko für eine Metastasierung frühzeitig erkennen.

6 Literaturverzeichnis

1. Wirth, M.W., Ackermann, Aberti, Albrecht, Göckel-Beining, Fröhner, Hinkelbein, Miller, Rübber, Wiegel, Wolff, Wörmann, *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms*. Deutsche Gesellschaft für Urologie (DGU), 2009. **1.03**.
2. Benninghoff, D., *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Vol. 17. 2008, München: Elsevier.
3. Robert-Koch-Institut, *Krebs in Deutschland 2015/2016*. 3.22 Prostata. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
4. Mottet N., B.P.J., Bellmunt J., van den Bergh R.C.N., Bolla M., van Casteren N.J., Cornford P., Joniau S., Mason M.D., Matveev V., van der Kwast T.H., van der Poel H., Rouvière O., Wiegel T., *Guidelines on Prostate Cancer*. European Association of Urology, 2014.
5. Gronberg, H., *Prostate cancer epidemiology*. Lancet, 2003. **361**(9360): p. 859-64.
6. Hayes, R.B., et al., *Prostate cancer risk in U.S. blacks and whites with a family history of cancer*. Int J Cancer, 1995. **60**(3): p. 361-4.
7. Whittemore, A.S., et al., *Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada*. Am J Epidemiol, 1995. **141**(8): p. 732-40.
8. Graham, S., et al., *Diet in the epidemiology of carcinoma of the prostate gland*. J Natl Cancer Inst, 1983. **70**(4): p. 687-92.
9. Hebert, J.R., et al., *Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(21): p. 1637-47.
10. Morton, R.A., Jr., *Racial differences in adenocarcinoma of the prostate in North American men*. Urology, 1994. **44**(5): p. 637-45.
11. Huggins, C. and C.V. Hodges, *Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate*. 1941. J Urol, 2002. **168**(1): p. 9-12.
12. Fillmore, R.A., et al., *New concepts concerning prostate cancer screening*. Exp Biol Med (Maywood), 2014. **239**(7): p. 793-804.
13. Schroder, F.H., et al., *Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study*. N Engl J Med, 2009. **360**(13): p. 1320-8.
14. Hoogendam, A., F. Buntinx, and H.C. de Vet, *The diagnostic value of digital rectal examination in primary care screening for prostate cancer: a meta-analysis*. Fam Pract, 1999. **16**(6): p. 621-6.
15. Philip, J., et al., *Is a digital rectal examination necessary in the diagnosis and clinical staging of early prostate cancer?* BJU Int, 2005. **95**(7): p. 969-71.
16. Halpern, E.J. and S.E. Strup, *Using gray-scale and color and power Doppler sonography to detect prostatic cancer*. AJR Am J Roentgenol, 2000. **174**(3): p. 623-7.
17. Hara, N., et al., *Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) is a useful modality for the precise detection and staging of early prostate cancer*. Prostate, 2005. **62**(2): p. 140-7.
18. Mullerad, M., et al., *Prostate cancer: detection of extracapsular extension by genitourinary and general body radiologists at MR imaging*. Radiology, 2004. **232**(1): p. 140-6.
19. Rom, M., F.E. Kuehhas, and B. Djavan, *New findings in bladder and prostate cancer: highlights of the 22nd annual congress of the European association of urology, march 21-24, 2007, berlin, Germany*. Rev Urol, 2007. **9**(4): p. 214-9.

