

**Aus dem Institut für Pathologie und Neuropatho-  
logie der Universität Tübingen  
Abteilung Neuropathologie  
Ärztliche Direktorin: Professor Dr. M. Neumann**

**IMMUNHISTOCHEMISCHE STUDIE VON  
HIRNMETASTASEN MIT INTEGRIN ALPHA-V-  
BETA-SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Annemarie Dorothee Sautter, geb. Klein  
aus Münchberg**

**2014**

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Meyermann

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Sipos

## **Widmung**

Ich widme diese Arbeit meiner lieben Familie und meinem Ehemann.

# Inhaltsverzeichnis

|  |      |
|--|------|
| Inhaltsverzeichnis .....   | IV   |
| Abkürzungsverzeichnis.....   | IX   |
| Abbildungsverzeichnis.....   | XI   |
| Tabellenverzeichnis .....  | XIII |
| Anhangsverzeichnis .....   | XVI  |
| 1. Einleitung.....   | 1    |
| 1.1 Zerebrale Metastasen .....   | 1    |
| 1.1.1 Allgemeines.....   | 1    |
| 1.1.2 Lokalisation und Morphologie.....  | 2    |
| 1.1.3 Symptomatik, Prognose und Therapie .....   | 3    |
| 1.2 Bronchialkarzinom .....  | 5    |
| 1.2.1 Allgemeines.....   | 5    |
| 1.2.2 Histologische Klassifikation .....   | 6    |
| 1.3 Mammakarzinom .....  | 8    |
| 1.3.1 Allgemeines.....   | 8    |
| 1.3.2 Histologische Klassifikationen .....   | 9    |
| 1.4 Nierenkarzinom.....  | 10   |
| 1.5 Kolonkarzinom .....  | 11   |
| 1.6 Die Entstehung von Metastasen – die „seed and soil theory“ und die Rolle der Integrine ..... | 12   |
| 1.7 Integrine .....  | 14   |
| 1.7.1 Struktur und Funktion .....  | 14   |
| 1.7.2 Integrin vermittelte Mechanismen zur Förderung des Metastasenwachstums.....                | 16   |
| 1.7.3 Integrinblockade als Option in der Tumorthherapie .....                                    | 19   |
| 1.8 Fragestellung und Ziel der Arbeit.....   | 21   |
| 2. Methodik und Material .....   | 22   |
| 2.1 Patientendaten.....  | 22   |
| 2.1.1 Gewebeproben.....  | 22   |
| 2.1.2 Verteilung der Patientendaten anhand des Geschlechts .....                                 | 22   |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.1.3 | Verteilung der Patientendaten anhand der Herkunft .....                                 | 23 |
| 2.1.4 | Verteilung der Patientendaten anhand der Histologie .....                               | 24 |
| 2.1.5 | Verteilung der Patientendaten anhand des Differenzierungsgrades ...                     | 25 |
| 2.1.6 | Verteilung der Patientendaten anhand der Lokalisation .....                             | 25 |
| 2.1.7 | Hirnmetastasen mit bekanntem Primarius .....  | 26 |
| 2.2   | Material .....  | 26 |
| 2.2.1 | HE-Färbung .....  | 26 |
| 2.2.2 | Immunhistochemie .....  | 26 |
| 2.3   | Methodik .....  | 29 |
| 2.3.1 | Herstellung der Schnittpräparate .....  | 29 |
| 2.3.2 | HE- Färbung .....   | 29 |
| 2.3.3 | TMA .....   | 30 |
| 2.3.4 | Immunhistochemie .....  | 31 |
| 2.3.5 | Definiens Tissue Studio Software .....  | 36 |
| 2.3.6 | Statistik .....   | 37 |
| 3.    | Ergebnisse .....  | 38 |
| 3.1   | Allgemeine Färbeergebnisse .....  | 38 |
| 3.1.1 | Expressionsmuster .....   | 38 |
| 3.1.2 | Manuelle Auswertung .....   | 39 |
| 3.1.3 | Computerbasierte Auswertung .....   | 40 |
| 3.2   | Korrelationsanalyse der manuell ausgewerteten und computerbasierten<br>Ergebnisse ..... | 41 |
| 3.3   | Korrelation der Ergebnisse mit dem Alter und Geschlecht .....                           | 43 |
| 3.4   | $\alpha\beta 8$ .....   | 44 |
| 3.4.1 | Expressionsmuster und Färbesignal .....   | 44 |
| 3.4.2 | Vergleich Primärtumor und Metastase .....   | 45 |
| 3.4.3 | Korrelation mit der Tumorentität .....  | 45 |
| 3.4.4 | Korrelation mit der Tumorhistologie .....   | 47 |
| 3.4.5 | Korrelation mit der Metastasenlokalisierung .....                                       | 47 |
| 3.4.6 | Korrelation mit dem Differenzierungsgrad .....  | 48 |
| 3.5   | $\alpha\beta 6$ .....   | 49 |
| 3.5.1 | Expressionsmuster und Färbesignal .....   | 49 |

|   |    |
|---|----|
| 3.5.2 Vergleich Primärtumor und Metastase .....         | 49 |
| 3.5.3 Korrelation mit der Tumorentität .....            | 50 |
| 3.5.4 Korrelation mit der Tumorhistologie .....         | 52 |
| 3.5.5 Korrelation mit der Metastasenlokalisierung ..... | 54 |
| 3.5.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad .....    | 54 |
| 3.6 $\alpha\beta 3$ .....                               | 55 |
| 3.6.1 Expressionsmuster und Färbesignal .....           | 55 |
| 3.6.2 Vergleich Primärtumor und Metastase .....         | 55 |
| 3.6.3 Korrelation mit der Tumorentität .....            | 56 |
| 3.6.4 Korrelation mit der Tumorhistologie .....         | 57 |
| 3.6.5 Korrelation mit der Metastasenlokalisierung ..... | 58 |
| 3.6.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad .....    | 59 |
| 3.7 CytoB3 .....  | 59 |
| 3.7.1 Expressionsmuster und Färbesignal .....           | 59 |
| 3.7.2 Vergleich Primärtumor und Metastase .....         | 60 |
| 3.7.3 Korrelation mit der Tumorentität .....            | 60 |
| 3.7.4 Korrelation mit der Tumorhistologie .....         | 62 |
| 3.7.5 Korrelation mit der Metastasenlokalisierung ..... | 63 |
| 3.7.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad .....    | 64 |
| 3.8 $\alpha\beta 5$ .....                               | 64 |
| 3.8.1 Expressionsmuster und Färbesignal .....           | 64 |
| 3.8.2 Vergleich Primärtumor und Metastase .....         | 65 |
| 3.8.3 Korrelation mit der Tumorentität .....            | 65 |
| 3.8.4 Korrelation mit der Tumorhistologie .....         | 67 |
| 3.8.5 Korrelation mit der Metastasenlokalisierung ..... | 68 |
| 3.8.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad .....    | 69 |
| 3.9 $\alpha v$ .....                                    | 69 |
| 3.9.1 Expressionsmuster und Färbesignal .....           | 69 |
| 3.9.2 Vergleich Primärtumor und Metastase .....         | 70 |
| 3.9.3 Korrelation mit der Tumorentität .....            | 70 |
| 3.9.4 Korrelation mit der Tumorhistologie .....         | 72 |
| 3.9.5 Korrelation mit der Metastasenlokalisierung ..... | 72 |

|   |    |
|---|----|
| 3.9.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad .....  | 73 |
| 3.10 Fibronectin .....  | 73 |
| 3.10.1 Expressionsmuster und Färbesignal .....  | 73 |
| 3.10.2 Vergleich Primärtumor und Metastase .....  | 74 |
| 3.10.3 Korrelation mit der Tumorentität .....   | 74 |
| 3.10.4 Korrelation mit der Tumorhistologie .....  | 76 |
| 3.10.5 Korrelation mit der Metastasenlokalisierung .....  | 77 |
| 3.10.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad .....   | 77 |
| 3.11 Fibrinogen .....   | 78 |
| 3.11.1 Expressionsmuster und Färbesignal .....  | 78 |
| 3.11.2 Vergleich Primärtumor und Metastase .....  | 78 |
| 3.11.3 Korrelation mit der Tumorentität .....   | 79 |
| 3.11.4 Korrelation mit der Tumorhistologie .....  | 80 |
| 3.11.5 Korrelation mit der Tumorlokalisierung .....   | 81 |
| 3.11.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad .....   | 82 |
| 3.12 Multivariate Integrinintensität der digitalen Analyse .....  | 82 |
| 4. Diskussion .....   | 82 |
| 4.1 Immunhistochemie: manuelle versus computerbasierte Auswertung .....   | 82 |
| 4.2 $\alpha\beta 8$ .....   | 85 |
| 4.2.1 Expressionsmuster und Funktion als Gefäßregulator .....   | 85 |
| 4.2.2 $\alpha\beta 8$ und maligne Tumore: Unterschied zwischen hirneigenen<br>Tumoren und zerebralen Metastasen ..... | 86 |
| 4.3 $\alpha\beta 6$ .....   | 88 |
| 4.3.1 Expressionsmuster und Rolle in der Epitheldifferenzierung .....   | 88 |
| 4.3.2 Vergleich der unterschiedlichen Entitäten und Histologieformen .....  | 90 |
| 4.4 $\alpha\beta 3$ und CytoB3 .....  | 91 |
| 4.4.1 Expression und Funktion im Tumorparenchym .....   | 91 |
| 4.4.2 Expression und Funktion im Gefäßendothel .....  | 93 |
| 4.5 $\alpha\beta 5$ .....   | 94 |
| 4.5.1 Die Rolle von $\alpha\beta 5$ in Angiogenese und Metastasierung .....   | 94 |
| 4.5.2 Vergleich der unterschiedlichen Entitäten und Histologieformen .....  | 95 |
| 4.6 $\alpha v$ .....  | 97 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.6.1 Immunhistochemisches Signal als Verrechnungsergebnis der einzelnen Expressionsmuster ..... | 97  |
| 4.7 Fibronectin .....  | 98  |
| 4.7.1 Fibronectin als Marker für die epitheliale-mesenchymale Transition                         | 98  |
| 4.8 Fibrinogen .....   | 102 |
| 4.8.1 Stromale und epitheliale Expression .....  | 102 |
| 4.8.2 Endotheliale Expression und Rolle bei der Adhäsion und Invasion                            | 104 |
| 4.9 Fazit und Ausblick .....   | 104 |
| 4.10 Zusammenfassung .....   | 109 |
| Anhang .....   | 110 |
| Literaturverzeichnis .....   | 118 |
| Danksagung .....   | 133 |



## Abkürzungsverzeichnis

|          |   |   |
|----------|---|---|
| ADAM     | - | A disintegrin and metalloprotease                       |
| Avb3     | - | Alphavbeta3   |
| Avb5     | - | Alphavbeta5   |
| Avb6     | - | Alphavbeta6   |
| Avb8     | - | Alphavbeta8   |
| Bax      | - | Bcl-2-associated X protein                              |
| Bcl-2    | - | B-cell lymphoma 2                                       |
| CI       | - | Confidence interval (Konfidenzintervall)                |
| CytoB3   | - | Cytoplasmatische Untereinheit des Integrins alphavbeta3 |
| DAB      | - | 3,3'-Diaminobenzidin                                    |
| Dest.    | - | Destilliert   |
| DTS      | - | Definiens Tissue Studio                                 |
| ECM      | - | Extracellular matrix (Extrazellulärmatrix)              |
| EGF      | - | Epidermal-Growth-Factor                                 |
| EMT      | - | Epitheliale mesenchymale Transition                     |
| Fab      | - | Fragment antigen binding                                |
| Fc       | - | Crystallisable fragment                                 |
| G0-Phase | - | Ruhephase des Zellzyklus                                |
| G1-Phase | - | Postmitotische Phase des Zellzyklus                     |
| G1-3     | - | Histologischer Differenzierungsgrad 1-3                 |
| GI       | - | Gastrointestinaltrakt                                   |
| HE       | - | Hämatoxylin-Eosin                                       |
| HER2     | - | Human epidermal growth factor receptor 2                |
| ICAM     | - | Intercellular adhesion molecule                         |
| Ig       | - | Immunglobulin   |
| IS       | - | Intensitätsscore  |
| kDa      | - | kilo Dalton   |
| LAP      | - | Latency-associated peptide                              |
| MET      | - | Mesenchymale epitheliale Transition                     |
| MMP      | - | Matrixmetalloprotease                                   |
| mRNA     | - | messenger ribonucleic acid                              |

|                |   |  |
|----------------|---|--|
| MS             | - | Multiple Sklerose                      |
| NF- $\kappa$ B | - | Nuclear Factor kappa B                 |
| n.s.           | - | nicht signifikant                      |
| PDGF           | - | Platelet-derived growth factor         |
| RGD            | - | Arginine-Glycine-Aspartic Acid-Peptide |
| ROI            | - | Region of Interest                     |
| TGF $\beta$    | - | Transforming growth factor beta        |
| TMA            | - | Tissue microarrays                     |
| Tris           | - | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan        |
| VEGF           | - | Vascular Endothelial Growth Factor     |
| vWF            | - | Von-Willebrand-Faktor                  |
| ZNS            | - | Zentrales Nervensystem                 |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Makroskopie einer ausgedehnten zerebralen Metastase eines<br>invasiv duktales Mammacarcinoms .....   | 3  |
| Abbildung 2: Histologisches Bild eines Plattenepithelkarzinoms (HE-Färbung)..   | 6  |
| Abbildung 3: Histologisches Bild eines papillären Adenokarzinoms (HE-<br>Färbung).....  | 7  |
| Abbildung 4: Histologisches Bild eines klarzelligen Nierenkarzinoms (HE-<br>Färbung).....   | 11 |
| Abbildung 5: Kombinationsmöglichkeiten der Integrinuntereinheiten (Abbildung<br>aus Takada et al, 2008) .....   | 14 |
| Abbildung 6: Struktur eines Cilengitids mit Hervorhebung der RGD-Sequenz<br>und Struktur des Integrins $\alpha\beta 3$ (Reardon et al, 2008).....                     | 21 |
| Abbildung 7: Schaubildung zur Darstellung der Datenaufteilung nach<br>Herkunftsorgan.....   | 24 |
| Abbildung 8: Schaubild zur Darstellung der Datenaufteilung nach Histologie...   | 24 |
| Abbildung 9: Schema der ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Methode.....  | 33 |
| Abbildung 10: Anzahl der positiven Zellen der manuell ausgewerteten 38 Fälle<br>des TMA-Schnittes bezogen auf die Färbeintensität. ....                               | 40 |
| Abbildung 11: Digitale Auswertung der Färbungen mit dem Defininens Tissue<br>Studio.....  | 42 |
| Abbildung 12: Korrelation zwischen manueller Färbeintensitätsbestimmung und<br>digitaler Auswertung (Histoscore) am Beispiel von $\alpha\beta 6$ und $\alpha v$ ..... | 42 |
| Abbildung 13: Graphische Darstellung der Kontingenztabelle für die $\alpha\beta 5$ -<br>Expression im Gefäßendothel bezogen auf das Geschlecht. ....                  | 44 |
| Abbildung 14: Exemplarisches immunhistochemische Färbemuster für $\alpha\beta 8$ in<br>20facher Vergrößerung .....  | 46 |
| Abbildung 15: Vergleich der $\alpha\beta 8$ -Intensitäten zwischen zerebellären und<br>zerebralen Metastasen ( $p=0,0388$ ) .....                                     | 48 |
| Abbildung 16: Mosaikplot: Kontingenztabelle der $\alpha\beta 6$ Intensität (manuelle<br>Auswertung) in Bezug auf die Metastasenherkunft.....                          | 52 |
| Abbildung 17: Immunhistochemie $\alpha\beta 6$ in 20facher Vergrößerung .....   | 52 |

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 18: Vergleich neuroendokrine und nicht neuroendokrine Metastasen bezogen auf die $\alpha\beta 6$ -Intensität (manuelle Auswertung).....  | 54  |
| Abbildung 19: Immunhistochemie für $\alpha\beta 3$ mit 20facher Vergrößerung .....   | 56  |
| Abbildung 20: Immunhistochemie für $\alpha\beta 3$ .....   | 57  |
| Abbildung 21: Mosaikplot des Gesamtvergleichs der $\alpha\beta 3$ -Expression des Gefäßendothels nach entsprechendem Differenzierungsgrad.....   | 59  |
| Abbildung 22: Immunhistochemie CytoB3 mit 20facher Vergrößerung.....   | 62  |
| Abbildung 23: Mosaikplot für CytoB3. Paarweiser Vergleich zwischen Metastasen aus der Lunge und aus der Niere .....  | 62  |
| Abbildung 24: Mosaikplot der Kontingenzanalyse der Herkunftsorgane Niere, Lunge, Mamma und Prostata für die $\alpha\beta 5$ -Intensität (manuelle Auswertung).....   | 67  |
| Abbildung 25: Immunhistochemie $\alpha\beta 5$ mit 20facher Vergrößerung: .....  | 67  |
| Abbildung 26: Mosaikplot der unterschiedlichen Lokalisationen für die $\alpha$ -Untereinheit.....  | 73  |
| Abbildung 27: Mosaikplot: Darstellung der signifikant unterschiedlichen Fibronectinexpression von CUP-Tumoren und zerebralen Metastasen des Mammakarzinoms in Intensitäts- und Mengenanalyse (manuellen Auswertung)..... | 75  |
| Abbildung 28: Immunhistochemie Fibronectin mit 20facher Vergrößerung:.....   | 76  |
| Abbildung 29: Immunhistochemie für Fibrinogen mit 20facher Vergrößerung. .   | 81  |
| Abbildung 30: Modell der Gefäßregulierung über $\alpha\beta 8$ -vermittelte Aktivierung von TGF $\beta$ (in Anlehnung an Cambier et al, 2005) .....  | 88  |
| Abbildung 31: Darstellung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) (in Anlehnung an Gout et al, 2008) .....   | 100 |

## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Häufigkeitsverteilung der Primärtumoren bei Hirnmetastasen und zerebrale Metastasierungsrate einzelner Neoplasien .....   | 2  |
| Tabelle 2: Anteile seltenerer histologischer Varianten an gesamten Mammakarzinomen.....  | 10 |
| Tabelle 3: Integrine und zugehörige Liganden .....   | 15 |
| Tabelle 4: Aufteilung der Patientendaten anhand der Herkunft der Hirnmetastasen .....  | 23 |
| Tabelle 5: Aufteilung der Patientendaten anhand des Differenzierungsgrads ..   | 25 |
| Tabelle 6: Aufteilung der Patientendaten anhand der Lokalisation der Metastasen.....   | 25 |
| Tabelle 7: Ablauf der Entparaffinierung durch absteigende Alkoholreihe sowie Ablauf des Wasserentzugs durch aufsteigende Alkoholreihe.....   | 30 |
| Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Positivkontrollen für die Immunhistochemie .....  | 34 |
| Tabelle 9: Ergebnisse der digitalen Auswertung .....   | 41 |
| Tabelle 10: Färbeergebnisse für $\alpha v$ : Darstellung signifikanter Unterschiede zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht in der Intensitäts- und Gefäßendothelanalyse.....      | 43 |
| Tabelle 11: Expression des Integrins $\alpha v \beta 8$ in unterschiedlichen Histologieformen anhand der manuellen Intensitäts- und Mengenauswertung sowie der digitalen Analyse.....        | 47 |
| Tabelle 12: Darstellung der Mittelwerte der Intensitäts- und Mengenanalyse für das Integrin $\alpha v \beta 6$ bezogen auf die unterschiedlichen Ursprungsorgane ..                          | 50 |
| Tabelle 13: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Herkunft sowohl für die Menge der gefärbten Tumorzellen als auch für die Färbeintensität .....              | 51 |
| Tabelle 14: Darstellung der Mittelwerte der manuellen Auswertung für $\alpha v \beta 6$ in Intensitäts- und Mengenanalyse der Tumorzellen, sowie im Endothel der Gefäße nach Histologie..... | 53 |
| Tabelle 15: Darstellung der Resultate der Mengen- und Intensitätsanalyse des Integrins $\alpha v \beta 6$ bei Betrachtung der Metastasenlokalisierung.....                                   | 54 |