20. Johnson, D.E. and A.C. von Eschenbach, *Prostatic carcinoma: a trilogy of clinical expressions*. South Med J, 1980. **73**(10): p. 1304-7.
21. Huland, H., *Urologie*. 1997, Berlin: Springer Verlag.
22. Wernert, N., G. Seitz, and T. Achtstatter, *Immunohistochemical investigation of different cytokeratins and vimentin in the prostate from the fetal period up to adulthood and in prostate carcinoma*. Pathol Res Pract, 1987. **182**(5): p. 617-26.
23. Shah, R.B., et al., *Comparison of the basal cell-specific markers, 34betaE12 and p63, in the diagnosis of prostate cancer*. Am J Surg Pathol, 2002. **26**(9): p. 1161-8.
24. Moll, R., et al., *The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells*. Cell, 1982. **31**(1): p. 11-24.
25. Brawer, M.K., et al., *Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate*. Cancer Res, 1985. **45**(8): p. 3663-7.
26. Isayeva, T., et al., *Tumorstatic effects of endostatin in prostate cancer is dependent on androgen receptor status*. Prostate, 2009. **69**(10): p. 1055-66.
27. Ishikawa, Y., et al., *Histopathologic determinants of regional lymph node metastasis in early colorectal cancer*. Cancer, 2008. **112**(4): p. 924-33.
28. Queisser, A., et al., *Comparison of different prostatic markers in lymph node and distant metastases of prostate cancer*. Mod Pathol, 2015. **28**(1): p. 138-45.
29. Roehl, K.A., et al., *Cancer progression and survival rates following anatomical radical retropubic prostatectomy in 3,478 consecutive patients: long-term results*. J Urol, 2004. **172**(3): p. 910-4.
30. Lopez-Beltran, A., et al., *Current practice of Gleason grading of prostate carcinoma*. Virchows Arch, 2006. **448**(2): p. 111-8.
31. Kattan, M.W. and J. Eastham, *Algorithms for prostate-specific antigen recurrence after treatment of localized prostate cancer*. Clin Prostate Cancer, 2003. **1**(4): p. 221-6.
32. Makarov, D.V., et al., *Updated nomogram to predict pathologic stage of prostate cancer given prostate-specific antigen level, clinical stage, and biopsy Gleason score (Partin tables) based on cases from 2000 to 2005*. Urology, 2007. **69**(6): p. 1095-101.
33. Svanholm, H. and H. Mygind, *Prostatic carcinoma reproducibility of histologic grading*. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A, 1985. **93**(2): p. 67-71.
34. Partin, A.W., et al., *Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium*. Urology, 2001. **58**(6): p. 843-8.
35. Epstein, J.I., et al., *Prediction of progression following radical prostatectomy. A multivariate analysis of 721 men with long-term follow-up*. Am J Surg Pathol, 1996. **20**(3): p. 286-92.
36. Netto, G.J. and J.I. Epstein, *Widespread high-grade prostatic intraepithelial neoplasia on prostatic needle biopsy: a significant likelihood of subsequently diagnosed adenocarcinoma*. Am J Surg Pathol, 2006. **30**(9): p. 1184-8.
37. Moore, C.K., et al., *Prognostic significance of high grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical small acinar proliferation in the contemporary era*. J Urol, 2005. **173**(1): p. 70-2.
38. Qian, J., P. Wollan, and D.G. Bostwick, *The extent and multicentricity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in clinically localized prostatic adenocarcinoma*. Hum Pathol, 1997. **28**(2): p. 143-8.
39. Keetch, D.W., et al., *Morphometric analysis and clinical followup of isolated prostatic intraepithelial neoplasia in needle biopsy of the prostate*. J Urol, 1995. **154**(2 Pt 1): p. 347-51.

40. McNeal, J.E. and C.E. Yemoto, *Spread of adenocarcinoma within prostatic ducts and acini. Morphologic and clinical correlations.* Am J Surg Pathol, 1996. **20**(7): p. 802-14.
41. McNeal, J.E. and D.G. Bostwick, *Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate.* Hum Pathol, 1986. **17**(1): p. 64-71.
42. Bostwick, D.G. and M.K. Brawer, *Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer.* Cancer, 1987. **59**(4): p. 788-94.
43. Bostwick, D.G., et al., *Architectural patterns of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia.* Hum Pathol, 1993. **24**(3): p. 298-310.
44. Bostwick, D.G. and J. Qian, *High-grade prostatic intraepithelial neoplasia.* Mod Pathol, 2004. **17**(3): p. 360-79.
45. Davidson, D., et al., *Prostatic intraepithelial neoplasia is a risk factor for adenocarcinoma: predictive accuracy in needle biopsies.* J Urol, 1995. **154**(4): p. 1295-9.
46. Iczkowski, K.A., et al., *Diagnosis of "suspicious for malignancy" in prostate biopsies: predictive value for cancer.* Urology, 1998. **51**(5): p. 749-57; discussion 757-8.
47. Borboroglu, P.G., et al., *Repeat biopsy strategy in patients with atypical small acinar proliferation or high grade prostatic intraepithelial neoplasia on initial prostate needle biopsy.* J Urol, 2001. **166**(3): p. 866-70.
48. Gleason, D.F. and G.T. Mellinger, *Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging.* J Urol, 1974. **111**(1): p. 58-64.
49. Epstein, J.I., et al., *The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma.* Am J Surg Pathol, 2005. **29**(9): p. 1228-42.
50. Helpap, B. and L. Egevad, *Modified Gleason grading. An updated review.* Histol Histopathol, 2009. **24**(5): p. 661-6.
51. Heidenreich, A., et al., *EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013.* Eur Urol, 2014. **65**(1): p. 124-37.
52. Sengupta, S., et al., *Trends in distribution and prognostic significance of Gleason grades on radical retropubic prostatectomy specimens between 1989 and 2001.* Cancer, 2006. **106**(12): p. 2630-5.
53. Mian, B.M., et al., *Role of prostate biopsy schemes in accurate prediction of Gleason scores.* Urology, 2006. **67**(2): p. 379-83.
54. Egevad, L., W.C. Allsbrook, Jr., and J.I. Epstein, *Current practice of Gleason grading among genitourinary pathologists.* Hum Pathol, 2005. **36**(1): p. 5-9.
55. Epstein, J.I., *Gleason score 2-4 adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy: a diagnosis that should not be made.* Am J Surg Pathol, 2000. **24**(4): p. 477-8.
56. Chan, T.Y., et al., *Prognostic significance of Gleason score 3+4 versus Gleason score 4+3 tumor at radical prostatectomy.* Urology, 2000. **56**(5): p. 823-7.
57. Sakr, W.A., et al., *Gleason score 7 prostate cancer: a heterogeneous entity? Correlation with pathologic parameters and disease-free survival.* Urology, 2000. **56**(5): p. 730-4.
58. Lau, W.K., et al., *Prognostic factors for survival of patients with pathological Gleason score 7 prostate cancer: differences in outcome between primary Gleason grades 3 and 4.* J Urol, 2001. **166**(5): p. 1692-7.
59. Humphrey, P.A., *Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate.* Mod Pathol, 2004. **17**(3): p. 292-306.
60. Wittekind, C., H. Asamura, and L.H. Sobin, *TNM atlas.* Sixth edition. ed. 2014, Chichester, West Sussex, UK: Wiley Blackwell. p.

61. Chodak, G.W., et al., *Results of conservative management of clinically localized prostate cancer*. N Engl J Med, 1994. **330**(4): p. 242-8.
62. Albertsen, P.C., et al., *Competing risk analysis of men aged 55 to 74 years at diagnosis managed conservatively for clinically localized prostate cancer*. JAMA, 1998. **280**(11): p. 975-80.
63. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*. 2003, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 552.
64. Christiansen, A. and M. Detmar, *Lymphangiogenesis and cancer*. Genes Cancer, 2011. **2**(12): p. 1146-58.
65. Gerli, R., et al., *Specific adhesion molecules bind anchoring filaments and endothelial cells in human skin initial lymphatics*. Lymphology, 2000. **33**(4): p. 148-57.
66. Aukland, K. and G. Nicolaysen, *Interstitial fluid volume: local regulatory mechanisms*. Physiol Rev, 1981. **61**(3): p. 556-643.
67. Aukland, K. and R.K. Reed, *Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume*. Physiol Rev, 1993. **73**(1): p. 1-78.
68. Schmid-Schonbein, G.W., *Microlymphatics and lymph flow*. Physiol Rev, 1990. **70**(4): p. 987-1028.
69. Skobe, M., et al., *Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 192-8.
70. He, Y., et al., *Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3737-40.
71. Salven, P., et al., *VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells*. Blood, 2003. **101**(1): p. 168-72.
72. Wartiovaara, U., et al., *Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation*. Thromb Haemost, 1998. **80**(1): p. 171-5.
73. Schoppmann, S.F., et al., *VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival*. Surgery, 2006. **139**(6): p. 839-46.
74. Neuchrist, C., et al., *Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck*. Head Neck, 2003. **25**(6): p. 464-74.
75. Mohammed, R.A., et al., *Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angiogenesis and lymphangiogenesis*. Br J Cancer, 2007. **96**(7): p. 1092-100.
76. Mandriota, S.J., et al., *Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis*. EMBO J, 2001. **20**(4): p. 672-82.
77. Stacker, S.A., et al., *VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 186-91.
78. Karpanen, T., et al., *Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 1786-90.
79. Schoppmann, S.F., et al., *Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer*. Ann Surg, 2004. **240**(2): p. 306-12.
80. Padera, T.P., et al., *Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics*. Science, 2002. **296**(5574): p. 1883-6.
81. Muller, M.M., et al., *Transmembrane CEACAM1 affects integrin-dependent signaling and regulates extracellular matrix protein-specific morphology and migration of endothelial cells*. Blood, 2005. **105**(10): p. 3925-34.