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 16: Darstellung der Ergebnisse der manuellen Auswertung nach Herkunft in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse des Integrins $\alpha\beta 3$ .....                             | 57 |
| Tabelle 17: Darstellung signifikanter Resultate des Integrins $\alpha\beta 3$ in den direkten Vergleichen nach Herkunft der Mengen-, Intensitäts- und Gefäßanalyse .....                   | 57 |
| Tabelle 18: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der manuellen Intensitäts-, Mengen- und Gefäßanalyse nach Histologie .....   | 58 |
| Tabelle 19: Darstellung der Unterschiede zwischen den einzelnen Entitäten in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse für CytoB3 .....  | 61 |
| Tabelle 20: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Herkunft in Mengen- und Intensitätsanalyse von CytoB3 .....   | 61 |
| Tabelle 21: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der einzelnen Histologieformen in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse von CytoB3 .....                                     | 63 |
| Tabelle 22: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Histologie in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse von CytoB3 .....                                  | 63 |
| Tabelle 23: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der Metastasenlokalisationen in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse des Integrins CytoB3 .....                             | 64 |
| Tabelle 24: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der einzelnen Tumorentitäten in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse des Integrins $\alpha\beta 5$ .....                    | 66 |
| Tabelle 25: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Herkunftsorgan in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse von $\alpha\beta 5$ .....                     | 66 |
| Tabelle 26: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der Histologieformen in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse des Integrins $\alpha\beta 5$ .....                            | 68 |
| Tabelle 27: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Histologie in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse von $\alpha\beta 5$ .....                         | 68 |
| Tabelle 28: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte mit Konfidenzintervall von Ursprungstumor und Metastase für $\alpha\beta$ (Intensitäts-, Mengenanalyse und Gefäßbewertung) ..... | 70 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabelle 29: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der Herkunftsorgane in Intensitäts,- Mengen- und Endothelanalyse von $\alpha v$ .....                                 | 71  |
| Tabelle 30: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der einzelnen Histologieformen in Intensitäts,- Mengen- und Endothelanalyse von $\alpha v$ ..                         | 72  |
| Tabelle 31: Ergebnisse der manuellen Auswertung der $\alpha v$ -Expression bei unterschiedlichen Differenzierungsgraden.....  | 73  |
| Tabelle 32: Darstellung der Ergebnisse der manuellen Auswertung nach Herkunft in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse des Integrinliganden Fibronectin.....                | 74  |
| Tabelle 33: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Herkunft in Mengen-, Intensitäts und Endothelanalyse für Fibronectin.....                      | 75  |
| Tabelle 34: Darstellung der Mittelwerte der manuellen Auswertung nach Histologie in Intensitäts- und Mengenanalyse sowie Gefäßbetrachtung der Tumorzellen für Fibronectin. .... | 76  |
| Tabelle 35: Mittelwerte der Intensitäts-, Mengen- und Gefäßanalyse nach Differenzierungsgrad für Fibronectin.....   | 77  |
| Tabelle 36: Darstellung der Ergebnisse der manuellen Auswertung nach Herkunft in Intensitäts,- Mengen- und Endothelanalyse des Integrinliganden Fibrinogen.....                 | 79  |
| Tabelle 37: Darstellung der Ergebnisse der manuellen Auswertung nach Histologie in Intensitäts,- Mengen- und Endothelanalyse des Integrinliganden Fibrinogen.....               | 80  |
| Tabelle 38: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Histologie in Intensitäts- und Endothelanalyse für Fibrinogen. ....                            | 81  |
| Tabelle 39: Darstellung der Resultate in Intensitäts- und Mengenanalyse nach Lokalisation für Fibrinogen .....  | 81  |
| Tabelle 40: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Herkunft in Mengen-, Intensitäts und Endothelanalyse für Fibronectin...                        | 101 |
| Tabelle 41: Erfolgreich getestete Verdünnungen der einzelnen Antikörper ...   | 105 |

## Anhangsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| I. P-Werte der manuellen Auswertung (ordinalskaliert) mittels Chi-Quadrat-Test .....          | 110 |
| I.1 Geschlecht .....  | 110 |
| I.2 Herkunft .....  | 110 |
| I.3 Histologie .....  | 112 |
| I.4 Lokalisation .....  | 113 |
| I.5 Differenzierungsgrad .....  | 114 |
| II. P-Werte der digitalen Auswertung (kontinuierlich skaliert) mittels Student's t-test ..... | 115 |
| II.1 Herkunft .....   | 115 |
| II.2 Histologie .....   | 115 |
| III. Multivariate Integritätsintensität der digitalen Analyse .....                           | 116 |
| III.1 paarweise Korrelationsanalyse .....   | 116 |
| III. 2 Scatterplot Matrix .....   | 117 |



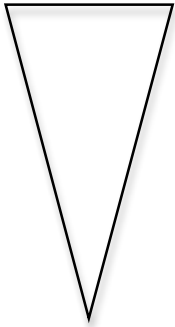
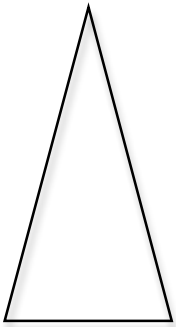
# 1. Einleitung

## 1.1 Zerebrale Metastasen

### 1.1.1 Allgemeines

Viele Tumore mit Ausnahme der hirneigenen Neoplasien, welche sich durch diffus-infiltratives Wachstum auszeichnen, besitzen das Potential, sich mit ihren Zellen in anderen Organen abzusiedeln. Hirnmetastasen von extrazerebralen Neoplasien werden bei 10-40% der Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomkrankungen diagnostiziert (Ranasinghe et al, 2007). Obwohl sich unter moderner Therapie oft eine Verbesserung des Primärtumors zeigt, steigt die Inzidenz zerebraler Metastasen paradoxerweise an (Gavrilovic et al, 2005). Gründe dafür liegen in der immer höher werdenden Lebenserwartung, der stetigen Verbesserung bildgebender Verfahren, der höheren Therapieresistenz als bei den Primärtumoren, sowie in einem gesteigerten Bewusstsein und einer sensibleren Wahrnehmung von Warnzeichen und Risikofaktoren (Posner, 1992; Gril et al, 2010). Vor allem bei der Behandlung des Mammakarzinoms hat eine Verbesserung der systemischen Chemotherapie zu einer verlängerten Krankheitsdauer geführt und damit das Metastasierungsrisiko erhöht. Das männliche Geschlecht weist häufiger Hirnmetastasen auf als das weibliche. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei Männern deutlich häufiger ein Bronchialkarzinom vorliegt. Denn nicht alle Tumorentitäten zeigen dieselbe Affinität zur Metastasierung in das Gehirn. So entstammen 50-60% der Hirnmetastasen einem Bronchialkarzinom, 15-20% einem Mammakarzinom und der Rest verteilt sich überwiegend auf Nierenzellkarzinome, maligne Melanome oder Tumore gastrointestinaler Herkunft (Johnson et al, 1996). Eine Ursache für dieses Verteilungsmuster ist, neben den spezifischen hämatogenen Abflusswegen, in einer unterschiedlich ausgeprägten Affinität der Tumorzellen zu einer bestimmten Metastasenumgebung zu finden, die wiederum auf die jeweiligen genetischen Besonderheiten des individuellen Tumors zurückzuführen ist. Zusammengefasst wird dieses Phänomen in der „seed and soil“ Theorie, die seit ihrer Erstbeschreibung 1889 von Steven Paget durch eine umfangreiche Datenlage an sowohl klinischen als

auch experimentellen Studien immer wieder bestätigt wurde und auch heute noch Grund intensiver Forschung ist (Fidler et al, 2011). Sowohl die Theorie als auch die nach dieser Häufigkeitsverteilung der Hirnmetastasierung bedeutsamsten Tumore (Bronchial-, Mamma-, Nieren-, Kolonkarzinom) werden auf den folgenden Seiten nochmals genauer beschrieben. Je nach Tumorentität sind unterschiedliche Metastasierungsraten bekannt. Besonders häufig metastasieren Chorionkarzinome (9-83% der Tumore) und maligne Melanome (8-75%) in das Gehirn, gefolgt von Mamma- (18-37%) und Bronchialkarzinomen (15-49%) (Paulus, 2002). Eher selten führen gastrointestinale Tumore, Gallengangs- und Uteruskarzinome zu intrazerebralen Metastasen.

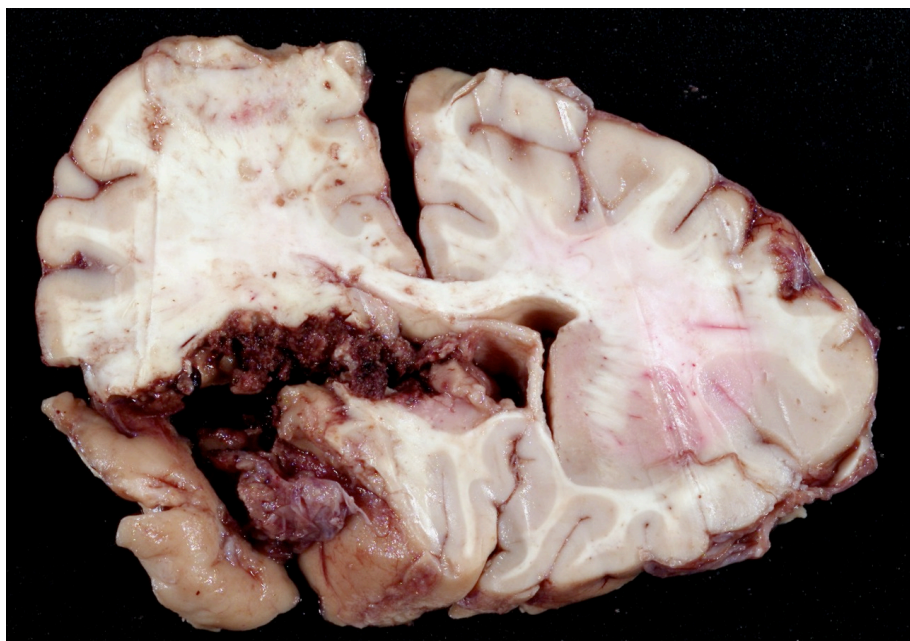
| Häufigkeitsverteilung der Primärtumoren bei Hirnmetastasen   | Zerebrale Metastasierungsrate einzelner Neoplasien   |
|--|--|
|  <p style="text-align: center;">&gt;50 %</p> <p>Bronchialkarzinom<br/>Mammakarzinom<br/>Hypernephrom<br/>Gastrointestinale Tumoren<br/>Malignes Melanom<br/>Sarkom<br/>Schilddrüsenkarzinom<br/>Uterus-/Ovarialkarzinom<br/>Prostatakarzinom<br/>Karzinome des Kopfes/<br/>Nackens<br/>Keimzelltumoren</p> <p style="text-align: center;">&lt; 1 %</p> |  <p style="text-align: center;">&lt; 1 %</p> <p>Prostatakarzinom<br/>Uterus-/Ovarialkarzinom<br/>Schilddrüsenkarzinom<br/>Sarkom<br/>Gastrointestinale Tumoren<br/>Hypernephrom<br/>Karzinome des Kopfes/<br/>Nackens<br/>Mammakarzinom<br/>Bronchialkarzinom<br/>Keimzelltumoren<br/>Malignes Melanom</p> <p style="text-align: center;">&gt; 50 %</p> |

**Tabelle 1: Häufigkeitsverteilung der Primärtumoren bei Hirnmetastasen und zerebrale Metastasierungsrate einzelner Neoplasien (Grafische Darstellung in Anlehnung an Jellinger K, 1984)**

### 1.1.2 Lokalisation und Morphologie

Metastasierungen in den intrazerebralen Raum erfolgen hämatogen im bereits späten Stadium der Krankheit, sind aber dennoch gelegentlich der erste Hinweis auf den noch klinisch unauffälligen Primärtumor. Die Häufigkeit der sogenannten CUP-Tumore (cancer of unknown primary) liegt dabei bei 10-20% (Pavlidis et al, 2009). Intrazerebrale Metastasen setzen sich bevorzugt an der Rinden-Mark-Grenze und den Grenzversorgungsgebieten der großen Hirnarterien fest. 70% befinden sich in den beiden Hirnhemisphären, wobei der Parietal- (17%) und Frontallappen (32%) am häufigsten betroffen sind. 24% sind im

Cerebellum lokalisiert und 6% im Hirnstamm (Ghia et al, 2007). Makroskopisch handelt es sich um meist gut abgrenzbare und gering infiltrierende Knoten. Schon bei kleinem Durchmesser lassen sich Zysten, nekrotische Bereiche und Hämorrhagien feststellen. Das Umgebungsödem kann massiv sein. Histopathologisch betrachtet kann der Grad der Differenzierung des Gewebes im Vergleich zum Primärtumor variieren. Auch auf molekulargenetischer Ebene oder hinsichtlich der Protein- und Genexpression finden sich nicht selten Unterschiede zwischen Primärtumor und Metastase provoziert durch die Tumorumgebung (Park et al, 2011).



**Abbildung 1: Makroskopie einer ausgedehnten zerebralen Metastase eines invasiv duktales Mammakarzinoms mit Infiltration der Stammganglien und ausgedehntem Hirnödem bei Zustand nach Resektion**

### **1.1.3 Symptomatik, Prognose und Therapie**

Hirnmetastasen sind häufig von Ödemen umgeben, wodurch sie stark raumfordernd wirken und oftmals eine ausgeprägte, rasche Symptomatik mit sich bringen. Dies führt in einer Vielzahl der Fälle zu Liquorzirkulationsstörungen und intrakraniell Druckanstieg mit konsekutiver Schädigung des zentralen Nervensystems (ZNS). Zwei Drittel der Patienten haben manifeste neurologische Symptome wie Kopfschmerzen, Demenz, motorische Defizite oder Aphasie. Bei einem Drittel der Fälle kommt es zu epileptischen Anfällen. In zirka

50% der Fälle stellt die beschriebene neurologische Symptomatik die Hauptursache für das Versterben des Patienten dar (Zimm et al, 1981). Generell stellen Metastasen die Haupttodesursache bei Karzinompatienten dar. Die Prognose der Patienten mit Hirnmetastasen ist dementsprechend schlecht und zeigt eine mittlere Überlebenszeit von neun Monaten bei maximaler Behandlung, unbehandelt sogar weniger als zwei Monate (Carbonell et al, 2009; Nathoo et al, 2005). Therapiemöglichkeiten sind begrenzt und selten kurativ. Dabei zeigt sich die Bluthirnschranke als großes Hindernis in der effektiven Behandlung von Gehirnmetastasen, indem sie das Chemotherapeutikum daran hindert, am Zielort zu wirken (Gril et al, 2010). Die Voraussetzung für die Einleitung einer zytostatischen Therapie ist dabei eine im Vorfeld erstellte histologische Diagnose. Im folgenden Abschnitt werden die aktuellen Therapieoptionen zusammengefasst:

Den Hauptteil der Behandlung macht die Bestrahlung aus. Diese kann jedoch, vor allem durch neurokognitive Komplikationen bei der Bestrahlung des gesamten Gehirns, selbst zur Morbidität beitragen (Gril et al, 2010). Eine isolierte Hirnmetastase kann durch Operation oder stereotaktische Einzeitbestrahlung beziehungsweise fraktionierte Bestrahlung behandelt werden (Alderson et al, 1983). Bei multiplen Hirnmetastasen ist die perkutane Ganzhirnbestrahlung unterstützt durch Steroidmedikation bei perifokalem Ödem die Therapie der Wahl (Kondziolka et al, 1999). Als weitere Angriffsziele wurden in den letzten Jahren vor allem die Tumorangio-genese oder tumorspezifische Proteine in präklinischen und klinischen Studien getestet. In der Antiangiogenesetherapie ist beispielsweise Bevacizumab (Handelsname Avastin<sup>®</sup>, Hersteller Roche), ein humanisierter monoklonaler IgG-Antikörper gegen VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), Erlotinib (Handelsname *Tarceva*<sup>®</sup>, Hersteller Roche), ein selektiver Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors und Sorafenib (Handelsname Nexavar<sup>®</sup>, Hersteller Bayer AG) aus der Gruppe der Multi-Kinase-Inhibitoren zu nennen, die in Phase II-Studien an Patienten mit Hirnmetastasen getestet wurden beziehungsweise werden (Mountzios et al, 2012; Amaravadi et al, 2009, Akerley et al, 2009). Im weiteren Verlauf wird bei der

Beschreibung der einzelnen Tumortypen nochmals auf die spezifische Therapie genauer eingegangen.

Der Zeitpunkt der Entwicklung von zerebralen Metastasen ist abhängig vom Ursprungsorgan des Primärtumors. So entwickeln Patienten mit Lungenkarzinom sehr früh (innerhalb der ersten zwei Jahre nach Erstdiagnose) Gehirnmastasen, während es bei Brustkrebspatienten erst nach multiplen Chemotherapiezyklen und bei bereits bestehendem systemischen Befall zu Metastasierungen ins ZNS kommt. Das Auftreten von Hirnmetastasen ist dabei sehr stark von dem Expressionsprofil bestimmter Oberflächenproteine abhängig (Berghoff et al, 2012). Nachfolgend sollen die vier häufigsten Entitäten der Primärtumore kurz vorgestellt werden.

## **1.2 Bronchialkarzinom**

### **1.2.1 Allgemeines**

Das Bronchialkarzinom gehört ätiologisch gesehen zu den typischen umweltinduzierten Tumoren, wobei das inhalative Tabakrauchen den wichtigsten Risikofaktor mit einem Anteil von 85% darstellt. Etwa 5% der Tumore werden der Luftverschmutzung zugeschrieben, weitere 8% berufsbedingten Karzinogenen.

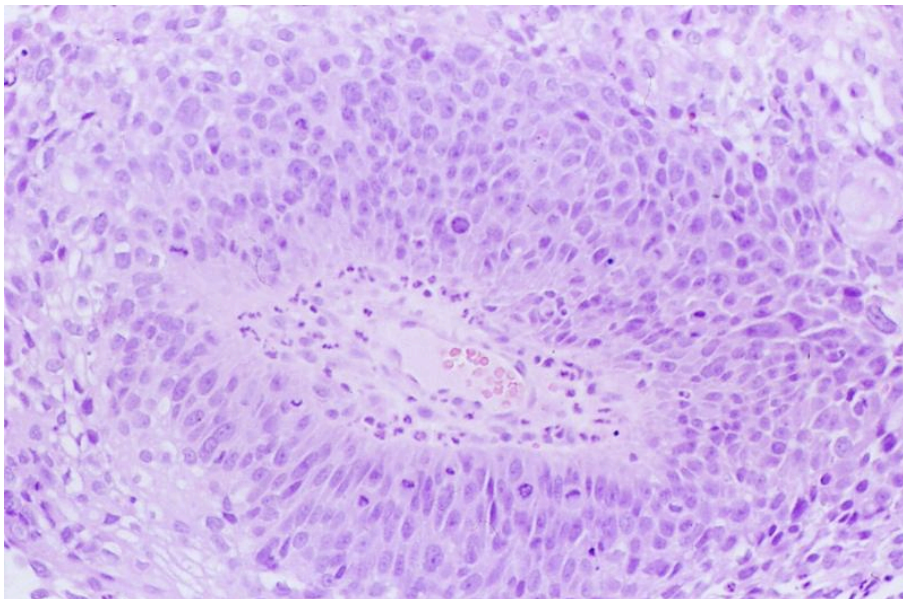
Das Bronchialkarzinom steht bei den Männern an erster Stelle der Krebstodesursachen und bei den Frauen nimmt es den dritten Rang nach Mammakarzinomen und kolorektalen Tumoren ein. Histologisch werden die Lungentumore zunächst grob in zwei Gruppen (kleinzellig und nicht kleinzellig) eingeteilt. Bei den sogenannten nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen besteht ein 5-Jahres Risiko von 10%, Hirnmetastasen zu entwickeln (Hubbs et al, 2010). Besonders häufig werden zerebrale Tumorabsiedelungen bei bronchialen Adenokarzinomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen beobachtet (Herth et al, 2005; Serizawa et al, 2002). Hubbs et al stellten in ihrer Studie fest, dass jüngeres Alter, ausgeprägte Tumorgröße, lymphovaskuläre Invasion und betroffene hiläre Lymphknoten mit einem verstärkten Risiko für die Entwicklung von Hirnmetastasen assoziiert sind (Hubbs et al, 2010). Im Vergleich zum Mammakarzinom konnten bis jetzt jedoch nur wenige Risikofaktoren für die Entwicklung

von Hirnmetastasen identifiziert werden. In der Therapie gewinnen Inhibitoren des Wachstumsfaktors VEGF (vascular endothelial growth factor) und des Rezeptors EGFR (epithelial growth factor receptor) immer mehr an Bedeutung (Preusser et al, 2012). So besteht beispielsweise ein Zusammenhang zwischen der Überexpression des Faktors VEGF mit fortgeschrittenem Tumorstadium (IIIB und IV) sowie kurzer Überlebenszeit (Dudek et al, 2005; Kaya et al, 2004).