82. Obrink, B., *C-CAM (cell-CAM 105)--a member of the growing immunoglobulin superfamily of cell adhesion proteins*. *Bioessays*, 1991. **13**(5): p. 227-34.
83. Nouvion, A.L., et al., *CEACAM1: a key regulator of vascular permeability*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 24): p. 4221-30.
84. Horst, A.K. and C. Wagener, *CEA-Related CAMs*. *Handb Exp Pharmacol*, 2004(165): p. 283-341.
85. Beauchemin, N., et al., *Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family*. *Exp Cell Res*, 1999. **252**(2): p. 243-9.
86. Odin, P., A. Tingstrom, and B. Obrink, *Chemical characterization of cell-CAM 105, a cell-adhesion molecule isolated from rat liver membranes*. *Biochem J*, 1986. **236**(2): p. 559-68.
87. Williams, A.F. and A.N. Barclay, *The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition*. *Annu Rev Immunol*, 1988. **6**: p. 381-405.
88. Juliano, R.L., *Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002. **42**: p. 283-323.
89. Hammarstrom, S. and V. Baranov, *Is there a role for CEA in innate immunity in the colon?* *Trends Microbiol*, 2001. **9**(3): p. 119-25.
90. Sawa, H., et al., *C-CAM expression in the developing rat central nervous system*. *Brain Res Dev Brain Res*, 1994. **78**(1): p. 35-43.
91. Ergun, S., et al., *CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor*. *Mol Cell*, 2000. **5**(2): p. 311-20.
92. Gold, P. and S.O. Freedman, *Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system*. *J Exp Med*, 1965. **122**(3): p. 467-81.
93. Thompson, J.A., F. Grunert, and W. Zimmermann, *Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives*. *J Clin Lab Anal*, 1991. **5**(5): p. 344-66.
94. Hixson, D.C., K.D. McEntire, and B. Obrink, *Alterations in the expression of a hepatocyte cell adhesion molecule by transplantable rat hepatocellular carcinomas*. *Cancer Res*, 1985. **45**(8): p. 3742-9.
95. Nollau, P., et al., *Dysregulation of carcinoembryonic antigen group members CGM2, CD66a (biliary glycoprotein), and nonspecific cross-reacting antigen in colorectal carcinomas. Comparative analysis by northern blot and in situ hybridization*. *Am J Pathol*, 1997. **151**(2): p. 521-30.
96. Busch, C., et al., *Down-regulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with loss of cell polarity, increased proliferation rate, and Gleason grade 3 to 4 transition*. *Hum Pathol*, 2002. **33**(3): p. 290-8.
97. Oliveira-Ferrer, L., et al., *Dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in angiogenesis and invasion of human urinary bladder cancer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(24): p. 8932-8.
98. Volpert, O., et al., *Inhibition of prostate tumor angiogenesis by the tumor suppressor CEACAM1*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(38): p. 35696-702.
99. Tilki, D., et al., *CEA-related cell adhesion molecule-1 is involved in angiogenic switch in prostate cancer*. *Oncogene*, 2006. **25**(36): p. 4965-74.
100. Kilic, N., et al., *Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(3): p. 2361-9.
101. Wagener, C. and S. Ergun, *Angiogenic properties of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*. *Exp Cell Res*, 2000. **261**(1): p. 19-24.
102. Kilic, N., et al., *Lymphatic reprogramming of microvascular endothelial cells by CEA-related cell adhesion molecule-1 via interaction with VEGFR-3 and Prox1*. *Blood*, 2007. **110**(13): p. 4223-33.

103. Plate, K., *From angiogenesis to lymphangiogenesis*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 151-2.
104. Makinen, T., et al., *Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 199-205.
105. Stacker, S.A., et al., *Lymphangiogenesis and cancer metastasis*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 573-83.
106. Alitalo, K. and P. Carmeliet, *Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease*. Cancer Cell, 2002. **1**(3): p. 219-27.
107. Brooks, P.C., et al., *Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels*. Cell, 1994. **79**(7): p. 1157-64.
108. Brooks, P.C., et al., *Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity*. Cell, 1998. **92**(3): p. 391-400.
109. Dejana, E., R. Spagnuolo, and G. Bazzoni, *Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 308-15.
110. Eliceiri, B.P. and D.A. Cheresh, *Adhesion events in angiogenesis*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(5): p. 563-8.
111. Edward, M., *Integrins and other adhesion molecules involved in melanocytic tumor progression*. Curr Opin Oncol, 1995. **7**(2): p. 185-91.
112. Buttner, P., et al., *Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification*. Cancer, 1995. **75**(10): p. 2499-2506.
113. Ebrahimnejad, A., et al., *CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells*. Am J Pathol, 2004. **165**(5): p. 1781-7.
114. Thies, A., et al., *CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease*. J Clin Oncol, 2002. **20**(10): p. 2530-6.
115. Leung, N., et al., *Deletion of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (Ceacam1) gene contributes to colon tumor progression in a murine model of carcinogenesis*. Oncogene, 2006. **25**(40): p. 5527-36.
116. Greenberg, N.M., et al., *Prostate cancer in a transgenic mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3439-43.
117. foundation, K.a.A.W. *The Human Protein Atlas*. 2015; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000079385-CEACAM1/tissue>.
118. Mazzucchelli, R., et al., *Vascular endothelial growth factor expression and capillary architecture in high-grade PIN and prostate cancer in untreated and androgen-ablated patients*. Prostate, 2000. **45**(1): p. 72-9.
119. Huss, W.J., et al., *Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch*. Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2736-43.
120. Veikkola, T., et al., *Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice*. EMBO J, 2001. **20**(6): p. 1223-31.
121. Baluk, P., et al., *Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels*. J Exp Med, 2007. **204**(10): p. 2349-62.
122. Neumaier, M., et al., *Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10744-8.
123. Lin, S.H. and Y.S. Pu, *Function and therapeutic implication of C-CAM cell-adhesion molecule in prostate cancer*. Semin Oncol, 1999. **26**(2): p. 227-33.

124. Hirakawa, S., et al., *VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites*. *Blood*, 2007. **109**(3): p. 1010-7.
125. Hirakawa, S., et al., *VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis*. *J Exp Med*, 2005. **201**(7): p. 1089-99.
126. Qian, C.N., et al., *Preparing the "soil": the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells*. *Cancer Res*, 2006. **66**(21): p. 10365-76.
127. Farnsworth, R.H., et al., *A role for bone morphogenetic protein-4 in lymph node vascular remodeling and primary tumor growth*. *Cancer Res*, 2011. **71**(20): p. 6547-57.
128. Khan, W.N., S. Hammarstrom, and T. Ramos, *Expression of antigens of the carcinoembryonic antigen family on B cell lymphomas and Epstein-Barr virus immortalized B cell lines*. *Int Immunol*, 1993. **5**(3): p. 265-70.
129. Moller, M.J., et al., *Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell sub-population*. *Int J Cancer*, 1996. **65**(6): p. 740-5.
130. Kammerer, R., et al., *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation*. *J Immunol*, 2001. **166**(11): p. 6537-44.
131. Boulton, I.C. and S.D. Gray-Owen, *Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(3): p. 229-36.
132. Stamey, T.A., et al., *Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate*. *N Engl J Med*, 1987. **317**(15): p. 909-16.
133. Catalona, W.J., et al., *Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men*. *J Urol*, 1994. **151**(5): p. 1283-90.
134. Srigley, J.R., *Benign mimickers of prostatic adenocarcinoma*. *Mod Pathol*, 2004. **17**(3): p. 328-48.
135. Epstein, J.I., *PSA and PAP as immunohistochemical markers in prostate cancer*. *Urol Clin North Am*, 1993. **20**(4): p. 757-70.
136. Yin, M., R. Dhir, and A.V. Parwani, *Diagnostic utility of p501s (prostein) in comparison to prostate specific antigen (PSA) for the detection of metastatic prostatic adenocarcinoma*. *Diagn Pathol*, 2007. **2**: p. 41.
137. Greenberg, N.M., et al., *The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice*. *Mol Endocrinol*, 1994. **8**(2): p. 230-9.
138. Goldstein, N.S., *Immunophenotypic characterization of 225 prostate adenocarcinomas with intermediate or high Gleason scores*. *Am J Clin Pathol*, 2002. **117**(3): p. 471-7.
139. Bostwick, D.G., et al., *Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases*. *Cancer*, 1998. **82**(11): p. 2256-61.
140. Ko, H.K., et al., *A transgenic mouse model for early prostate metastasis to lymph nodes*. *Cancer Res*, 2014. **74**(3): p. 945-53.
141. Fujimoto, A., et al., *Expression of structurally unaltered androgen receptor in extramammary Paget's disease*. *Lab Invest*, 2000. **80**(9): p. 1465-71.
142. Gingrich, J.R., et al., *Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse*. *Cancer Res*, 1996. **56**(18): p. 4096-102.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