### **1.2.2 Histologische Klassifikation**

#### **1. Plattenepithelkarzinom**

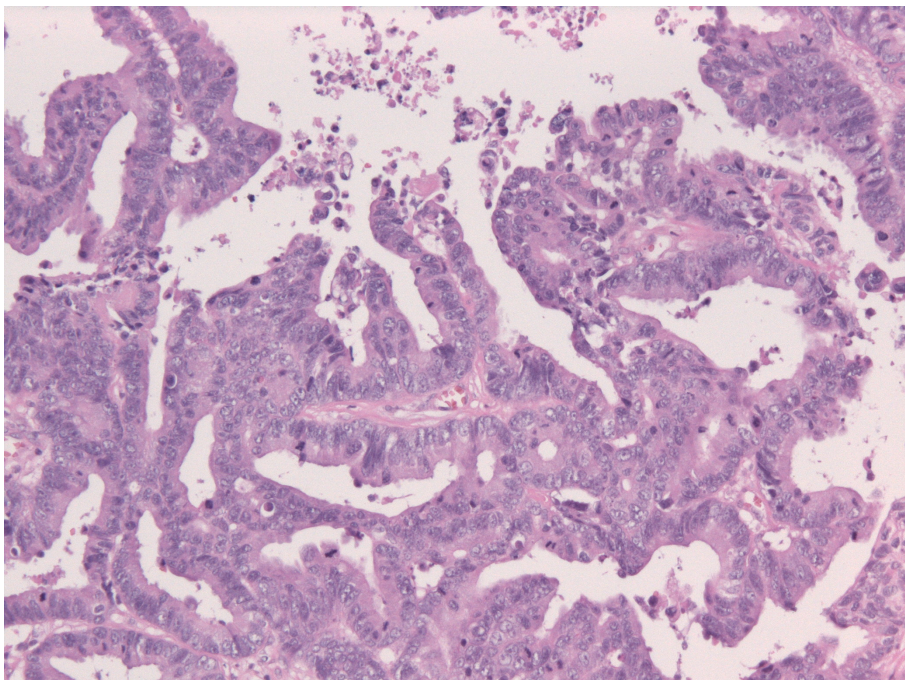
Das Plattenepithelkarzinom macht 30-40% der Bronchialkarzinome aus und steht in starkem Zusammenhang mit Zigarettenrauch. Die Mehrzahl entsteht zentral in den Haupt-, Lobär-, und Segmentbronchien. Plattenepithelkarzinome tendieren eher zu lokalem, aggressivem Wachstum mit direkter Infiltration benachbarter Strukturen als zu hämatogener Metastasierung. Kommt es trotzdem zur Metastasenbildung, so streut der Primärtumor in Gehirn, Nebennieren und Lymphknoten.



**Abbildung 2: Histologisches Bild eines Plattenepithelkarzinoms (HE-Färbung)**

## 2. Adenokarzinom

Der Anteil der Adenokarzinome an allen Bronchialkarzinomen liegt ebenfalls bei 30-40%. Am häufigsten kommt es dabei zu einem peripheren Tumor mit Pleura- und/oder Thoraxwandbeteiligung. Das Adenokarzinom neigt zur Metastasenbildung. Etwa ein Fünftel der Fälle mit Adenokarzinomen weist bei Erstdiagnose bereits eine Fernmetastasierung in vor allem Gehirn, Skelettsystem, Nebennieren und Leber auf. Die meisten Hirnmetastasen aus der Lunge sind dementsprechend Adenokarzinome (Jellinger 1984). Die Prognose korreliert dabei mit dem histologischen Differenzierungsgrad (G1-G3).



**Abbildung 3: Histologisches Bild eines papillären Adenokarzinoms (HE-Färbung)**

## 3. Kleinzelliges Karzinom

Ein kleinzelliges Karzinom liegt in 20-30% der Fälle vor. Nach WHO Definition handelt es sich dabei um einen malignen epithelialen Tumor aus kleinen Tumorzellen mit spärlichem Zytoplasma und unscharfen Zellgrenzen. Der Differenzierungsgrad ist per definitionem gering (high grade, G3). Bei dieser Art von Tumor ist die Mitoserate sehr hoch und die Nekrosen sind ausgedehnt. Die Tumore sind typischerweise perihilär lokalisiert und haben eine schlechte Prognose aufgrund schnellen Wachstums und frühzeitiger Metastasierung. So lassen sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei 18% der Patienten bereits

zerebrale Metastasen feststellen (Seute et al, 2004), wobei die Inzidenz mit dem Verlauf der Erkrankung weiterhin stark ansteigt und nach 2 Jahren bis zu 80% erreicht (Nugent et al, 1979).

#### 4. Großzelliges Karzinom und großzelliges neuroendokrines Karzinom

Diese Variante kommt in 10% der Fälle vor. Es handelt sich dabei um ein undifferenziertes, nicht kleinzelliges Karzinom ohne glanduläre oder plattenepitheliale Differenzierung. Die neuroendokrine Differenzierung der Tumore kann mittels immunhistochemischer Färbungen gegen beispielsweise Chromogranin oder Synaptophysin in der pathologischen Routinediagnostik bestimmt werden.

Als weitere seltene histologische Formen sind noch das adenosquamöse (ca. 4%) und das sarkomatoide Karzinom (ca. 0,3-1,3%) zu nennen.

### **1.3 Mammakarzinom**

#### **1.3.1 Allgemeines**

Brustkrebs ist bei Frauen der häufigste Tumor, mit einem Anteil von 22% an den gesamten Tumorerkrankungen des weiblichen Geschlechtes (Parkin et al, 2001). Im Zusammenhang mit der Entstehung von zerebralen Filae sind besonders der Rezeptorstatus sowie spezifische klinische Merkmale (zum Beispiel Lymphknotenbefall und Tumorgröße) als Risikofaktoren von Bedeutung. So ergibt sich bei jungem Alter sowie einem triple-negativen Befund (Östrogen-, Progesteron-, Her2/neu-negativ) ein erhöhtes Risiko für das Auftreten zerebraler Metastasen (Berghoff, 2012; Evans et al, 2004; Carey et al, 2004).

Kennecke et al hingegen zeigten ein gesteigertes Risiko für zerebrale Metastasen bei starker Anreicherung von HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) (Kennecken et al, 2010). In der Studie entwickelten 28,7% der HER2 positiven Brustkrebspatienten zerebrale Metastasen (Kennecke et al, 2010). Die Behandlung von HER2 positiven Tumoren erfolgt mittels Trastuzumab (Handelsname: Herceptin<sup>®</sup>, Hersteller: Roche), einem monoklonalem



Antikörper gegen HER2, dessen Einsatz mittlerweile zu einer guten Kontrolle des Primärtumors führt. Jedoch kann Trastuzumab die Bluthirnschranke nicht passieren, wodurch die Tumorzellen im Gehirn vor der Behandlung geschützt sind. Bei vielen Patienten kommt es folglich trotz stabilem Status des Primärtumors und gutem Ansprechen auf die systemische Behandlung zur Entwicklung von Gehirnmetastasen (Bendell et al, 2003; Shmueli et al, 2004).

Petersen et al konnten einen Zusammenhang zwischen einem Tumorsuppressorgen auf dem langen Arm des Chromosom 15 und der zerebralen Metastasierungsrate erkennen (Petersen et al, 1996). Bei Primärtumoren, die ins Gehirn metastasiert haben, konnte bei 70% eine Mutation des beschriebenen Tumorsuppressorgens gefunden werden. Bei nicht metastasierenden Brusttumoren konnte dies nur in 11% der Fälle festgestellt werden.

Der Malignitätsgrad aller histologischen Typen wird heute nach einer von Elston und Ellis modifizierten Form des Gratings nach Bloom und Richardson beschrieben. Es werden dabei die Tubulusbildung, Kernpolymorphien und Mitoseraten semiquantitativ beurteilt (Elston und Ellis, 1991).

### **1.3.2 Histologische Klassifikationen**

#### **1. Invasives duktales Karzinom**

Das invasive duktales Karzinom macht 40- 75% der Mammakarzinome (Elston et al, 1998) aus und hat seinen Ursprung in den Milchgängen (Ductus lactiferi). Am häufigsten zeigt es ein sternförmiges und knotiges Wachstum, weshalb es in der Mammographie und im Ultraschall gut zu sehen ist.

#### **2. Invasives lobuläres Karzinom**

Das invasive lobuläre Karzinom geht von den Epithelzellen der Lobuli aus und repräsentiert 5-15% der invasiven Mammakarzinome (Du Toit et al, 1989; Toikkanen et al, 1997). Aufgrund seines diffusen Wachstums und fehlenden Kalzifikationen wird die Diagnosestellung mittels Mammographie und somit auch die Früherkennung erschwert (Winchester et al, 1998). Im Vergleich mit dem invasiv-lobulären Karzinom konnte ein niedrigerer Malignitätsgrad und eine niedrigere Wahrscheinlichkeit bezüglich des Befalls von Lymphgefäßen gezeigt werden (Mc Closkey et al, 2006).

### 3. weitere Klassifikationen

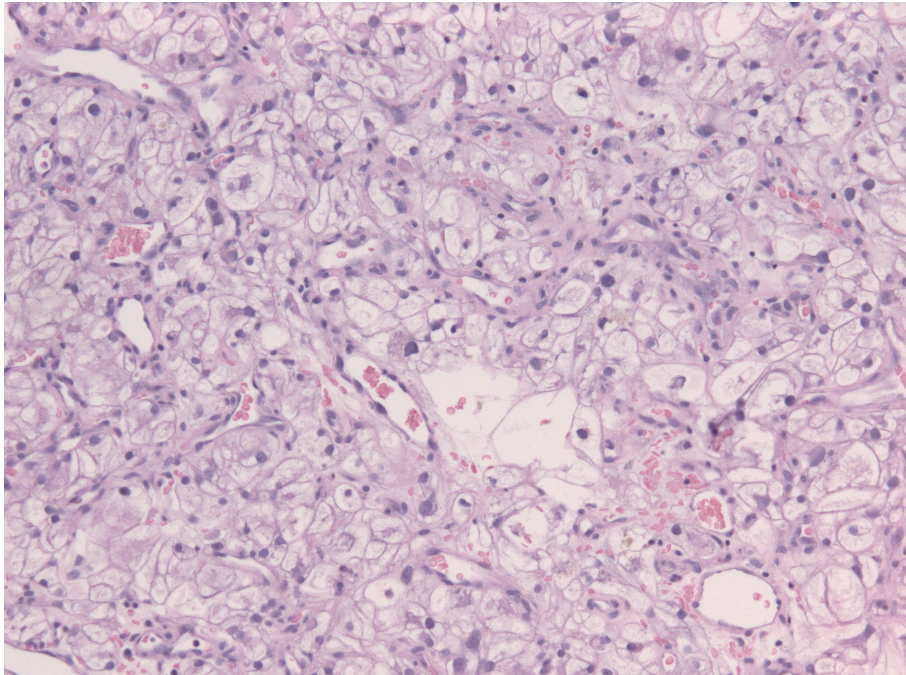
Neben den genannten Histologieformen existieren auch seltene Varianten, die in der Regel nur als Rarität im Gehirn gefunden werden. Diese sind in Tabelle 2 aufgelistet.

| Histologische Klassifikation    | Anteil an gesamten Mammakarzinomen in % |
|---------------------------------|---|
| Tubuläres Karzinom              | 2-7                                     |
| Invasives cribriformes Karzinom | 0,8-3,5                                 |
| Medulläres Karzinom             | 1-7                                     |
| Muzinöses Karzinom              | 2                                       |
| Neuroendokrine Tumore           | 2-5                                     |

**Tabelle 2: Anteile seltenerer histologischer Varianten an den gesamten Mammakarzinomen (Bloom et al, 1970; Rasmussen et al, 1985; Sapino et al, 2001 )**

## 1.4 Nierenkarzinom

Das Nierenkarzinom ist ein relativ seltener Tumor (1-2% aller bösartigen Tumore). Einteilen lässt es sich in klarzellige, papilläre (chromophile) und chromophobe Tumorsubtypen (Moch et al, 2000). Am häufigsten ist das klarzellige Nierenzellkarzinom (Hypernephrom), welches von den proximalen Tubuluszellen ausgeht und bereits schon bei geringer Größe und geringgradigen zytologischen Veränderungen metastasiert (Thönes et al, 1986). Hirnmetastasen werden in 2-17% aller betroffenen Patienten mit Nierenzellkarzinom beobachtet (Sanddock et al 1995, Sheehan et al 2003). In seltenen Fällen steht das Nierenzellkarzinom im Zusammenhang mit einem von Hippel-Lindau-Syndrom (Retino-zerebelläre Angiomatose), bei dem der Patient neben Hämangioblastomen der Retina und des Kleinhirns auch Karzinome der Niere oder auch Nebenniere aufweisen kann.



**Abbildung 4: Histologisches Bild eines klarzelligen Nierenkarzinoms (HE-Färbung)**

## **1.5 Kolonkarzinom**

Karzinome des Kolons und des Rektums sind in Deutschland unter den Tumorerkrankungen bei den Frauen die zweithäufigste Todesursache und bei den Männern die dritthäufigste. 95% der malignen epithelialen Tumore des Kolons sind Adenokarzinome. Der Tumor kann sich in das parakolische Fettgewebe, das Peritoneum und in benachbarte Strukturen ausbreiten. Eine frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung ist jedoch auch möglich. Die hämatogene Metastasenbildung folgt dabei dem venösen Abfluss über die Vena portae in die Leber. Erst danach werden Lunge, Knochen und Gehirn befallen (Kaskadentheorie nach Ewing). ZNS-Metastasen zeigen sich daher meist erst bei systemischem Befall.

## **1.6 Die Entstehung von Metastasen – die „seed and soil theory“ und die Rolle der Integrine**

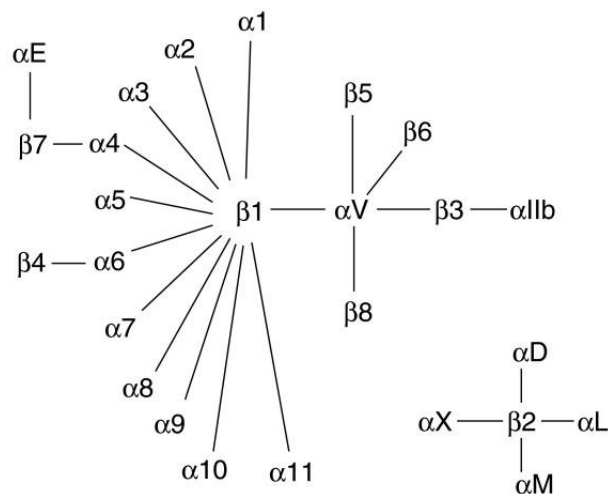
Dissemination von Tumorzellen tritt schon im frühen Stadium der Tumorerkrankung auf (Pantel et al, 1993; Demicheli et al, 2001). Die disseminierten Tumorzellen finden sich meist in Lymphknoten, Knochenmark und in der Blutbahn. Zu diesem Zeitpunkt sind sie meist nicht teilungsfähig (Pantel et al, 1993; Goldberg et al, 1999; Naumov et al, 2002), das heißt, sie befinden sich in der Ruhephase (G0) oder postmitotischen Phase (G1) des Zellzyklus (Pelayo et al, 2006). Gelangen sie ins Gewebe, so proliferieren nur sehr wenige Zellen und aus einem noch geringeren Anteil wird im Verlauf eine größere, vaskularisierte Metastase mit klinischer Signifikanz (Chambers et al, 2002; Chambers et al, 2001; Luzzi et al, 1998). Bei dem Großteil der Tumorzellen kommt es zur Apoptose oder sie verbleiben im Gewebe als solitäre „schlafende“ Zellen (Luzzi et al, 1998; Townson et al, 2003), die entweder wie Stammzellen komplett ruhen oder in denen sich Proliferation und Apoptose die Waage halten (Townson et al, 2006). Abhängig von der Anzahl der bereits stattgefundenen wachstumsfördernden genetischen Veränderungen, können die früh disseminierten Zellen auch nach längerer Zeit im Ruhezustand wieder damit beginnen, vermehrt zu proliferieren (Aguirre-Ghiso et al, 2007). Doch auch wenn schon beträchtliche pro-onkogene Mutationen im Tumorgewebe stattgefunden haben, können sich die Tumorzellen immer noch im Ruhezustand befinden (Klein et al, 2006). Daraus lässt sich schließen, dass es über den genetischen Status einer Tumorzelle hinaus noch andere Mechanismen geben muss, die die Reaktivierung einer ruhenden Zelle hin zur Metastase beeinflussen. Tumorzellen, bei denen keine Adhäsion an die Extrazellulärmatrix stattfindet, verfallen in der Regel in den Ruhestatus (Barkan et al, 2010). So kann eine für das Metastasenwachstum ungünstige Tumorumgebung diesen Ruhestatus induzieren, während starker Umbau der Extrazellulärmatrix hin zu einer tumorfreundlichen Umgebung („premetastatic niche“) den Zustand der Balance zwischen Proliferation und Apoptose aufheben kann. Die Interaktion zwischen Tumorzelle („seed“) und Umgebung („soil“) beeinflusst die Genexpression der Tumorzelle (Bissell et

al, 2003; Weaver et al, 1997; Park et al, 2011) und somit die Progression des Zellzyklus, Migration und Differenzierung (Barkan et al, 2010). Diese soeben beschriebene wichtige Rolle der Mikroumgebung auf das Wachstum beziehungsweise Überleben der gesäten Tumorzellen wurde schon 1889 von dem Chirurgen Stephen Paget entdeckt und als „seed and soil theory“ beschrieben. Wie wichtig die Rolle der Tumorumgebung ist, zeigt sich zum Beispiel bei Chang et al, die ein bestimmtes Expressionsmuster bestehend aus Genen, die für starke Umwandlung und Proliferation der ECM verantwortlich sind, als Marker für eine schlechte Prognose bei Brust-, Lungen- und Magenkarzinomen identifiziert haben. Durch Sekretion bestimmter Chemokine von den Tumorzellen wird das Muster der Tumorausbreitung festgelegt (Kaplan et al, 2006). Es kommt zur Vorbereitung der prämetastatischen Nischenbildung. Dazu zählt unter anderem die Hochregulation von Fibronectin und Ansammlung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, die auch Matrixmetalloproteinasen (MMP) exprimieren. MMPs bauen bestimmte Proteine der Extrazellulärmatrix ab und können proteolytisch eine große Anzahl an Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren bilden (Jodele et al, 2006). Als wichtige Matrixmetalloprotease ist MMP-9 zu nennen, die die Basalmembran zerstört und so die Invasion des Tumors ermöglichen kann (Kaplan et al, 2006). Als Vermittler zwischen Tumorzelle und Aktivierung der MMP-9 wird beispielsweise der Integrinkomplex  $\alpha\beta6$  angesehen, dessen erhöhte Expression in malignen Keratinozyten und Kolonkarzinomzellen mit einer erhöhten Expression von MMP-9 assoziiert ist (Thomas et al, 2000). Aber auch bei anderen Mechanismen, die die Proliferation, Migration und vor allem auch Angiogenese der Tumorzellen fördern, spielen Integrine eine wichtige Rolle, indem sie durch dynamische Interaktion Veränderungen in der Extrazellulärmatrix erkennen und auch erzeugen können. Auch durch Formation und Reorganisation des Zytoskeletts stellen Integrine dabei einen wichtigen Mediator bei der Bildung der prämetastatischen Nische dar, innerhalb derer die eigentliche Tumorabsiedlung weiter erfolgen kann.