α	„ <i>anti</i> “
AB	<i>antibody</i> , Antikörper
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
Abb.	Abbildung
B6	<i>Black6</i>
biotin	biotinyliert
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , fetales Kälberserum
BV	<i>blood vessel</i> , Blutgefäß
°C	Grad Celsius
ca.	circa
C5-1X	CEACAM1-Antikörper
Cc1	CEACAM1-Antikörper
Cc1ko	CEACAM1- <i>knock-out</i>
CD31	Endothelzellmarker
CD34	Endothelzellmarker
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CEACAM	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule</i>
CEACAM1-L	CEACAM1- long form
Cy2	Streptavidin Alexa 488, grünfluoreszierend
Cy3	Indocarbocyanin, rotfluoreszierend
Cy5	Indocarbocyanin, rotfluoreszierend
D	„ <i>Donkey</i> “, Esel
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenyldol
dH ₂ O	doppelt entsalztes Wasser
dH ₂ O	entsalztes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere

Ethanol	Alkohol
Fab	Antigen bindendes Fragment
Fc	<i>crystallisable fragment</i>
„Forward Primer“	5'-3' Positivstrangsynthese
g	Gramm
G	<i>Gleason Score</i>
Go	„Goat“, Ziege
h	„hour“, Stunde
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGPIN	<i>High Grade PIN</i>
ht	heterozygot
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IF	Immunfluoreszenz
ko	<i>knock out</i> , Gen-defiziente Mäuse
L	Liter
LN	<i>lymphnode</i> , Lymphknoten
Lv	<i>lymphatic vessel</i> , Lymphgefäß
„lymphocytes“	Lymphozyten
M	Molar
max.	maximal
„marginal sinus“	Randsinus
„merge“	übereinandergelagerte Bilder
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mCc1	CEACAM1 der Maus
mg	Milligramm
ms	Maus
n	Anzahl
NDS	<i>Normal Donkey Serum</i> , Esel Serum
NEO	Neomycin
NGS	„ <i>Normal Goat Serum</i> “, Ziegen Serum
NPG	N-Propylglykol

NRS	„Normal Rabbit Serum“, Kaninchen Serum
p	<i>probability-value</i> , Signifikanzwert
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Natriumchlorid Lösung
PB	<i>phosphate buffer</i> , Phosphatpuffer
PCa	<i>prostate cancer</i> , Prostatakarzinom
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
HGPIN	hochgradige prostatiche intraepitheliale Neoplasie
PIN	prostatiche intraepitheliale Neoplasie
pmol	Picomolar
pN0	keine Metastasen nach pathologischer Untersuchung
pN1	mit Metastasen nach pathologischer Untersuchung
Podoplanin	Lymphendothelmarker
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
rb	„ <i>rabbit</i> “, Kaninchen
rat	„ <i>rat</i> “, Ratte
„Reverse Primer“	3'-5'-Negativsynthese
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
shp	<i>sheep</i> , Schaf
sog.	sogennant
SV40	<i>simian virus 40</i>
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Taq-DNA Polymerase
TRAMP	<i>transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T.s	<i>tumor surrounding</i> , Tumorumgebung
„ <i>tumor gland</i> “	Tumordrüsen
wt	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

µm	Mikrometer
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR-3	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3</i>
ZEMM	Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin
4D1C2	CEACAM-1-Antikörper
C5-1X	CEACAM-1-Antikörper

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Originalzeichnung des Pathologen D. F. Gleason mit einer schematische Darstellung des nach ihm benannten <i>Gleason Scores</i> [59].....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lymphknoten-Histologie modifiziert nach [63]	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1) Expression in kleinen angiogen aktivierten Lymphgefäßen modifiziert nach Kilic <i>et al.</i> (2007) [102]. Die endotheliale CEACAM1-Expression (hellblau) in kleinen tumor-assoziierten und angiogen aktivierten Lymphgefäßen (hellblau gestrichelt) wird durch den in Tumorzellen (TC) exprimierten <i>Vascular endothelial growth factor</i> -(VEGF)-C und VEGF-D induziert. Die endotheliale Präsenz von CEACAM1 in kleinen Lymphgefäßen fördert wiederum die Expression pro-lymphangiogener Faktoren wie Podoplanin, <i>Prospero Homeobox 1</i> (Prox1), VEGF-C, VEGF-D und des Rezeptors VEGFR-3 (violett) [102].	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung des <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1) „ <i>knock-out</i> -Konstruktes“[115].	21
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.....	25
Abbildung 6: Indirekte Methode der immunhistochemischen-(IHC)-Färbung mit einem Chromophor.....	26
Abbildung 7: Indirekte Immunhistochemie mit der 3,3-Diaminobenzidin-(DAB)-Methode	27
Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.....	29
Abbildung 9: <i>Polymerase-Chain-Reaction</i> (PCR) zur Genotypisierung der Versuchstiere.....	35
Abbildung 10: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1, Cc1) und CD31 in humanem Prostatakarzinom-(PCa)-Gewebe.....	41
Abbildung 11: Doppelimmunfärbung von <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1, Cc1) und Podoplanin in humanem Prostatakarzinom-(PCa)-Gewebe.	44
Abbildung 12: Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Übersichtsfärbung von humanem Prostatakarzinom-(PCa)-Lymphknoten-(LN)-Gewebe aus Patienten mit unterschiedlichem <i>Gleason-Score</i> (G) und LN-Status (pN0/pN1)	46

Abbildung 13: <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1 (Cc1) Expression in Lymphknoten-(LN)-Gewebe von Prostatakarzinom-(PCa)-Patienten mit unterschiedlichem <i>Gleason-Score</i> (G) und LN-Status (pN0/pN1)	48
Abbildung 14: Doppel-Immunfluoreszenzfärbung von <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1, Cc1) und dem Endothelzellmarker CD31 in Lymphknoten-(LN)-Gewebeschnitte von Prostatakarzinom-(PCa)-Patienten mit unterschiedlichem <i>Gleason-Score</i> (G) und LN-Status (pN0/pN1)	50
Abbildung 15: <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1, Cc1) und Podoplanin Doppelimmunfärbung an humanem Lymphknoten-(LN)-gewebe von Prostatakarzinom-(PCa)-Patienten mit unterschiedlichem <i>Gleason-Score</i> und LN-Status (G<7/pN0, G>7/pN0, G>7/pN1)	52
Abbildung 16: <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1, Cc1) und Podoplanin Doppelimmunfluoreszenzfärbung an humanem Lymphknoten-(LN)-gewebe eines Patienten mit Prostatakarzinom (PCa)	54
Abbildung 17: Prostata-spezifisches Antigen (PSA) Immunfärbung (3,3-Diaminobenzidin (DAB), schwarz) in humanem Lymphknoten-(LN)-Gewebe von Prostatakarzinom-(PCa)-Patienten mit unterschiedlichem <i>Gleason-Score</i> (G) und LN-Status (pN0/pN1)	56
Abbildung 18: <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1, Cc1,) und Prostata-spezifisches Antigen (PSA) Doppel-Immunfärbung an Lymphknoten-(LN)-Gewebeschnitten von Prostatakarzinom-(PCa)-Patienten mit unterschiedlichem <i>Gleason-Score</i> (G) und LN-Status (pN0/pN1)	57
Abbildung 19: <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1, Cc1) und Prostata-spezifisches Antigen (PSA) Doppelimmunfärbung an humanem Prostatakarzinom-(PCa)-Prostatagewebe von Patienten mit unterschiedlichem <i>Gleason-Score</i> (G) und LN-Status (pN0/pN1)	59
Abbildung 20: Quantitative Analyse des Expressionsmusters des <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1/CC1) und des Prostata spezifischen Antigens (PSA) an Prostatakarzinom-(PCa)-Prostatagewebe von Patienten mit verschiedenen <i>Gleason Scores</i> (G≤7/G>7) und Lymphknoten-(LN)-Metastasierungsstatus (pN0/pN1)	61
Abbildung 21: <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1, Cc1), Immunfärbung an Prostata- (oben) und Lymphknoten-(LN)-Gewebe (unten) von normalen B6.J-Wildtyp-(wt)- und CEACAM1- <i>knock-out</i> -(Cc1ko)-Mäusen	63

Abbildung 22: *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1, Cc1), und Podoplanin Doppel-Immunfluoreszenzfärbung an normalem B6.J-Wildtyp-Prostatagewebe 64