## 1.7 Integrine

### 1.7.1 Struktur und Funktion

Mit Ausnahme von Erythrozyten produzieren alle humanen Zellen mindestens einen Integrinkomplex (Matjans et al, 1995). Integrine sind eine Familie aus mindestens 24 Transmembranrezeptoren, die sowohl Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln als auch an lösliche Liganden binden können. Der cytoplasmatische Anteil ist weniger als 75 Aminosäuren lang (Takada et al, 2007). Sie sind heterodimer aufgebaut und bestehen aus gepaarten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, die einen Komplex bilden. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sind komplett unterschiedlich aufgebaut und zeigen keine homologen Sequenzen. Bekannt sind heute mittlerweile 8 verschiedene  $\beta$ - und 18 verschiedene  $\alpha$ -Ketten, die nur bestimmte Kombinationen miteinander eingehen können (siehe Abb.5).



**Abbildung 5:** Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten der Integrinuntereinheiten. Insgesamt können 24 unterschiedliche Integrinkomplexe gebildet werden. (Abbildung aus Takada et al, 2008)

Über Signaltransduktionen beeinflussen sie Proliferation, Adhäsion, Angiogenese, Migration und Invasion von Zellen (Takada et al, 2007). Einige Integrinsubtypen sind auf bestimmte Gewebe und Zellen beschränkt, wie zum Beispiel das Integrin  $\alpha v \beta 3$ , das stark von Endothelzellen expremiert wird, oder  $\alpha 11b \beta 3$ -

Integrin, das hauptsächlich auf Thrombozyten zu finden ist und dort den vWF sowie Thrombospondin und Fibrinogen bindet (Scarborough et al, 1999). Integrine sind essentiell für die Embryonalentwicklung des Gewebes und spielen auch eine große Rolle in der Immunologie. Hier lässt sich beispielsweise das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM) als Ligand für bestimmte Integrine ( $\beta$ 2-Integrine) erwähnen. Takada et al konnten die Integrin-Subtypen in Bezug auf die Spezifität unterschiedlicher Liganden in Laminin-bindende Integrine, Kollagen-bindende Integrine, Leukozyten-Integrine und RGD-bindenden Integrine aufteilen. In der aktuellen Arbeit werden sowohl  $\alpha\beta$ 3-,  $\alpha\beta$ 5-,  $\alpha\beta$ 6-,  $\alpha\beta$ 8-Integrine als auch nur die  $\alpha$ -Untereinheit analysiert. Für diese Gruppe wurde eine Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz (RGD) als wichtiges Integrin-bindendes Motiv, das an die  $\alpha$ -Untereinheit bindet, identifiziert. Als erstes wurde dieses Motiv bei dem Liganden Fibronectin entdeckt. Wichtige Liganden sind in folgender Übersichtstabelle (Tabelle3) dargestellt:

|                 |   |
|-----------------|---|
| $\alpha\beta$ 3 | Fibrinogen, Vitronectin, vWF, Thrombospondin, Tenascin, Fibronectin, Osteopontin, LAP-TGF- $\beta$ , MMP, ICAM-4, ADAM (a disintegrin and metalloprotease), Angiostatin |
| $\alpha\beta$ 5 | Osteopontin, Vitronectin, LAP-TGF- $\beta$  |
| $\alpha\beta$ 6 | LAP-TGF- $\beta$ , Fibronectin, Osteopontin, ADAM   |
| $\alpha\beta$ 8 | LAP-TGF- $\beta$ , Fibronectin  |

**Tabelle 3: Integrine und zugehörige Liganden (Takada et al, 2007; Jin et al, 2004)**

Bindet der Ligand an die RGD-Sequenz, kommt es zur Konformationsänderung und zur Separation der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit, was wiederum eine Interaktion mit intrazellulären Signalmolekülen nach sich zieht. Integrine können auch vom Zellinneren stimuliert werden. Über intrazelluläre G-Protein gekoppelte Rezeptoren können Integrine aktiviert werden, was zu einer Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne der  $\beta$ -Untereinheit führt. Die meisten  $\beta$ -Untereinheiten besitzen eine tyrosinenthaltende Erkennungssequenz, deren Phosphorylierung eine Rolle im Regulierungsmechanismus bestimmter Proteine spielt und die Bindungsaffinität zum Liganden verändert. (Takada et al, 2007). Integrine können auch Proteine wie Talin binden. Talin wiederum bindet an Aktinfilamente und stellt so eine Verbindung mit dem Zytoskelett der Zelle

her, das auf diese Weise moduliert und reguliert werden kann. Auch das Molekül Vinculin dient als Verbindungsprotein zwischen Integrin und Zytoskelett (Takada et al, 2007). Des Weiteren sind Integrine auch Bestandteil der Regulation von Zellzyklus und Apoptose. Integrine, die ein Substrat gebunden haben, leiten ein positives Signal (Induktion anti-apoptotischer Proteine) in die Zelle, während antagonisierte oder nicht gebundene Integrine ein negatives, zur Apoptose führendes Signal ins Zellinnere leiten (Stupack et al, 2007).

Der folgende Abschnitt soll nun anhand ausgewählter Beispiele einen Eindruck von der Vielfalt der Mechanismen vermitteln, anhand derer Integrine das Metastasenwachstum fördern.

### **1.7.2 Integrin vermittelte Mechanismen zur Förderung des Metastasenwachstums**

Mittels einiger Beispiele soll nun veranschaulicht werden, dass Integrine auf mehreren Ebenen eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung spielen. Dabei beziehen sich die exemplarisch dargestellten Prozesse größtenteils auf das Integrin  $\alpha\beta_3$ , das in dieser Hinsicht am besten erforscht ist.

Beginnen die metastatischen Zellen zu proliferieren, so kommt es schnell zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf. Essentiell für das weitere Wachstum einer Metastase ist demnach die Neueinsprossung von Gefäßen. Dieser Vorgang wird Angiogenese genannt. Der Stimulus für die Entstehung neuer Gefäße wird durch Wachstumsfaktoren gesetzt, die von hypoxischen Gewebezellen ausgeschüttet werden. Dabei kann die Neovaskularisation von bereits existierenden Gefäßen ausgehen (Carmeliet and Jain, 2000) oder aber durch Einwanderung von endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark zustande kommen (Jin et al, 2004). Da das Gehirn ein sehr gut durchblutetes Organ ist, wird dort hauptsächlich der erst genannte Mechanismus beobachtet, bei oft nur geringer Angiogenese. In vielen Studien zeigt sich zerebral ein Metastasenwachstum entlang bereits existierender Gefäße (Kusters et al, 2002; Leenders et al, 2004; Carbonell et al, 2009). Kommt es durch sehr starke Proliferation der Tumorzellen dennoch zur Hypoxie, werden endotheliale Wachstumsfaktoren freigesetzt, die eine Vasodilatation hervorrufen. Die Vasodilatation wiederum führt zu erhöhter Permeabili-



tät und dadurch zum Austritt von bestimmten Proteinen, die die Proliferation der Endothelzellen fördern. Die Basalmembran und die umgebende Extrazellulärmatrix werden von MMPs abgebaut und der neugewonnene Platz wird von Endothelzellen gefüllt (Lim et al, 2005). Integrine beeinflussen dabei Proliferation, Adhäsion und Migration der Endothelzellen (Lim et al, 2005). Das am besten erforschte Integrin in diesem Zusammenhang ist  $\alpha\beta3$ . Lorger et al zeigten in Hirnmetastasen, dass eine Hochregulation von  $\alpha\beta3$  positiv mit einer Hochregulation des Wachstumsfaktors VEGF korreliert (Lorger et al, 2009). Sie zeigten weiterhin, dass aktiviertes  $\alpha\beta3$  auch unter nicht-hypoxischen Bedingungen zu einer Überexpression von VEGF führt, wodurch eine Hypoxie verhindert wird. Tumorzellen mit niedrigem  $\alpha\beta3$ -Status hingegen benötigen eine hypoxische Umgebung, um VEGF freizusetzen. Des Weiteren spielt die Interaktion von  $\alpha\beta3$  mit der ECM eine essentielle Rolle bei der Verhinderung der Apoptose in Endothelzellen. So zeigten beispielsweise Rice et al, dass Osteopontingebundenes  $\alpha\beta3$  auf Endothelzellen der Aorta in Ratten zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt und dadurch Apoptose verhindert (Rice et al, 2006). NF- $\kappa$ B ist ein dimerischer Transkriptionsfaktor, welcher in inaktiver Form im Zytoplasma vorliegt und der Regulation von Zellwachstum und Zellüberleben dient. Aktivierung von NF- $\kappa$ B korreliert mit der Entstehung von Metastasen und verstärktem Zellüberleben in multiplen Tumorzelllinien (Dong et al, 1999; Huang et al, 2001; Sunwoo et al, 2001). Weiterhin zeigt sich bei substratgebundenem  $\alpha\beta3$  eine erhöhte Expression des Onkogens Bcl-2 (Matter und Ruoslahti, 2001). Zusätzlich reguliert  $\alpha\beta3$  auch das Tumorsuppressorgen p53 herunter, was zu einer Unterdrückung des proapoptischen Proteins Bax führt (Stromblad et al, 1996). Auch die Ergebnisse von Petitclerc et al beschreiben passend dazu ein erhöhtes Verhältnis von Bcl-2 zu Bax in  $\alpha\beta3$ -exprimierenden Gliomen, Melanomen und Endothelzellen (Petitclerc et al, 1999). Montgomery et al nehmen an, dass Melanomzellen bestimmte Proteasen freisetzen, die Kollagene abbauen und auf diese Weise RGD-Sequenzen freilegen, die an  $\alpha\beta3$ -Integrine binden können und so vor Apoptose schützen (Montgomery et al, 1994). Darüberhinaus fördert aktiviertes  $\alpha\beta3$  die Adhäsion von Tumorzellen an die Gefäßwand. Tumorzellen binden an

gebundene Thrombozyten und stellen so einen Kontakt zur Gefäßwand her, der gegen die Scherkräfte des Blutflusses resistent ist.  $\alpha\beta 3$  kontrolliert diesen Mechanismus, indem es die Bindung an die Thrombozyten herstellt (Felding-Habermann et al, 2001). Ein weiterer Mechanismus, der die Zellproliferation fördert, ist die Aktivierung des Wachstumsfaktors TGF $\beta$  (Tumor growth factor  $\beta$ ) über  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha\beta 5$  und  $\alpha\beta 3$  (Munger et al, 1999; Takada et al, 2007). Dabei wurde LAP (latency-associated peptide) als Abschnitt identifiziert, der die RGD-Sequenz enthält und so das Integrin mit dem Wachstumsfaktor verknüpft. TGF $\beta$  ist ein Homodimer, das ebenfalls Zelldifferenzierung, Zellteilung und die Produktion der Extrazellulärmatrix reguliert.

Dass die Expression von  $\alpha\beta 6$  mit starker Proliferation einhergeht, zeigte sich schon 1993 bei Breuss et al, die mittels in-situ Hybridisierung im gesunden Rhesusaffen gezeigt haben, dass beta6-mRNA im gesunden Körper sehr schwach exprimiert wird und eine sehr starke Expression nur im sekretorischen, proliferierenden Endometrium nachgewiesen werden kann.

Ein weiterer wachstumsfördernder Mechanismus besteht darin, dass substratgebundene Integrine direkt in den Vorgang der Apoptose eingreifen, indem sie die Aktivierung von Caspasen hemmen (Stupack et al, 2001; Kim et al, 2002). Als Teil des Apoptosoms, ein proteolytischer Komplex, schneiden Caspasen Transkriptionsfaktoren, Kinasen und andere Proteine und führen so zum Zelltod (Carragher et al, 2001). Integrine sind an der Resistenz einer Zelle gegenüber apoptotischen Stimuli, wie zum Beispiel Strahlung oder zytotoxische Medikamente, die normalerweise einen Apoptosesignalweg aktivieren, beteiligt. Stupack et al zeigten, dass die Caspase-8 durch ungebundene Integrine unabhängig von Todesrezeptoren (extrinsischer Apoptosesignalweg) aktiviert, während die Apoptose durch Bindung eines Substrates verhindert wird. Integrine haben also situationsabhängig unterschiedliche Funktionen im Rahmen des Tumorwachstums.

Aber nicht nur Integrine, sondern auch Bestandteile der Tumorumgebung selbst zeigen proliferationsfördernde Funktionen, wie sie auch bei Wundheilungs- und Entzündungsprozessen stattfinden. So ist zum Beispiel eine erhöhte Expression

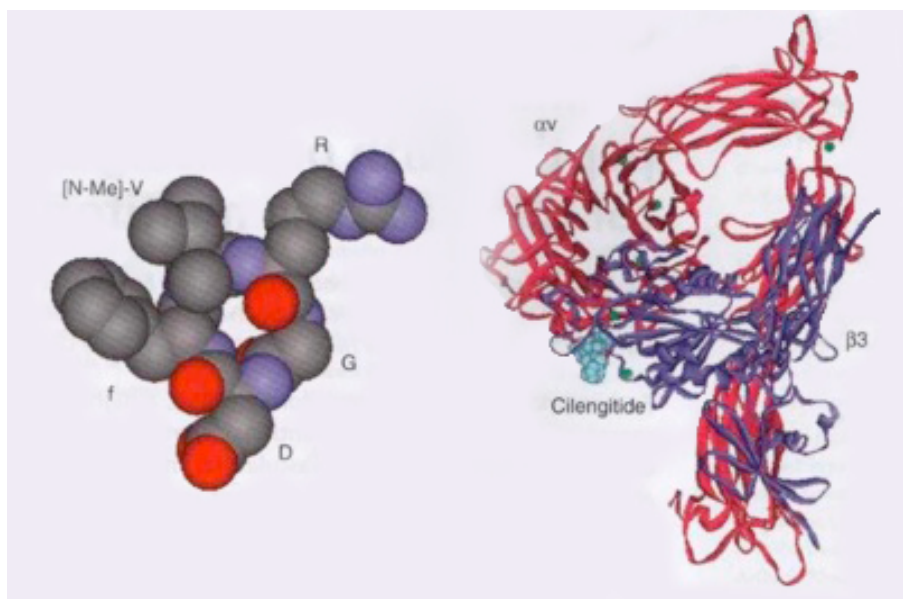
von Fibronectin, dessen Vorkommen auch in dieser Studie untersucht wird, besonders wichtig für die Anheftung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, die wiederum essentieller Bestandteil der Bildung einer premetastatischen Nische sind (Kaplan et al, 2005). Hier besteht auch eine Verbindung zu den Integrinen (siehe Tabelle 1), da diese wie schon oben beschrieben als Vermittler zwischen Tumorumgebung und Tumorzelle fungieren. Es lässt sich also eine Vielzahl von Mechanismen nennen, die durch Integrine reguliert werden. Sie spielen auf mehreren Ebenen eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und werden mittlerweile als attraktiver Therapieansatz betrachtet.

### **1.7.3 Integrinblockade als Option in der Tumorthherapie**

1990 wurde erstmals der Begriff „Disintegrin“ verwendet, um eine Gruppe von cysteinreichen RGD-enhaltenden Proteinen aus dem Gift der Familie der Viper zu beschreiben, die Thrombozytenaggregation und Integrin vermittelte Zelladhäsion verhinderten (Gould et al, 1990). In Studien mit diesen bestimmten Proteinen aus dem Schlangengift konnte dann ein vermindertes Tumorstadium beobachtet werden (Zhou et al, 1999; Swenson et al, 2004; Markland et al, 2001). Mittlerweile gibt es eine Reihe von synthetisch hergestellten Integrininhibitoren, die in den unterschiedlichsten medizinischen Bereichen zum Einsatz kommen. Bereits zahlreich verwendet werden in der Thromboseprophylaxe beispielsweise Eptifibatide (Integrilin®), die als  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Antagonisten die Thrombozytenaggregation verhindern, oder Natalizumab (Tysabri®), ein  $\alpha$ 4-Integrininhibitor, der in der Neurologie als Entzündungsmodulator in der MS-Behandlung zum Einsatz kommt. Zu den Integrininhibitoren gehören monoklonale Antikörper (Vitaxin: MedImmune, Gaithersburg, MD), Peptidantagonisten (Cilengitide: Merck KGaA, Darmstadt, Germany) und kleine Nicht-Peptide, die die RGD-Sequenz nachahmen (S247: Pfizer, St Louis, MO) (Stupp et al, 2007). In Phase II der Medikamententestung findet sich zurzeit das synthetisch hergestellte zyklische Pentapeptid Cilengitid (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), das die RGD-Sequenz enthält (Stupp et al, 2007). Es handelt sich dabei um einen Inhibitor von  $\alpha$ v $\beta$ 3- und  $\alpha$ v $\beta$ 5-Integrinen, der die Tumorangio-genese unterdrückt. Getestet wird vor allem an Glioblastomen, bei denen eine starke Überexpression von  $\alpha$ v $\beta$ 3 und  $\alpha$ v $\beta$ 5 sowohl an den Tumorzellen selbst als auch

an den Endothelzellen nachgewiesen wurde (Bello et al, 2001; Gingras et al, 1995; Gladson et al, 1996), aber auch bei Lungen-, Prostata und Pankreaskarzinomen wird das Medikament getestet (Friess et al, 2005; Beekman et al, 2006; Albert et al, 2006). Cilengitide zeigt eine relativ kurze Halbwertszeit von 2,5 bis 3 Stunden und kann die Blut-Hirn-Schranke gut passieren (Reardon et al, 2008). Des Weiteren lässt sich eine hohe Selektivität feststellen, da Mechanismen, die durch andere Integrine vermittelt werden, kaum beeinflusst werden (Reardon et al, 2008). Bei einer Dosis von 2400 mg/m<sup>2</sup> zeigte sich in einem 4-wöchigen Behandlungszyklus mit je zwei Infusionen pro Woche bei Gliompatienten eine sehr gute Verträglichkeit und Compliance (Nabors et al, 2007). Auch bei refraktären pediatriischen Tumoren wurde eine Dosis von 1800 mg/m<sup>2</sup> gut vertragen (Mac Donald et al, 2008). Bei wenigen Patienten ergaben sich Nebenwirkungen wie Thrombose, Gelenk- und Knochenschmerzen, Anorexie und Hypoglykämie (Nabors et al, 2007; Reardon et al, 2008). Die Toxizität ist vergleichbar mit der Toxizität bei alleiniger Strahlentherapie beziehungsweise Behandlung mit Temozolomid, einem alkylierendem Zytostatikum, das als adjuvante und palliative Therapie bei Glioblastomen eingesetzt wird. Die Cilengitidgabe bewirkte bei einigen Patienten vor allem eine Langzeitstabilität, also eine Verlangsamung der Wachstumskurve, weniger eine sichtbare Verkleinerung des Tumors. In Studien zeigt sich die beste Wirkung in Kombination mit anderen Chemotherapien und vor allem mit Radiotherapie (Bello et al, 2001). Zur Anwendung von Cilengitiden bei Patienten mit Hirnmetastasen liegen bislang noch keine Publikationen vor, erste Phase I Studien haben allerdings bereits begonnen (Preusser et al, 2012). Bei einer möglichen Therapie von Hirnmetastasen stellt sich daher die Frage nach einem Unterschied in der Integrinexpression bezogen auf das Herkunftsorgan der Metastase beziehungsweise den histologischen Typ des Karzinoms. Zusätzlich kommt die Frage auf, inwiefern sich das Expressionsprofil der Metastase von dem des Herkunftorgans unterscheidet und welche Parallelen sich im Expressionsprofil erkennen lassen. Lässt ein bestimmtes Expressionsmuster von Integrinen vielleicht schon auf ein bestimmtes Herkunftsorgan schließen oder erweisen sich bestimmte Integrine als spezifisch für den Metastasierungsort „Gehirn“?

Genauso wie es ein spezifisches Expressionsprofil an Chemokinen und Proteasen gibt, das Tumorzellen zu einem bestimmten Organ führt (Kang et al, 2003; Minn et al, 2005), könnte sich auch je nach Herkunftsorgan oder auch Metastasierungsort ein gewebespezifisches Integrinmuster zeigen. Bei der Untersuchung verschiedener Karzinome als Primärtumor zeigten sich bereits Unterschiede in der Integrinexpression (Sipos et al, 2004).