Abbildung 23: *Simian virus 40* (SV40) und *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1, Cc1) Einzel-Immunfärbungen an Prostata- und Lymphknoten-(LN)-Gewebe einer *Transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate* (TRAMPC1-Maus im „*highgrade*“ prostatistische intraepitheliale Neoplasie (HG PIN)-Stadium im Alter von 12 Wochen postnatal..... 64

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Konventioneller <i>Gleason Score</i> 1–5 und modifizierten <i>Gleason Score</i> 7a und 7b [51]	5
Tabelle 2: Einteilung des Prostatakarzinoms (PCa) nach Ausdehnung (T), nach Befall der regionalen Lymphknoten (N) und nach dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M). Modifiziert nach [60]	7
Tabelle 3: Klinische Unterteilung des Prostatakarzinoms (PCa) modifiziert nach [51]. ..	8
Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide für die <i>Polymerase-Chain-Reaction</i> (PCR)	20
Tabelle 5: Verwendete Primär- und Sekundärintikörper mit eingesetzter Verdünnung, Demaskierung, Blockierung	31
Tabelle 6: Pipettierschema für den <i>Polymerase-chain-reaction</i> -(PCR)-Mastermix	33
Tabelle 7: <i>Polymerase-chain-reaction</i> -(PCR)-Programme	34
Tabelle 8: Ladeschema für die <i>Polymerase-Chain-Reaction</i> -(PCR)-Gele aus Abb. 5 .	35
Tabelle 9: Analyse der <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i> (CEACAM1) Expression im Lymphknoten-(LN)-Gewebe (iliacal & pelvin) von Prostatakarzinom-(PCa)-Patienten unterschiedlichem <i>Gleason-Score</i> (G) und LN-Status (pN0/pN1)	49
Tabelle 10: Analyse der Expression des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Lymphknoten-(LN)-Gewebe von Patienten mit Prostatakarzinom (PCa) in Abhängigkeit vom <i>Gleason Score</i> (G) und LN-Metastasierungsstatus (pN0/pN1)	55

IV Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Süleyman Ergün für die freundliche Bereitstellung des Themas und die tatkräftige Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Verena Pfeiffer, die zu jeder Uhrzeit für mich da war, die mich mit ihrem wissenschaftlichem Eifer und ihrer Genauigkeit beeindruckt hat, mich in schweren Phasen aufgebaut hat und mir tatkräftig beiseite stand. Ich möchte an dieser Stelle betonen, dass dies zu keinem Zeitpunkt eine Selbstverständlichkeit für mich darstellte. Sehr wertvoll empfand ich ihre ehrliche und offene Kritik, die – wenn es notwendig war – für Erdung sorgte und mich auf meinem weiteren Lebensweg geprägt hat.

Für die Unterstützung im Labor und möchte ich mich herzlich bei Frau Tatjana Reimer, Frau Erna Kleinschroth, Frau Ursula Roth, Frau Doris Dettelbach und Frau Elke Varin bedanken. Sie alle waren mir Lehrmeister, freundliche und inspirierende Kollegen sowie tatkräftige Unterstützer zugleich.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. Stefan Hübner für seine leichte, erheiternde kollegiale Art und sein immer offenes Ohr – egal ob beim Laufen, beim Kegeln oder bei Arbeit – bedanken. Seine wertvollen Ratschläge beim Verfassen der Dissertation waren eine große Hilfe.

Für die freundliche Unterstützung bei der PCR möchte ich mich bei Frau Heike Arten herzlich bedanken.

Eine große Unterstützung war mir auch Frau Dr. Nicole Wagner bei der Bedienung des konfokalen Mikroskops. Einen herzlichen Dank dafür an dieser Stelle.

Weiter gilt mein Dank Herrn Michael Christof für die Unterstützung bei der EDV und Frau Dr. Heike Bömmel für die mir freundlicherweise überlassenen Gewebepreparate.

Weiter möchte ich mich bei meinem Freund, damaligen Mitbewohner und Mitpromovenden Georg Eckner für die erheiternden Momente, zahlreichen Denkanstöße und motivierenden Worte bedanken.

Weiter gilt mein Dank meinem Freund Maik Bischoff und seiner Partnerin Ina Glockner, die mir bei der Korrektur meiner Arbeit eine große Hilfestellung geleistet haben.

V Lebenslauf

VI Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre weiterhin, dass diese Arbeit weder in gleicher noch in irgendeiner anderen Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Außer den urkundlich vorgelegten anerkannten Graden habe ich zuvor keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Büdingen, den

Patrick Vix