**Abbildung 6: links: Struktur eines Cilengitids mit Hervorhebung der RGD-Sequenz und rechts: Struktur des Integrins  $\alpha v\beta 3$  mit  $\alpha v$ -Untereinheit (rot) und  $\beta 3$ -Untereinheit (blau) und gebundenem Cilengitid (Abbildung aus Reardon et al, 2008)**

## 1.8 Fragestellung und Ziel der Arbeit

In dieser Studie sollen die von Merck-Serono (Darmstadt, Germany) neu entwickelten Antikörper gegen  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha v\beta 6$ ,  $\alpha v\beta 8$ ,  $\alpha v$  und CytoB3 an in Paraffin gebetteten Tumorschnitten von Hirnmetastasen getestet werden. Die meisten bisherigen Antikörper erwiesen sich als nur für Kryoschnitte gut geeignet und folglich soll die Funktionsfähigkeit der Antikörper bei passender Verdünnung für das in der Routine verwendete Paraffinmaterial ermittelt werden. Bei erfolgreichem Einsatz der Antikörper in der Immunhistochemie ließe sich so die zukünftige Routine erleichtern. Die Integrinexpression wird nun sowohl in zerebralen Metastasen unter Berücksichtigung von Histologie, Herkunft, Differenzierungsgrad und Lokalisation untersucht, als auch ein Vergleich zur Integrinexpression im Primärtumor gezogen. Ein weiteres Ziel der

Arbeit soll dabei sein, eventuelle Unterschiede zwischen den Histologieformen und Herkunftsorganen festzustellen. Ebenfalls wichtig wäre es, eine mögliche Korrelation mit den auf- oder absteigenden Differenzierungsgraden festzustellen. Des Weiteren soll das Vorkommen der Liganden Fibrinogen (Hersteller des Antikörpers: AbD Serotec, Düsseldorf, Germany), Fibronectin (Hersteller des Antikörpers: Novocastra, Newcastle, United Kingdom), Vitronectin (Hersteller des Antikörpers: Millipore Corporation, USA and Canada) und Osteopontin (Hersteller des Antikörpers: RnD Systems, Germany) ebenfalls mittels Immunhistochemie ermittelt werden, um eine eventuelle Korrelation mit der Integrinexpression feststellen zu können.

## **2. Methodik und Material**

### **2.1 Patientendaten**

#### **2.1.1 Gewebeproben**

In der Studie werden Gewebeproben von 115 Patienten analysiert, die zwischen den Jahren 2000 und 2010 in der Neurochirurgischen Universitätsklinik Tübingen an ausgewählten epithelialen Hirnmetastasen operiert wurden. Die benötigten Paraffinblöcke werden aus den Archiven der Institute für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen entliehen. Zur Betrachtung einer möglichen Korrelation zwischen Integrinexpression und Metastasenlokalisierung werden zusätzlich noch 7 Fälle von Patienten mit spinalen Metastasen analysiert, die jedoch nur für die Auswertung dieser speziellen Fragestellung in die Studie einbezogen werden. Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation liegt bei 59,65 Jahren.

#### **2.1.2 Verteilung der Patientendaten anhand des Geschlechts**

Es wird versucht, eine möglichst ausgewogene Geschlechterverteilung zu erreichen. Dies wird mit einem männlichen Patientenanteil von 56% (n=64) und einem weiblichen Anteil von 44% (n=51) umgesetzt.

Der leicht höhere Anteil des männlichen Geschlechts ist auf eine Verteilung der pulmonalen Hirnmetastasen von 2,5:1 zu Gunsten des männlichen Geschlechts zurückzuführen.

### 2.1.3 Verteilung der Patientendaten anhand der Herkunft

In der Studie wird ein weites Spektrum der möglichen Tumorentitäten erfasst, welches grob der realen Häufigkeitsverteilung in der neuropathologischen Routine entsprechen soll. Mit 50-60% machen pulmonale Metastasen den größten Anteil aller Hirnmetastasen aus, gefolgt von Metastasen aus der Brust (15-20%) und Melanommetastasen (5-10%). Der Rest verteilt sich auf Niere, Prostata und Gastrointestinaltrakt (Johnson et al, 1996). In dieser Studie stammt daher der größte Teil der Filae, nämlich 36%, aus der Lunge, 19% entstammen der Brust, jeweils 10% dem Gastrointestinaltrakt und der Prostata und 8% der Niere. Weitere 10% zählen zu den Cancer of unknown primary (CUP) und die restlichen 7% verteilen sich auf die Ursprungsorgane Hoden, Schilddrüse, Ovar, Nasennebenhöhle und das Urothel und werden im Verlauf der Arbeit als „andere“ zusammengefasst.

| Herkunft              | Anzahl der Fälle | Anteil in Prozent |
|-----------------------|------------------|-------------------|
| Andere                | 8                | 6,96              |
| CUP                   | 11               | 9,57              |
| Gastrointestinaltrakt | 12               | 10,44             |
| Lunge                 | 42               | 36,52             |
| Mamma                 | 22               | 19,13             |
| Niere                 | 9                | 7,83              |
| Prostata              | 11               | 9,57              |

**Tabelle 4: Aufteilung der Patientendaten anhand der Herkunft der Hirnmetastasen**

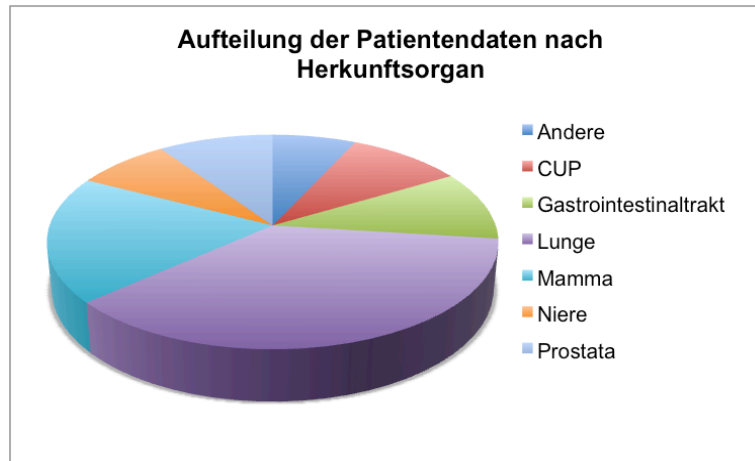


Abbildung 7: Schaubild zur Darstellung der Datenaufteilung nach Herkunftsorgan

#### 2.1.4 Verteilung der Patientendaten anhand der Histologie

Aufgrund der großen Bandbreite an Tumorentitäten ergeben sich auch Unterschiede in der Histopathologie dieser epithelialen Tumore. Den Hauptanteil machen jedoch Adenokarzinome mit 78% (90 Fälle) aus, da diese Histologieform bei Hirnmetastasen von Karzinomen am häufigsten beobachtet wird. Daneben gibt es noch 4% Kleinzeller (5 Fälle), 5% Plattenepithelkarzinome (6 Fälle) und 7% klarzellige Karzinome (8 Fälle). Die verbleibenden 6% werden unter „andere“ zusammengefasst und schließen undifferenzierte, embryonale und urotheliale Karzinome mit ein.

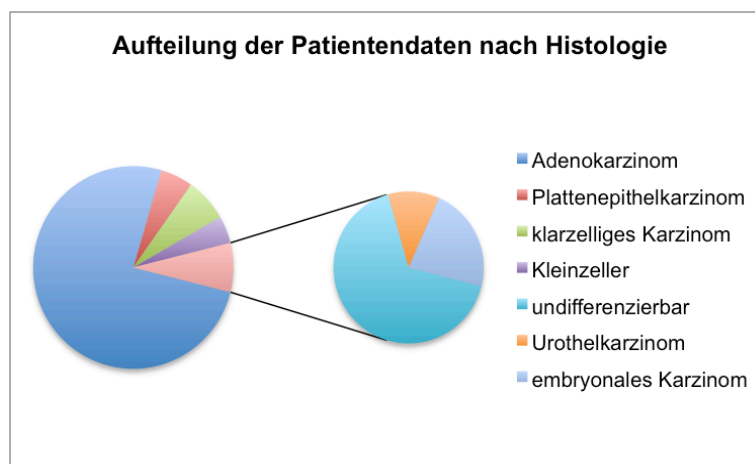


Abbildung 8: Schaubild zur Darstellung der Datenaufteilung nach Histologie. Urothelkarzinome, embryonale und undifferenzierbare Karzinome werden unter andere zusammengefasst.



### 2.1.5 Verteilung der Patientendaten anhand des Differenzierungsgrades

Mit dem Differenzierungsgrad wird angegeben, inwieweit die Tumorzellen morphologisch und funktionell vergleichbaren gesunden Zellen entsprechen. Es werden drei histologische Differenzierungsgrade unterschieden: G1= gut differenziert, G2= mäßig differenziert, G3= gering differenziert. Der Anteil der gut differenzierten Metastasen beträgt 4%, die mäßig differenzierten Metastasen machen 57% der Fälle aus und das Vorkommen der gering differenzierten Metastasen ist mit 39% anzugeben.

| Differenzierungsgrad | Anzahl der Fälle | Anteil in Prozent (%) |
|----------------------|------------------|-----------------------|
| Gut (G1)             | 5                | 4,39                  |
| Mäßig (G2)           | 64               | 56,14                 |
| Wenig (G3)           | 45               | 39,47                 |

**Tabelle 5: Aufteilung der Patientendaten anhand des Differenzierungsgrads**

### 2.1.6 Verteilung der Patientendaten anhand der Lokalisation

Zur Betrachtung der Lokalisation werden noch 7 Fälle mit spinalen Metastasen hinzugezogen, was dann in dieser Fragestellung zu einer abweichenden Fallzahl von 122 Tumoren führt. 63% sind zerebral lokalisiert, 31% zerebellär und 6% spinal.

Von den zerebral gelegenen Metastasen befinden sich 30% frontal, 23% okzipital, 14% parietal, 8% temporal und in 8% der Fälle liegen multiple Herde vor. Für den Rest der zerebral gelegenen Metastasen ist der exakte Metastasierungsart nicht angegeben.

| Lokalisation | Anzahl der Fälle | Anteil in Prozent (%) |
|--------------|------------------|-----------------------|
| Zerebellär   | 38               | 31,15                 |
| Zerebral     | 77               | 63,12                 |
| Spinal       | 7                | 5,74                  |

**Tabelle 6: Aufteilung der Patientendaten anhand der Lokalisation der Metastasen**

### **2.1.7 Hirnmetastasen mit bekanntem Primarius**

In 22 Fällen werden zusätzlich Gewebeproben des Primarius analysiert, um mögliche Unterschiede beziehungsweise Korrelationen zwischen Primärtumor und Metastase festzustellen. Das Materialkollektiv beinhaltet dabei 3 Nierenkarzinome, 6 Mammakarzinome, 4 Lungenkarzinome, 2 Karzinome aus dem Gastrointestinaltrakt, 2 Karzinome aus der Schilddrüse und 4 weitere (ein Urothel, eine Nasennebenhöhle, ein Prostata und ein Ovar). Histologisch lassen sich die Primärtumorfälle in 18 Adenokarzinome, 2 klarzellige Karzinome, ein Plattenepithelkarzinom und ein Urothelkarzinom aufgliedern.

## **2.2 Material**

### **2.2.1 HE-Färbung**

Die HE-Färbung dient als Übersichtsfärbung der ersten Beurteilung der Tumorproben. Folgende Reagenzien wurden zur Herstellung der Hämatoxylin-Eosin-Lösung verwendet:

- Xylol
- 100% Ethanol
- 96% Ethanol
- 70 % Ethanol
- Mayers Hämalaunlösung
- 0,1% wässriges Erythrosin B

### **2.2.2 Immunhistochemie**

Für die Immunhistochemie wurden folgende neu entwickelte Antikörper verwendet (Ausgangskonzentration: 1µg/µl):

αvβ5 Integrin:

- Monoklonaler (Kaninchen Anti-Human) αvβ5 Antikörper  
Klon EM09902\_1b1, Verdünnung 1:800  
Quelle: Merck-Serono, Darmstadt, Germany

αvβ8 Integrin:

- Monoklonaler (Kaninchen Anti-Human) αvβ8 Antikörper  
Klon EM13309\_2b1, Verdünnung 1:1000

Quelle: Merck-Serono, Darmstadt, Germany

$\alpha$ v Integrin:

- Monoklonaler (Kaninchen Anti-Human)  $\alpha$ v Antikörper  
Klon EM01309\_3b1, Verdünnung 1:200  
Quelle: Merck-Serono, Darmstadt, Germany

CytoB3 Integrin:

- Monoklonaler (Kaninchen Anti-Human) CytoB3 Antikörper  
Klon EM00212\_1b1, Verdünnung 1:50  
Quelle: Merck-Serono, Darmstadt, Germany

$\alpha$ v $\beta$ 3 Integrin:

- Monoklonaler (Kaninchen Anti-Human)  $\alpha$ v $\beta$ 3 Antikörper  
Klon EM22703\_1b1, Verdünnung 1:50  
Quelle: Merck-Serono, Darmstadt, Germany

$\alpha$ v $\beta$ 6 Integrin:

- Monoklonaler (Kaninchen Anti-Human)  $\alpha$ v $\beta$ 6 Antikörper  
Klon EM05201\_1b1, Verdünnung 1:1000  
Quelle: Merck-Serono, Darmstadt, Germany

Fibrinogen:

- Monoklonaler (Maus Anti-Human) Fibrinogen Antikörper  
Klon 1F2, Verdünnung 1:1000  
Quelle: AbD Serotec, Düsseldorf, Germany

Osteopontin:

- Monoklonaler (Maus Anti-Human) Osteopontin Antikörper  
Klon 190312  
Quelle: RnD Systems, Germany

Vitronectin:

- Monoklonaler (Maus Anti-Human) Vitronectin Antikörper  
Klon BV2  
Quelle: Millipore Corporation, USA and Canada

Fibronectin:

- Monoklonaler (Maus Anti-Human) Fibronectin Antikörper  
Klon 568, Verdünnung 1:100

Quelle: Novocastra, Newcastle, United Kingdom

IgG:

- IgG1 Isotype control  
Genetex, San Antonio, TX, USA

Da sich bei den Antikörpern gegen Vitronectin und Osteopontin kein brauchbares Färbesignal trotz mehrmaliger Veränderungen der Verdünnung und des Färbeprotokolls erzeugen ließ, konnten diese für die Studie leider nicht etabliert werden.

Für die Immunhistochemie werden folgende Reagenzien benötigt:

- CC1-Puffer: Cell Conditioning Solution; enthält einen Tris-basierten Puffer
- EZ Prep: Entparaffinierungslösung
- LCS: Liquid coverslip Solution
- Amplifier A und B: Signalverstärker für schwach färbende primäre Maus- und Kaninchen-Antikörper
- Blocker A und B: Vermeidung unerwünschter Hintergrundfärbungen durch Bindung an endogenes Biotin
- iView Biotin Ig: Sekundärer biotinylierter Ig Antikörper
- iView Copper : Kupfersulfat
- iView H2O2: 0,04 bis 0,008% Wasserstoffperoxidlösung
- iView Inhibitor: 3% Wasserstoffperoxidlösung
- iView SA-HRP: konjugierte Meerrettichperoxidase
- iView DAB: Diaminobenzidin
- Trypsin

Quelle der Reagenzien: Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA

- Hämatoxylin

Quelle: ThermoShandon, Pittsburgh, USA

- HICO-MIC/Eukitt: Permanentes Mikroskopier-Einschlußmittel

Quelle: Hirtz & Co., Köln

- Protease

Quelle: SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany

## **2.3 Methodik**

### **2.3.1 Herstellung der Schnittpräparate**

Als Standardverfahren in der Pathologie ist die Formalinfixierung etabliert. Sie ermöglicht eine gute Durchdringung und Erhaltung des Gewebes. Durch Formalin kommt es zur Bildung chemischer Quervernetzungen zwischen Proteinen. Alternativ zur Formalinfixierung bietet sich bei empfindlichen Antigenen oder Enzymen die Gefriertechnik an. In dieser Arbeit wurde ausschließlich formalinfixiertes Gewebe verwendet, da die neuen Integrin-Antikörper für diesen Zweck entwickelt wurden.

Das in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe wurde durch ein Mikrotom in 4 µm dünne Scheiben geschnitten. Der Schnitt wird mit einem Pinsel in ein Warmwasserbad übertragen und dadurch geglättet. Schließlich wird er auf einen sauberen und fettfreien Objektträger gebracht, indem man diesen ins Wasserbad hält und den Schnitt in der Mitte des Trägers aufzieht.

### **2.3.2 HE- Färbung**

Um die Epithelform und den Differenzierungsgrad des Tumors sowie die Tumorbelastung im Gewebe zu ermitteln und das zu übertragende Gewebe für den nachfolgenden TMA (siehe unten) auszuwählen, bedarf es einer Übersichtsfärbung. Hierzu dient in der Pathologie die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). Durch zwei unterschiedliche Färbungen, Hämatoxylin und Erythrosin B, lassen sich mikroskopisch unterschiedliche Strukturen darstellen. Basophile Bestandteile der Zelle, z.B. Zellkerne, erscheinen blau und eosinophile, z.B. Cytoplasma, stellen sich rot dar.

Zu Beginn werden die histologischen Schnittpräparate in einer Xylol- und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und mit Aqua dest. gespült.

Dann werden die Schnitte eine Minute in Mayers Hämalaunlösung gefärbt und unter fließendem Leitungswasser 10 Minuten lang gewässert. Nach einer weiteren Spülung in Aqua dest. werden sie in 0,1% wässrigen Erythrosin B

gegengefärbt. In einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol werden sie entwässert und schließlich mit Eukitt eingedeckt.

| Absteigende Alkoholreihe | Aufsteigende Alkoholreihe   |
|--------------------------|-----------------------------|
| 3×10 min Xylol           | Ca. 10 sec. 70% Ethanol     |
| 2×5 min 100% Ethanol     | Ca. 10 sec. 96% Ethanol     |
| 5 min 96% Ethanol        | 2 × ca. 10sec. 100% Ethanol |
| 5 min 70% Ethanol        | 3 × ca. 10 sec. Xylol       |

**Tabelle 7: Ablauf der Entparaffinierung durch eine absteigende Alkoholreihe sowie Ablauf des Wasserentzugs durch eine aufsteigende Alkoholreihe.**

### 2.3.3 TMA

Mit der TMA-Stanze (Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, WI, USA) können Gewebeproben unterschiedlicher Fälle auf einem Block zusammengesetzt werden. Man erreicht dabei mit geringem Materialverbrauch eine große Anzahl an Datensätzen. In dieser Studie werden zunächst die neu erstellten HE-Färbungen von 40 Fällen mikroskopiert und Bereiche mit viel vitalem neoplastischen Epithel markiert. Die Markierung auf dem Objektträger wird auf die gleiche Stelle auf dem dazugehörigen Paraffinblock übertragen. Mit einer runden Stanznadel wird von dem anfangs leeren Akzeptor-Paraffinblock eine im Durchmesser 1000µm breite zylindrische Gewebeprobe herausgestanzt und das gewonnene Paraffin verworfen. Mit einer im Durchmesser nur marginal geringeren Stanze werden nun aus dem untersuchten Donor-Block an den markierten Stellen zwei repräsentative Gewebeproben herausgestanzt und schließlich auf definierte Koordinaten des neuen Paraffinblocks übertragen. Tabellarisch wird die Anordnung der Gewebeproben festgehalten. Nach einer Versiegelung des neu erstellten Paraffinblocks bei 37°C wird dieser mit einem Mikrotom geschnitten (4µm Dicke) und auf SuperFrost Plus slides (Microm International, Walldorf, Germany) für die Immunhistochemie aufbewahrt.

### 2.3.4 Immunhistochemie

#### 1. Theorie der Immunhistochemie

Mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung können antigene Komponenten in Zellen farblich sichtbar gemacht werden. In unserem Fall werden im Kaninchen gewonnene, neu entwickelte spezifische Primärantikörper der Firma Merck gegen die oben genannten Integrin-Subtypen und sowie in der Maus gewonnene, kommerziell erhältliche Primärantikörper gegen die Integrinliganden Fibrinogen und Fibronectin eingesetzt. Diese Antikörper binden mit ihrem Fab-Teil spezifisch an die komplementäre Oberflächenstruktur (Epitop) des Antigens und führen über weitere Schritte zu einer Reaktion eines gekoppelten Farbstoffes, der so sichtbar wird. Es handelt sich also um eine indirekte Nachweismethode. An den konstanten Teil des Primärantikörpers (Fc-Fragment) bindet dabei ein Sekundärantikörper, der mit einem Enzym markiert ist, welches bei Zugabe eines geeigneten Substrats zu der beschriebenen Farbreaktion führt. Ein initial farbloses Chromogen wird so in ein farbiges Enzymprodukt umgewandelt.

Um die Bindung farblich sichtbar zu machen, gibt es mehrere Möglichkeiten. In unserem Fall wird die Avidin-Biotin-Methode verwendet, die die starke Affinität von Avidin/Streptavidin zu Biotin nutzt. Avidin ist ein tetrameres Glykoprotein aus Hühnereiern, das an jedem Monomer eine Bindungsstelle für Biotin aufweist. Der isoelektrische Punkt von Avidin liegt bei  $pI=10$ . Daher neigt es dazu, bei physiologischem pH an negativ geladene Gewebebestandteile zu binden (Boenisch et al, 2006). Biotin (Vitamin B7) ist eine Verbindung aus Harnstoff und einem substituierten Thiophanring und bindet kovalent an den Sekundärantikörper.

Die Avidin-Biotin-Methode erfolgt in drei Schritten: Zuerst wird ein unkonjugierter Primärantikörper dazugegeben, dann ein biotinmarkierter Sekundärantikörper und zuletzt ein Avidin-Biotin-Enzymkomplex. Dabei reagiert der Avidin-Biotin-Enzymkomplex mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (ABC-Methode). Das Enzym des oben genannten Komplexes ist in unserem Fall eine Meerrettichperoxidase. Die Peroxidase besitzt eine eisenhaltige Hämgruppe als aktives Zentrum, welches einen Komplex mit Wasserstoffperoxid bildet. Was-

Wasserstoffperoxid wird bei unserer Methode als Substrat im Überschuss angeboten. Dieser Überschuss führt in Abwesenheit eines Elektronendonors zur Blockierung der endogenen Peroxidase und so zur Verhinderung unerwünschter Signale. In Anwesenheit eines Elektronendonors jedoch entsteht ein Enzym-Substratkomplex, der durch Umsetzung von Wasserstoffperoxid zur Oxidation des Elektronendonors führt. Fehlt der Elektronendorfer, kommt die Reaktion zum Stillstand. Man kann unterschiedliche Elektronendonoren verwenden. Sie werden Chromogen genannt, da sie durch die beschriebene Oxidation in gefärbte Produkte umgewandelt werden. In dieser Arbeit wird als Chromogen das 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Dabei entsteht ein braunes Endprodukt.

Bevor die Antikörper auf das Schnittpräparat gegeben werden, werden sie verdünnt. Dabei ist „der optimale Antikörpertiter als die höchste Verdünnung definiert, mit der unter spezifischen Testbedingungen eine maximale Anfärbung bei geringster Hintergrundanfärbung erzielt wird“ (Boenisch et al, 2006), also einem maximalen „Signal-Rausch-Verhältnis“. Die Verdünnung ist dabei von der Affinität des Antikörpers abhängig. Bei einem höheren Antikörpertiter bedarf es einer kürzeren Inkubationszeit, um ein optimales Ergebnis zu erreichen (Boenisch et al, 2006).



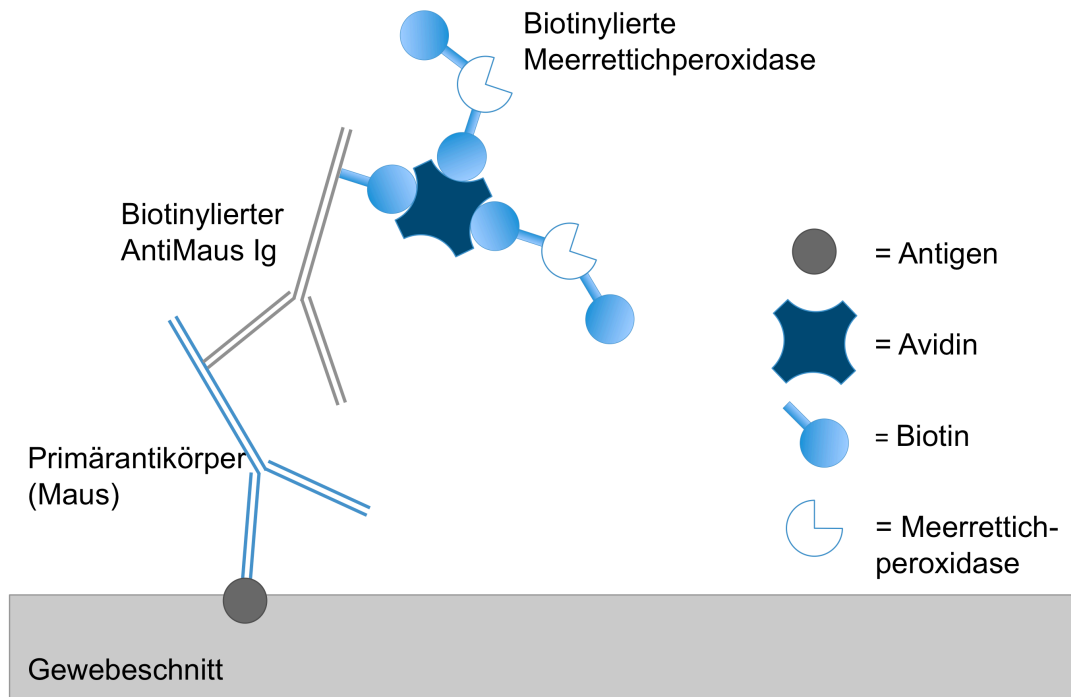


Abbildung 9: Schema der ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Methode

## 2. Ablauf der Immunhistochemie

Gewebevorbereitung:

Zuerst wird das Gewebe bei Hitze entparaffiniert.

Da es durch die Formalinfixierung zu einer bedeutsamen Konformationsveränderung des Epitops kommen kann und damit zu einem Verlust der Immunreaktivität (Maskierung des Antigens/Epitops), ist es notwendig, die formalininduzierten Bindungen entweder durch Hitzevorbehandlung oder Proteasenandauung wieder freizulegen und somit eine Antikörperbindung zu ermöglichen.

Positiv-und Negativkontrollen:

| Antikörper      | Positivkontrolle                          |
|-----------------|---|
| $\alpha\beta 8$ | Glioblastom                               |
| $\alpha\beta 6$ | Karzinom des Gastrointestinaltrakts       |
| $\alpha\beta 5$ | Nierenzellkarzinom/ Gesundes Nierengewebe |

|                 |                                    |
|-----------------|------------------------------------|
| $\alpha\beta 3$ | Gesundes Nierengewebe              |
| $\alpha v$      | Gesundes Darmgewebe                |
| Cyto B3         | Glioblastom/ Gesundes Nierengewebe |
| Fibronectin     | Mammakarzinom                      |
| Fibrinogen      | Mammakarzinom                      |

**Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Positivkontrollen für die Immunhistochemie**

Die Positivkontrollen wurden anhand bekannter Literaturdaten ausgewählt und eingesetzt.

Die negative Reagenzienkontrolle erfolgte einmalig mit einem Immunglobulin Antikörper des gleichen Subtyps in gleicher Konzentration, sowie auf einem zusätzlichen Schnitt durch Ersetzen des Primärantikörpers durch die Pufferlösung, die auch zum Verdünnen der Primärantikörper eingesetzt wird.

Durchführung der immunhistochemischen Färbung:

Das Gewebe wird zuerst bei 75°C 16 Minuten lang entparaffiniert. Dann wird auf 37°C abgekühlt und die endogene Peroxidase mit 3% Wasserstoffperoxid blockiert. Schließlich beginnt die 12-minütige Enzymvorbehandlung mit der Protease 2 beziehungsweise die Hitzevorbehandlung bei 95°C mit dem CC1-Puffer (Tris EDTA-Puffer pH8) für 48 Minuten. In dieser Arbeit erfolgt die Antigendemaskierung des Gewebes für die  $\alpha\beta 5$ -,  $\alpha\beta 8$ - und  $\alpha\beta 3$ -Färbungen mit der Protease 2 und für die Cyto B3-, Fibrinogen- und  $\alpha v$ -Färbungen mit dem Puffer mCC1 („Cell Conditioning solution“) und Hitze (95°C). Bei der immunhistochemischen Fibronectinfärbung wurde das Gewebe 30 Minuten mit Trypsin vorbehandelt. Die Inkubation der Antikörper erfolgt 32 Minuten lang bei 37 °C. Pro Schnitt werden 100  $\mu$ l Antikörperlösung aufgetragen. Danach werden 100  $\mu$ l der Sekundärantikörperlösung aufgetragen. Die Inkubation dauert 16 Minuten bei 37°C. Am Ende erfolgt noch die Inkubation mit dem Tertiärantikörper und dem Chromogen sowie die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für acht Minuten bei 37°C.

Fertigstellung der Schnittpräparate:

Nach Abschluss der Färbeprozedur wird das Öl mit Leitungswasser und Spülmittel von den Schnitten gewaschen und zusätzlich zehn Minuten unter laufendem Leitungswasser gespült. Nach dem Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%, 100%) und einer Behandlung mit Xylol (3 mal 2 Minuten) zur Entziehung des Wassers, werden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt und unter dem Abzug getrocknet.

Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen:

Zur Analyse der Expression der Integrine und ihrer Liganden wird das Färbesignal qualitativ und quantitativ ausgewertet. Die Betrachtung der Schnitte erfolgt mit einem Olympus BX-50 Lichtmikroskop. Dabei beschränkt sich die Beurteilung auf das neoplastische Epithel und die Gefäße. Nekrosen, Hämorrhagien, Stroma und ZNS-Gewebe sind nicht Teil der statistischen Auswertung. Um die Signalintensität und -menge zu objektivieren wird je eine Skala sowohl für die qualitative als auch quantitative Auswertung erstellt, die sich an bereits etablierte Skalen anlehnt (Schittenhelm et al, 2009). Die 38 Fälle des TMA werden zusätzlich noch mit der Software „Definiens Tissue Studio 2.0“ ausgewertet (siehe 2.3.5). Zusätzlich wird separat beurteilt, ob die einliegenden Gefäßendothelien auch ein Färbesignal aufweisen, um eventuell einen Zusammenhang in Bezug auf die Tumorangio-genese festzustellen zu können.

Die verwendeten Skalen für die Auswertung sind wie folgt definiert:

Gefäße:

0= negativ; 1= weniger als 50% der Endothelien positiv; 2= mehr als 50% positiv

Intensitätsscore Tumorzellen:

0=negativ; 1= schwache; 2= moderate; 3= starke Färbung des Gesamtumorgewebes

Mengenscore Tumorzellen:

0= negativ; 1=bis 24%; 2= 25-49%; 3=50-75%; 4= über 75% der Tumorzellen positiv

### **2.3.5 Definiens Tissue Studio Software**

Des Weiteren werden die 38 Fälle des TMA-Schnittes nach Digitalisierung der jeweiligen Immunfärbeschnitte (Mirax Scan, Zeiss) und Übertragung der Daten auf eine Workstation mit der Software „Definiens tissue Studio 2.0“ (Definiens AG, München, Germany) ausgewertet. Das Computerprogramm dient der schnellen und quantitativen Auswertung von Biomarkern. Die Färbeintensität lässt sich dadurch objektiver auswerten und die Ergebnisse können somit auch zur Kontrolle der eher subjektiven und untersucherabhängigen manuellen Auswertung hinzugezogen werden. Nach dem Überspielen der Datenpakete werden die TMA-Schnitte mit der Software „Definiens Tissue Studio 2.0“ bearbeitet. Die Software erkennt in den meisten Fällen automatisch die einzelnen TMA-Stanzen („Cores“) und passt sie an ein vom Benutzer vordefiniertes Koordinatengitter an. Anschließend lässt sich der zu untersuchende Bereich innerhalb der Stanzen als sogenannte ROI („Region of interest“) markieren. Diese ROI enthält nach der Eingrenzung hauptsächlich Tumorgewebe und ist in Bezug auf die Färbeintensität repräsentativ für den gesamten Schnitt zu betrachten. Nun wird ein Analysekonzept erstellt – eine Vorlage, anhand derer der Software an 4 exemplarischen Proben („subsets“) ein Auswertungsstandard beigebracht und die Software so für die nachfolgenden Auswertungen kalibriert wird. Dafür wird zuerst das Chromogen, in diesem Fall DAB, und der gefärbte Zellbereich (hier Zytoplasma) festgelegt. Anschließend werden durch Einstellen von kontrastdefinierten Schwellenwerten Zellkerne und -membranen detektiert. Nun werden anhand der 4 Bereiche Intensitätsspektren festgelegt, die in ihrer Färbeintensität die Bandbreite der unterschiedlichen Signalstärken repräsentieren. Der Software wird dadurch vorgegeben, welche Zellen schließlich als stark/moderat/schwach oder gar nicht gefärbt auszuwerten sind. Die Gewebesausschnitte werden schließlich für jeden Antikörper auf Zell-zu-Zell Ebene detailliert in mehreren Stunden von der Software ausgewertet und liefern einen großen Datensatz an Resultaten für jede TMA-Stanze. Das Programm errech-

net innerhalb der ROI den Anteil der negativen, niedrig, moderat und stark gefärbten Zellen und gibt für jede TMA-Stanze einen Histoscore an, der sich folgendermaßen berechnen lässt:

1 x schwach gefärbte Zellen (%) + 2 x moderat gefärbte Zellen (%) + 3 x stark gefärbte Zellen (%)

Er bezieht sich dabei nur auf die als gefärbt klassifizierten Zellen.

### 2.3.6 Statistik

Die statistische Analyse der manuellen und softwarebasierten Resultate wird mit dem Computerprogramm „JMP“ durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwert und 95%er Konfidenzintervall der jeweiligen Scores präsentiert. Zur Bewertung der Unterschiede, die sich zwischen den einzelnen Gruppen ergeben haben, wird der p-Wert als Maß für die statistische Signifikanz berechnet. Dabei wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant,  $\leq 0,01$  als sehr signifikant und  $\leq 0,001$  als hoch signifikant angesehen. Die paarweisen Vergleiche der kontinuierlich verteilten Daten der computerbasierten Auswertung werden mittels Student's t-Test durchgeführt. Der t-Test zeigt, wie stark sich die Mittelwerte der Gruppe x und y voneinander unterscheiden, normiert durch die gewichtete Varianz (bei großer Varianz weniger aussagekräftig).

Dies wird wie folgt berechnet:

$$t = \sqrt{\frac{nm}{n+m}} \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s}$$

$\bar{x}$ : Mittelwert der Stichprobe x      n: Stichprobenumfang von x  
 $\bar{y}$ : Mittelwert der Stichprobe y      m: Stichprobenumfang von y  
 s: gewichtete Varianz

$$s^2 = \frac{(n-1)_x s_x^2 + (m-1)_y s_y^2}{n+m-2}$$

Um bei den ordinalskalierten Ergebnissen (manuelle Auswertung) einen Zusammenhang zwischen den Häufigkeitsverteilungen annehmen zu können, wird eine Kontingenzanalyse durchgeführt und mit dem Chi-Quadrat-Test auf signifikante Unterschiede hin untersucht. In einem Mosaikplot werden die Häufigkeiten der Kontingenztafeln dargestellt. Beim Vergleich der Ergebnisse

von Primärtumor und Metastase wird Cohens Kappa als statistisches Maß für die Intrarater-Reliabilität verwendet. Dabei werden die Werte nach Landis und Koch folgendermaßen interpretiert:  $<0$  = „schlechte Übereinstimmung“, zwischen 0 und 0,20 = „etwas Übereinstimmung“, 0,21-0,40 = „ausreichende Übereinstimmung“, 0,41-0,60 = „mittelmäßige Übereinstimmung“, 0,61-0,80 = „beachtliche Übereinstimmung“, 0,81-1,00 = „(fast) vollkommene Übereinstimmung“ (Landis und Koch, 1977).

Um die Ergebnisse der manuellen Auswertung mit dem ermittelten Histoscore der digitalen Analyse zu vergleichen, wird noch eine einfache lineare Regressionsanalyse zwischen diesen Datensätzen durchgeführt.

### **3. Ergebnisse**

Im folgenden Abschnitt wird zuerst eine kurze Übersicht über die allgemeinen Färbeergebnisse der manuellen Auswertung geschaffen und in der nächsten Passage ein Vergleich mit den mittels DTS digital evaluierten Daten dargestellt. Des Weiteren werden die Ergebnisse noch in Bezug zu den klinischen Daten Alter und Geschlecht erläutert. Den Hauptteil der Ergebnisdarstellung macht eine ausführliche Abhandlung der einzelnen Integrin-Resultate bezüglich Herkunftsorgan, Histologie, Differenzierungsgrad und Lokalisation aus.

#### **3.1 Allgemeine Färbeergebnisse**

##### **3.1.1 Expressionsmuster**

In allen untersuchten Gewebeproben werden die Integrin-Untereinheiten im Zytoplasma und an der Membran detektiert. Dabei zeigt sich die membranöse Expression bei den Integrinen  $\alpha\beta5$  und  $\alpha\beta6$  stärker ausgeprägt als die cytoplasmatische. Bis auf  $\alpha\beta8$  und zum größten Teil auch  $\alpha\beta6$  besteht bei allen Integrinen eine Beteiligung der Gefäßendothelien. Besonders auszeichnend erweist sich die Gefäßbeteiligung für CytoB3 und  $\alpha\beta3$ , die im eigentlichen Epithel der Karzinome in der Regel keine oder nur eine sehr schwache Präsenz zeigen.

### **3.1.2 Manuelle Auswertung**

#### **Manuelle Auswertung der Färbeintensität**

In der Analyse der 115 Hirnmetastasen lässt sich bezüglich der Intensitätsscores feststellen, dass die  $\alpha$ v- (Mean score: 2,34; 95% CI: 2,19 bis 2,53),  $\alpha$ v $\beta$ 5- (Mean score: 1,66; 95% CI: 1,45 bis 1,86) und  $\alpha$ v $\beta$ 6-Integrinuntereinheiten (Mean score: 1,66; 95% CI: 1,43 bis 1,89) eine stärkere Expressionsintensität aufweisen als  $\alpha$ v $\beta$ 3 (Mean score: 0,69; 95% CI: 0,53 bis 0,84), Fibronectin (Mean score: 0,68; 95% CI: 0,49 bis 0,87), Fibrinogen (Mean score: 0,55; 95% CI: 0,40 bis 0,70),  $\alpha$ v $\beta$ 8 (Mean score: 0,47; 95% CI: 0,34 bis 0,60) und CytoB3 (Mean score: 0,28; 95% CI: 0,14 bis 0,42).

#### **Manuelle Auswertung des positiven Epithelanteils**

Der Anteil der positiven neoplastischen Epithelzellen (Mengenscore) ist in den Integrinen  $\alpha$ v $\beta$ 6 (Mean score: 1,91; 95% CI: 1,61 bis 2,22),  $\alpha$ v $\beta$ 5 (Mean score: 2,10; 95% CI: 1,83 bis 2,36) und  $\alpha$ v (Mean score: 3,32; 95% CI: 3,08 bis 3,56) höher als bei  $\alpha$ v $\beta$ 8 (Mean score: 0,79; 95% CI: 0,56 bis 1,03), CytoB3 (Mean score: 0,28; 95% CI: 0,12 bis 0,44), Fibronectin (Mean score: 0,54; 95% CI: 0,37 bis 0,71), Fibrinogen (Mean score: 0,37; 95% CI: 0,26 bis 0,49) und  $\alpha$ v $\beta$ 3 (Mean score: 1,17; 95% CI: 0,9 bis 1,44).

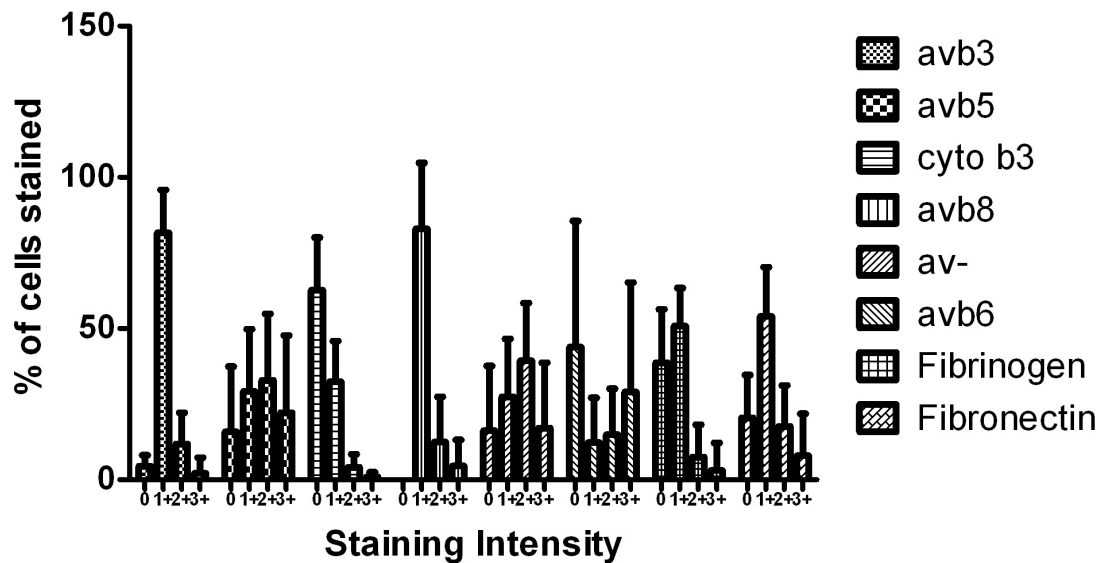


Abbildung 10: Anzahl der positiven Zellen der manuell ausgewerteten 38 Fälle des TMA-Schnittes bezogen auf die Färbeintensität. Selbst bei starker Intensität zeigt oft nur eine kleine Region der neoplastischen Epithelien ein positives Signal.

### Manuelle Auswertung der Tumorgefäße

Bei der Analyse von 113 Karzinometastasen zeigen die immunhistochemischen Färbungen mit farbstoffgekoppelten anti- $\alpha\beta 8$  Antikörpern (Mean score: 0,04; 95% CI: 0 bis 0,1) und anti- $\alpha\beta 6$  Antikörpern (Mean score: 0,19; 95% CI: 0,08 bis 0,29) kaum positive Gefäßendothelien, während Färbungen in den Tumorgefäßen bei CytoB3 (Mean score: 0,93; 95% CI: 0,76 bis 1,1),  $\alpha\beta 5$  (Mean score: 1,32; 95% CI: 1,16 bis 1,48),  $\alpha\text{v}$  (Mean score: 1,65; 95% CI: 1,52 bis 1,78), Fibronectin (Mean score: 1,58; 95% CI: 1,45 bis 1,70), Fibrinogen (Mean score: 1,31; 95% CI: 1,15 bis 1,47) und  $\alpha\beta 3$  (Mean score: 1,52; 95% CI: 1,37 bis 1,66) die Regel sind.

### 3.1.3 Computerbasierte Auswertung

Die Ergebnisse der 38 Fälle des TMA-Schnittes (24 Lunge, 10 Mamma, 3 Gastrointestinaltrakt, 1 Prostata), die mit der Software „Definiens tissue studio“ ermittelt wurden, ergeben den höchsten Histoscore für das Integrin  $\alpha\text{v}$  mit einem mittleren Histoscore von 158,84 (95% CI: 140,46 bis 177,23). Ein ebenfalls sehr hoher mittlerer Histoscore errechnet sich für die Integrine  $\alpha\beta 5$  (Mean score: 150,17; 95% CI: 124,74 bis 175,60) und  $\alpha\beta 6$  (Mean score:



139,73; 95% CI: 104,45 bis 175,01). Ein geringerer mittlerer Histoscore zeigt sich bei  $\alpha\beta 8$  mit einem Wert von 113,36 (95% CI: 98,14 bis 128,57),  $\alpha\beta 3$  (Mean score: 109,97; 95% CI: 102,60 bis 117,35), Fibronectin (Mean score: 109,53; 95% CI: 96,87 bis 122,19) und Fibrinogen (Mean score: 73,07; 95% CI: 62,22 bis 83,92). Der geringste Histoscore liegt bei 39,47 (95% CI: 32,02 bis 46,03) und wird für CytoB3 errechnet. Eine genaue Aufteilung des Intensitätsspektrums ist in der folgenden Tabelle (Tabelle 9) aufgelistet.

|   | $\alpha\beta 8$               | $\alpha\beta 6$                | Cy-<br>toB3                 | $\alpha\beta 5$                | $\alpha\gamma$                 | $\alpha\beta 3$                | Fibro-<br>nectin              | Fibri-<br>nogen             |
|---|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Anteil der stark gefärbten Zellen (%)   | 2,11                          | 30,54                          | 1,15                        | 22,24                          | 16,09                          | 2,23                           | 7,52                          | 2,66                        |
| Anteil der moderat gefärbten Zellen (%) | 5,21                          | 17,5                           | 4,12                        | 30,31                          | 43,19                          | 12,82                          | 18,40                         | 7,86                        |
| Anteil der schwach gefärbten Zellen (%) | 19,14                         | 12,11                          | 29,02                       | 31,49                          | 26,11                          | 80,53                          | 53,34                         | 52,08                       |
| Anteil der negativen Zellen (%)         | 73,52                         | 39,84                          | 65,67                       | 15,97                          | 14,60                          | 4,42                           | 20,74                         | 37,40                       |
| Histoscore (95% CI)                     | 113,4<br>(98,1<br>-<br>128,6) | 139,7<br>(104,5<br>-<br>175,0) | 39,5<br>(32,0<br>-<br>46,0) | 150,2<br>(124,7<br>-<br>175,6) | 158,8<br>(140,5<br>-<br>177,2) | 110,0<br>(102,6<br>-<br>117,4) | 109,5<br>(96,9<br>-<br>122,1) | 73,1<br>(62,2<br>-<br>83,9) |

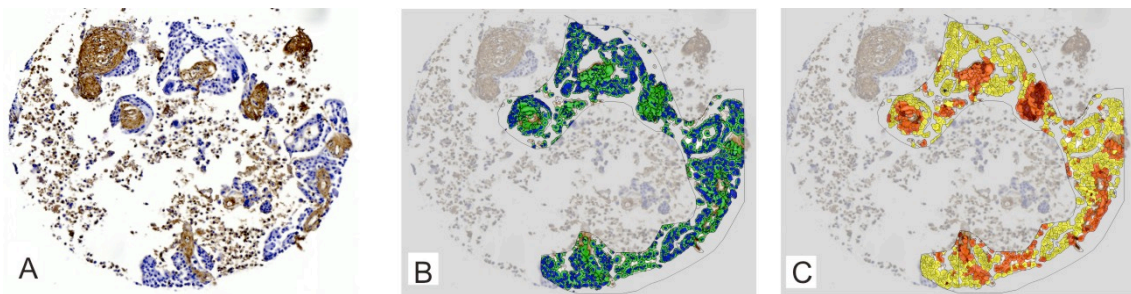
**Tabelle 9: Ergebnisse der digitalen Auswertung: Aufteilung des Intensitätsspektrums in stark, moderat, schwach gefärbte und negative Zellen sowie Angabe des Histoscores**

### **3.2 Korrelationsanalyse der manuell ausgewerteten und computerbasierten Ergebnisse**

Um zu evaluieren, ob die manuell anhand der dreigliedrigen Intensitätsscores ermittelten Werte den zusammengefassten Ergebnissen von „Definiens tissue studio workstation“ (DTS) entsprechen, wurde eine lineare Korrelationsanalyse beider Daten durchgeführt. Dabei wurde der Mean score der manuellen Auswertung mit dem Histoscore der computerbasierten Auswertung verglichen.

Es zeigte sich eine signifikante (in den meisten Fällen sogar hochsignifikante) Korrelation für  $\alpha\beta6$  ( $p < 0,0001$ ),  $\alpha\beta8$  ( $p = 0,0006$ ),  $\alpha\beta3$  ( $p = 0,0434$ ),  $\alpha\beta5$  ( $p < 0,0001$ ),  $\alpha v$  ( $p < 0,0001$ ), Cyto B3 ( $p = 0,0153$ ) und Fibrinogen ( $p < 0,0001$ ).

Bei der Auswertung des Signals für Fibronectin lässt sich keine signifikante Korrelation beobachten ( $p = 0,3640$ ). Dies ist auf eine sehr starke Intensität der Fibronectinexpression in bindegewebigen Zellen, vor allem Fibroblasten, und Gefäßendothelzellen zurückzuführen, die selbst durch Markierung einer ROI nicht komplett von der Computerkalkulation ausgeschlossen werden konnten und somit das Ergebnis für diesen Integrinliganden beeinflusst haben.

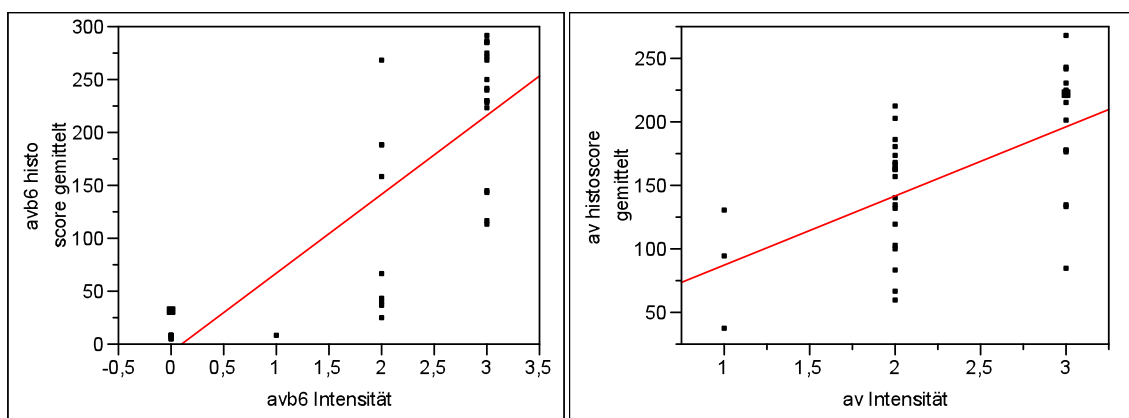


**Abbildung 11: Digitale Auswertung der Färbungen mit dem Definiens Tissue Studio**

**A: Digitalisierte TMA-Stanze mit Fibronectin-Originalfärbung.**

**B: Für die Software markierte ROI, bei der die nekrotischen Areale nicht berücksichtigt werden (ausgegraut).**

**C: Analysresultate auf Zellebene: gelb: schwache Intensität; orange: moderate Intensität; rot: starke Intensität. Hier zeigt sich, dass stark gefärbte Bindegewebszellen fälschlicherweise mit detektiert wurden.**



**Abbildung 12: hochsignifikante Korrelation zwischen manueller Färbeintensitätsbestimmung und digitaler Auswertung (Histoscore) am Beispiel von  $\alpha\beta6$  und  $\alpha v$**

### 3.3 Korrelation der Ergebnisse mit dem Alter und Geschlecht

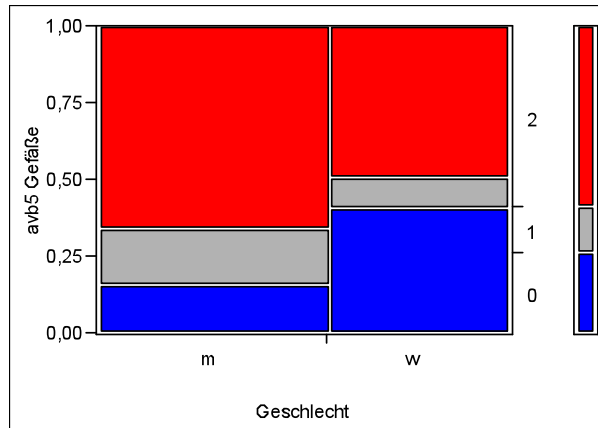
Das männliche Geschlecht zeigt für  $\alpha_v$ ,  $\alpha_v\beta_3$ , Fibronectin und Fibrinogen eine etwas höhere Expressionsintensität, wohingegen die Integrine  $\alpha_v\beta_6$  und  $\alpha_v\beta_5$  stärker und häufiger bei den Fällen des weiblichen Geschlechts exprimiert werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ergibt sich nur bei der  $\alpha_v$ -Untereinheit. Im Vergleich der Intensitäten ergibt sich ein p-Wert von 0,0375 und bei der Gegenüberstellung der  $\alpha_v$ -Expression im Gefäßendothel ergibt sich ein p-Wert von 0,032. Es werden folgende Mittelwerte für  $\alpha_v$  ermittelt:

|                       | Männliches Geschlecht        | Weibliches Geschlecht        | p-Wert |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|--------|
| Mean score Intensität | 2,28 (95% CI: 2,01 bis 2,55) | 2,37 (95% CI: 2,15 bis 2,60) | 0,0375 |
| Mean score Menge      | 3,19 (95% CI: 2,81 bis 3,56) | 3,49 (95% CI: 3,22 bis 3,76) | 0,056  |
| Mean score Gefäße     | 1,52 (95% CI: 1,32 bis 1,71) | 1,82 (95% CI: 1,66 bis 1,98) | 0,032  |

**Tabelle 10: Färbeergebnisse für  $\alpha_v$ . Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht in der Intensitäts- und Gefäßendothelanalyse.**

Für die restlichen Integrine beziehungsweise Integrinliganden zeigen sich im Tumorparenchym keine statistisch relevanten Unterschiede sowohl in der Intensitäts- als auch in der Mengenanalyse (p-Werte für den Geschlechtervergleich der manuellen Auswertung für alle Integrine und Integrinliganden siehe Anhang I.1).

Bei der Auswertung der Gefäße wird bei  $\alpha_v\beta_5$  eine signifikant unterschiedlich starke Gefäßexpression ermittelt ( $p= 0,0096$ ), bei der die Expression in Tumoren des männlichen Geschlechtes (Mean score: 1,5; 95% CI: 1,31 bis 1,69) deutlich höher als beim weiblichen Geschlecht ausfällt (Mean score: 1,08; 95% CI: 0,81 bis 1,36). Bei allen anderen Integrinen zeigt sich kein Unterschied in der Gefäßexpression (p-Werte im Anhang unter I.1).



**Abbildung 13: Graphische Darstellung der Kontingenztabelle, die den Unterschied der  $\alpha v\beta 5$ -Expression im Gefäßendothel ( $p= 0,0096$ ) bezogen auf das Geschlecht demonstriert (0: keine Expression, 1: schwache Expression 2: moderate Expression, m: männlich, w: weiblich).**

Mit zunehmendem Alter der Probanden lässt sich ein Abfall der Färbeintensität von  $\alpha v\beta 8$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha v\beta 3$  und  $\alpha v\beta 6$  feststellen. Bei CytoB3 zeigt sich eine leichte Zunahme der Färbeintensität. Die Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant. Auch bezüglich des Mengenscores ergeben sich keine signifikanten Werte. Die Gefäß-Expressionswerte von  $\alpha v$ , Fibronectin und Fibrinogen erweisen sich bezüglich des Alters konstant.

### 3.4 $\alpha v\beta 8$

#### 3.4.1 Expressionsmuster und Färbesignal

$\alpha v\beta 8$ -Integrine zeigen in dem untersuchten, nicht hirneigenen Tumorparenchym nur eine geringe cytoplasmatische und membranständige Expression. In der manuell ausgewerteten Analyse ergibt sich ein arithmetisches Mittel der Intensitätsstärke von 0,49 (95% CI: 0,34 bis 0,56) und ein Median von 0. Nach Einteilung in Expressionsklassen sind 76 Fälle (66,09%)  $\alpha v\beta 8$  negativ, 24 (20,87%) schwach, 14 (12,17%) moderat und nur ein Fall (0,87%) stark gefärbt. Die moderat und stark gefärbten Fälle werden im Verlauf noch detaillierter aufgeführt. Die Mengenanalyse ergibt in 11 Fällen (9,57%) eine Färbung der Tumorzellen zu 0-24%, in 10 Fällen (8,70%) zu 25-49% , in 11 Fällen (9,57%)

zu 50-75% und in nur 8 Fällen (6,97%) sind mehr als 75% des Tumorparenchyms gefärbt.

Gefäßendothelien und Zellen des Stromas sowie bindegewebige Septen sind stets  $\alpha\beta 8$  negativ. Dagegen weist das angrenzende ZNS-Gewebe, sofern auf den Proben mit angetroffen, eine hiervon sehr stark kontrastierende deutliche  $\alpha\beta 8$ -Färbung auf, die jedoch nicht mit in die Bewertung einbezogen wurde.

### **3.4.2 Vergleich Primärtumor und Metastase**

Bei den Ursprungskarzinomen (22 Fälle) ist das  $\alpha\beta 8$ -Signal zu 81,82% (18/22 Fälle) negativ, wohingegen das metastasierte Karzinomepithel nur zu 54,55% (12/22 Fälle) ein negatives Signal aufweist. Die zerebralen Metastasen scheinen  $\alpha\beta 8$  also etwas häufiger zu exprimieren. Vergleicht man die intervallskalierten Intensitätsscores der Primärtumore mit denen der zerebralen Filiae, ergibt sich ein Korrelationskoeffizient nach Pearson von 0,31. Der oben genannte Unterschied ist statistisch also nicht signifikant. In 12 Fällen liegt eine Übereinstimmung zwischen der  $\alpha\beta 8$ -Intensität des Primärtumors und der Signalstärke der Metastase vor. Der hierfür ermittelte Kappa-Wert von 0,13 zeigt, dass diese Übereinstimmungen eher als Zufallserscheinung und nicht als realistische lineare Abhängigkeit zu werten sind, entsprechend einer sehr geringen Übereinstimmung (Landis & Koch, 1977).

### **3.4.3 Korrelation mit der Tumorentität**

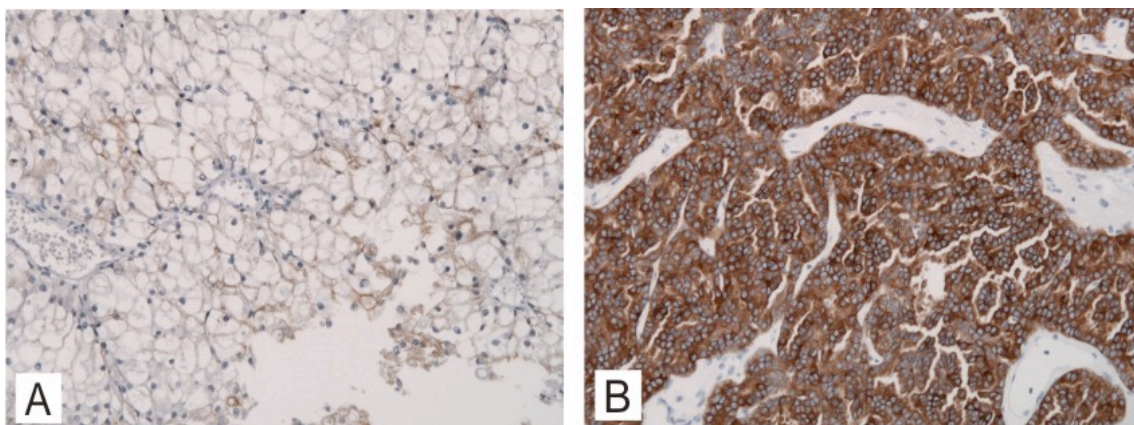
Bei der Analyse der unterschiedlichen Tumorentitäten wird zunächst die Auswertung der computerbasierten Kalkulation dargelegt. Der TMA, der mit DTS evaluiert wird, enthält Karzinome 3 verschiedener Ursprungsorgane: Lunge (24 Fälle), Mamma (10 Fälle) und Gastrointestinaltrakt (3 Fälle).

Bei den aus der Brust stammenden Metastasen ergibt sich für  $\alpha\beta 8$  innerhalb der 3 Karzinomentitäten der höchste mittlere Histoscore mit einem Wert von 135,25. Der mittlere Anteil der negativen Zellen pro Tumor liegt bei 58,63%, die schwach gefärbten Zellen machen 28,13% aus, die moderat gefärbten 8,9% und die stark gefärbten 4,31%. Der mittlere Histoscore der pulmonalen Hirnmetastasen liegt bei 109,29, der Anteil der negativen Zellen bei 82,4% (schwach: 13,37%, moderat: 3,25%, stark: 0,98%). Bei den 3 Fällen aus dem Gastroin-

testinaltrakt ergibt sich ein vergleichsweise niedriger Histoscore von nur 75 und ein Anteil der negativen Zellen von 90,84% (schwach: 7,06%, moderat: 1,92%, stark: 0,19%). Bei dem statistischen Vergleich der unterschiedlichen Entitäten für die einzelnen prozentualen Verteilungen ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

Bei den 115 manuell ausgewerteten Fällen zeigt sich sowohl die stärkste Signalintensität (Mean score: 0,89; 95% CI: 0,08 bis 1,7) als auch die größte Anzahl der gefärbten Zellen (Mean score: 1,56; 95% CI: 0,33 bis 2,78) bei den Metastasen aus der Niere. Auffällig ist dabei, dass das papilläre Nierenkarzinom (2 Fälle) im Gegensatz zu den klarzelligen Karzinomen (7 Fälle) stark beziehungsweise moderat gefärbt ist und folglich für den höheren Mean score verantwortlich ist.

Besonders schwach gefärbt zeigen sich Metastasen aus der Prostata (Intensität: Mean score: 0,09; 95% CI: 0 bis 0,29; Menge: Mean score: 0,36; 95% CI: 0 bis 1,17) und dem Gastrointestinaltrakt (Intensität: Mean score: 0,17; 95% CI: 0 bis 0,64; Menge: Mean score: 0,25; 95% CI: 0 bis 0,64). Die Korrelationsanalyse der manuellen Auswertung in den paarweisen Vergleichen der einzelnen Herkunftstumoren ergibt mittels Pearsons's chi square keine signifikanten Unterschiede (p-Werte der manuellen Auswertung siehe Anhang I.2, p-Werte der digitalen Auswertung siehe Anhang II.1).



**Abbildung 14: Exemplarisches immunhistochemische Färbemuster für  $\alpha v\beta 8$  in 20facher Vergrößerung:**

**A: schwach gefärbtes klarzelliges Nierenkarzinom (score 1)**

**B: stark gefärbtes papilläres Nierenkarzinom (score 3. Beachte die Aussparung der Gefäße)**

### 3.4.4 Korrelation mit der Tumorhistologie

Sowohl in der manuellen als auch in der computerbasierten Auswertung nach Stratifizierung der Tumore anhand ihrer Histologie zeigt sich in den Vergleichen der einzelnen Mean scores der Intensitätsanalyse kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Es ergeben sich für die Signalintensität folgende Ergebnisse:

| Histologischer Typ     | Anzahl der Fälle (n) | Manuell: Intensität Mean score (95% CI) | Manuell: Menge Mean score (95% CI) | Computerbasiert: mittlerer Histoscore (95% CI) |
|------------------------|----------------------|---|------------------------------------|--|
| Plattenepithelkarzinom | 6                    | 0,67<br>(0 - 1,75)                      | 0,83<br>(0 - 2,51)                 | 107,0<br>(68,88 - 145,12)                      |
| Adenokarzinome         | 87                   | 0,47<br>(0,31 - 0,63)                   | 0,76<br>(0,49 - 1,03)              | 125,15<br>(112,57 - 137,74)                    |
| Klarzellige Karzinome  | 8                    | 0,38<br>(0 - 0,81)                      | 0,86<br>(0 - 1,92)                 | Keine Datensätze                               |
| Kleinzeller            | 5                    | 0,2<br>(0 - 0,76)                       | 0,40<br>(0 - 1,51)                 | 100,5<br>(94,12 - 106,85)                      |

**Tabelle 11:** Dargestellt ist die Expression des Integrins  $\alpha v\beta 8$  in unterschiedlichen Histologieformen anhand der manuellen Intensitäts- und Mengenauswertung sowie der digitalen Analyse (klarzellige Karzinome waren auf dem TMA nicht vorhanden).

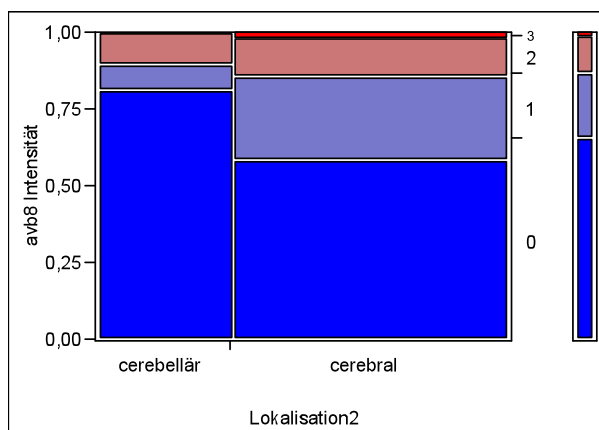
Auch in der Mengenanalyse zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen histologischen Gruppen (siehe Anhang I.3 und II.2).

Es lassen sich also nur geringe Expressionsunterschiede sowohl für die Intensität als auch die Menge der Tumorzellen feststellen, sodass sich als Ergebnis eine Unabhängigkeit der  $\alpha v\beta 8$ -Expression von der Tumorhistologie festhalten lässt.

### 3.4.5 Korrelation mit der Metastasenlokalisierung

Um herauszufinden, ob die weitere Lokalisation im ZNS eine Rolle für die Integrinexpression spielt, wird das vorliegende Material noch in 77 zerebrale und 38 zerebelläre Fälle aufgeteilt. Zusätzlich werden für diese Analyse noch 7 Fälle mit spinalen Metastasen hinzugezogen. Dabei zeigt sich die höchste

Intensität von  $\alpha\beta 8$  in den Metastasen, die in den Großhirnhemisphären zu lokalisieren sind. Bei den zerebellären Metastasen (38 Fälle) ergibt sich ein Mean score von 0,29 (95% CI: 0,07 bis 0,50), bei den zerebralen Metastasen (77 Fälle) von 0,57 (95% CI: 0,40 bis 0,75) und bei den spinalen Metastasen (7Fälle) von 0,29 (95% CI: 0 bis 0,74). In der Korrelationsanalyse zeigt sich eine statistische Signifikanz zwischen der  $\alpha\beta 8$ -Expressionsstärke von Metastasen im Großhirn und der Intensität im Kleinhirn ( $p=0,0388$ ), wobei die zerebralen Metastasen eine stärkere Intensität aufweisen. In der Mengenanalyse ergibt sich zwischen diesen beiden Lokalisationen ein p-Wert von 0,0595. Der Mean score bei Kleinhirnmetastasen beträgt 0,5 (95% CI: 0,1 bis 0,9) und bei zerebralen Metastasen 0,94 (95% CI: 0,64 bis 1,23). Hinsichtlich supra- und infratentorieller Lokalisation der Metastasen besteht also ein Unterschied in der  $\alpha\beta 8$ -Expression bei stärkerer Ausprägung in zerebralen Metastasen. Die weiteren p-Werte des paarweisen Vergleichs der manuellen Auswertung sind im Anhang unter I.4 aufgeführt.



**Abbildung 15: Vergleich der Intensitäten zwischen zerebellären und zerebralen Metastasen ( $p=0,0388$ ) dargestellt in einem Mosaikplot**

### 3.4.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad

Die Annahme, dass sich die Integrinexpression im Laufe der Tumorprogression verändert, lässt sich unter anderem durch den Vergleich der unterschiedlichen Differenzierungsgrade der Tumore untersuchen. Die vorliegenden Metastasen werden daher histologisch in 5 gut differenzierte, 65 mäßig differenzierte und 45 entdifferenzierte Gewebeproben unterteilt. Die gut differenzierten Tumore zeigen die höchste  $\alpha\beta 8$  Intensität mit einem Mean Score von 0,6 (95% CI: 0



bis 1,7), danach folgen die wenig differenzierten (Mean Score: 0,53; 95% CI: 0,3152 bis 0,7515) und die geringste Intensität weisen die mäßig differenzierten Tumore auf (Mean Score: 0,43; 95% CI: 0,2451 bis 0,6165). Der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ist statistisch nicht signifikant und es lässt sich für  $\alpha\beta 8$  auch keine deutliche Tendenz in die eine oder andere Richtung erkennen. Die p-Werte des paarweisen Vergleichs der manuellen Auswertung sind im Anhang unter I.5 aufgeführt.

### **3.5 $\alpha\beta 6$**

#### **3.5.1 Expressionsmuster und Färbesignal**

$\alpha\beta 6$  zeigt im Gegensatz zu  $\alpha\beta 8$  keine Expression im normalen ZNS-Gewebe, dafür jedoch eine stark imponierende Expression in den Tumorzellen. Auch Hämorrhagien zeigen ein positives Signal. Das Bindegewebe hingegen erweist sich als  $\alpha\beta 6$ -negativ. Bei der Analyse der manuellen Auswertung ergibt sich in 40 Fällen (34,78%) eine starke, in 28 Fällen (24,35%) eine moderate, in 8 Fällen (6,96%) eine schwache Färbeintensität und in 39 Fällen (33,91%) ist kein Färbesignal erkennbar. Der Mean score liegt bei 1,66 (95% CI: 1,43-1,89) und der Median bei 2. Das Gefäßendothel erweist sich in 89% der Fälle negativ. Bei der Mengenverteilung zeigt sich das neoplastische Epithel in 40,79% der positiven Fälle zu 75-100% gefärbt (score=4), was für eine überwiegend kräftige  $\alpha\beta 6$ -Expression in Karzinomen spricht.

#### **3.5.2 Vergleich Primärtumor und Metastase**

Unter den Ursprungstumoren ergibt sich eine mittlere Intensität von 2,27 (95% CI: 1,91 bis 2,64) und eine Aufteilung der Fälle in 10 stark gefärbte (45,45%), 9 moderat gefärbte (40,91%), 2 schwach gefärbte (9,09%) und einen negativen Fall. Bei den Metastasen liegt ein im Vergleich zum Primärtumor geringerer ausfallender Mean score von 1,68 (95% CI: 1,11 bis 2,25) vor. Dieser Unterschied erweist sich in der statistischen Analyse jedoch als nicht signifikant (Korrelationskoeffizient Pearson Chi-quadrat  $p=0,78$ ). Wie auch bei  $\alpha\beta 8$ , lässt sich sagen, dass die Integrinexpression des Primärtumors sowohl qualitativ als auch quantitativ nicht in direktem Zusammenhang mit der  $\alpha\beta 6$ -Expression in

der zugehörigen Hirnmetastase steht, denn in den paarweisen Vergleichen der Metastasen mit ihren Primärtumoren liegen teils höhere, aber auch teilweise geringere Intensitäten vor. Sowohl im Mengen- als auch im Intensitätsvergleich zwischen Primärtumor und Metastase finden sich nur 6 Übereinstimmungen bei einem Kappa-Wert von 0,104326 bzw. -0,03226 entsprechend einer schlechten Übereinstimmung nach Landis und Koch (Landis und Koch, 1977).

### 3.5.3 Korrelation mit der Tumorentität

In der manuellen Auswertung ergeben sich folgende Mittelwerte:

| Tumorentität          | Anzahl der Fälle (n) | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) |
|-----------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Gastrointestinaltrakt | 11                   | 2,17<br>(1,57 - 2,76)          | 2,50<br>(1,58 - 3,42)     |
| CUP                   | 11                   | 2,09<br>(1,33 - 2,85)          | 2,91<br>(1,89 - 3,33)     |
| Lunge                 | 42                   | 1,83<br>(1,44 - 2,23)          | 2,33<br>(1,83 - 2,84)     |
| Mamma                 | 22                   | 1,86<br>(1,3 - 2,43)           | 1,95<br>(1,24 - 2,67)     |
| Niere                 | 9                    | 0,44<br>(0 - 1,0)              | 0,67<br>(0 - 1,68)        |
| Prostata              | 11                   | 0                              | 0                         |

**Tabelle 12: Darstellung der Mittelwerte der Intensitäts- und Mengenanalyse für das Integrin  $\alpha v \beta 6$  unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Ursprungsorgane**

Die unterschiedlichen Tumorentitäten lassen sich in 4 moderat bis stark gefärbte und 2 sehr schwach gefärbte Entitäten aufteilen. Zu den eher stark gefärbten zählen CUP-Tumore, der Gastrointestinaltrakt, die Lunge und die Brust. Im Gegensatz dazu stehen die schwach gefärbten Fälle aus der Niere und die negativen Fälle aus der Prostata. Dadurch ergeben sich in den direkten Vergleichen der einzelnen Herkunftlokalisationen folgende signifikante beziehungsweise sehr signifikante Werte (nicht signifikante p-Werte des paarweisen Vergleiches sind im Anhang unter I.2 für die manuelle Auswertung und unter II.1 für die digitale Auswertung aufgeführt).

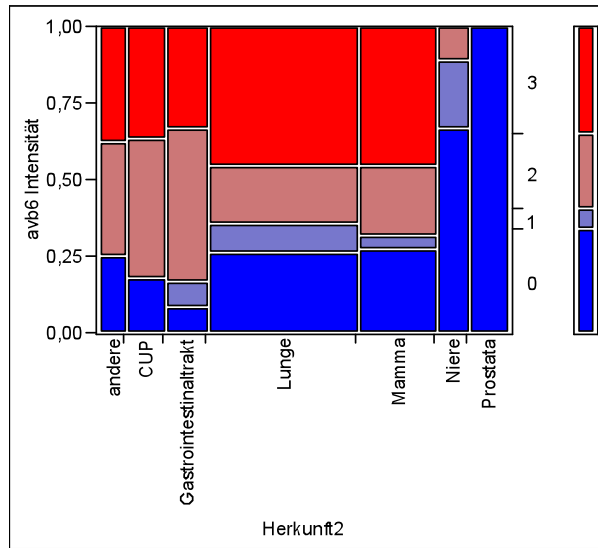
| Tumorentitäten                     | Mengenanalyse:<br>p-Wert | Intensitätsanalyse:<br>p-Wert |
|------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Gastrointestinaltrakt-<br>Prostata | 0,0007                   | 0,0002                        |
| CUP- Prostata                      | 0,0005                   | 0,0005                        |
| Mamma- Prostata                    | 0,0027                   | 0,001                         |
| Lunge- Prostata                    | 0,0006                   | 0,0002                        |
| Gastrointestinaltrakt- Niere       | (0,0533)                 | 0,0099                        |
| CUP-Niere                          | 0,0143                   | 0,0134                        |
| Mamma- Niere                       | n.s.                     | 0,0272                        |
| Lunge- Niere                       | 0,0215                   | 0,0229                        |

**Tabelle 13: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Herkunft sowohl für die Menge der gefärbten Tumorzellen als auch für die Färbeintensität (n.s.= nicht signifikant)**

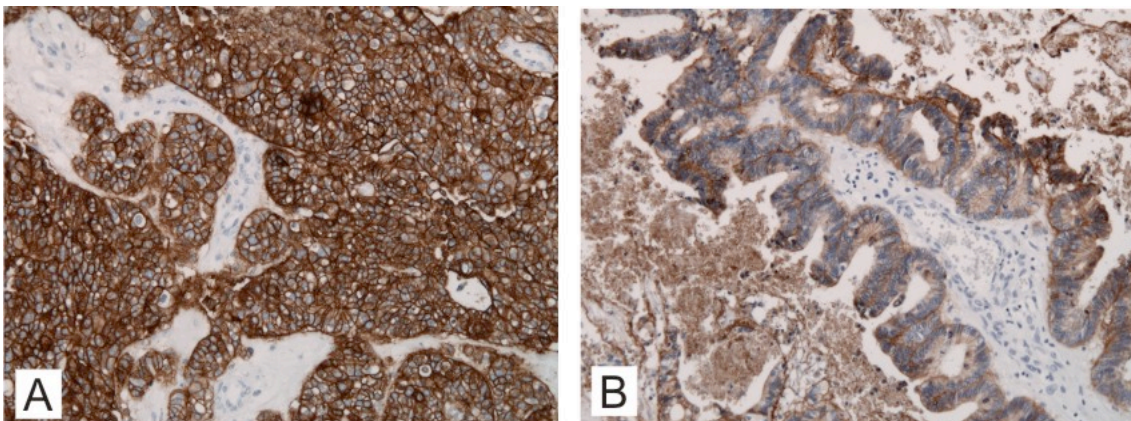
$\alpha\beta6$  wird also von den Epithelzellen des Nierenkarzinomgewebes nur sehr schwach und denen der Prostatakarzinome gar nicht exprimiert.

Bei der Analyse mit DTS werden nur Metastasen aus dem Gastrointestinaltrakt, der Lunge und der Mamma evaluiert. Es ergeben sich folgende gemittelte Histoscores: Lunge: 156,07; Mamma: 119,84; Gastrointestinaltrakt: 101,5.

Zwischen diesen gemittelten Histoscores zeigt sich im direkten Vergleich der einzelnen Tumorentäten – wie auch in der manuellen Auswertung – kein signifikanter Unterschied.



**Abbildung 16: Mosaikplot der Kontingenztabelle der Avb6 Intensität (manuelle Auswertung) in Bezug auf die Metastasenherkunft. Score 0: negative Zellen (blau), score 1: schwache Expression (violett), score 2: moderate Expression (rosa), score 3: starke Expression (rot)**



**Abbildung 17: Immunhistochemie  $\alpha\text{v}\beta 6$  in 20facher Vergrößerung  
 A: Metastase aus dem Gastrointestinaltrakt Intensitätsscore 3 und  
 B: Metastase aus der Mamma Intensitätsscore 2 des Epithels**

### 3.5.4 Korrelation mit der Tumorhistologie

Unter den 38 auf dem TMA untergebrachten Fällen werden die Daten der 27 Adenokarzinome, 2 Kleinzeller und 2 Plattenepithelkarzinome analysiert. Der gemittelte Histoscore der Adenokarzinome beträgt dabei 146,37 (95% CI: 102 bis 190,8) bei einer Intensitätsaufteilung von 32,41% stark, 12,72% schwach, 18,74% moderat gefärbten und 36,16% negativen Zellen. Bei den Kleinzellern zeigt sich ein Histoscore von 134,5 (34,58% stark, 13,59% moderat, 3,3% schwach, 48,56% negativ). Bei den Plattenepithelkarzinomen hingegen wird mit

einem Histoscore von nur 13 (95% CI: 0 bis 51,1) am wenigsten Signal erkannt (0,02% stark, 10,32% schwach, 1,21% moderat gefärbte und 88,46% negative Zellen).

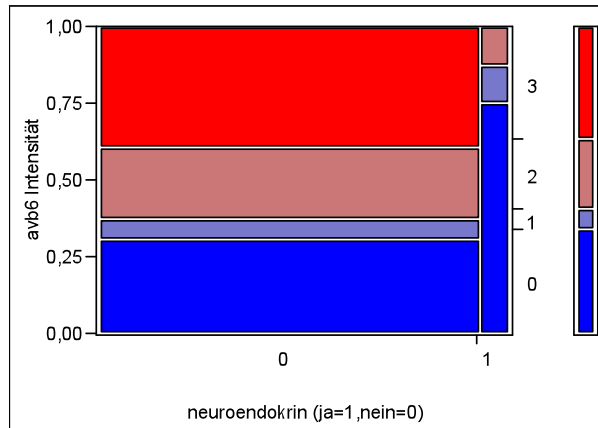
Durch die hohe Streubreite der Resultate kann jedoch keine statistische Signifikanz bei der computerbasierten Auswertung zwischen den einzelnen histologischen Tumortypen gezeigt werden.

Auch bei den 115 Fällen der manuellen Auswertung zeigen die Adenokarzinome die höchste Intensität, die niedrigste Intensität errechnet sich bei den klarzelligen Karzinomen. Dieser Unterschied ist hier aufgrund höherer Fallzahlen in beiden Gruppen statistisch hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Bei Betrachtung der Expressionsmenge ergibt sich zwischen den klarzelligen Karzinomen und Adenokarzinomen ein signifikanter Unterschied von  $p = 0,0161$ .

| Histologischer Typ     | Anzahl der Fälle | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | Gefäße Mean score (95% CI) |
|------------------------|------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Adenokarzinom          | 87*              | 1,89<br>(1,59 bis 2,13)        | 2,18<br>(1,84 bis 2,53)   | 0,24<br>(0,1 bis 0,37)     |
| Plattenepithelkarzinom | 6                | 1<br>(0 bis 2,15)              | 1,83<br>(0,15 bis 3,51)   | 0                          |
| Kleinzeller            | 5                | 0,8<br>(0 bis 2,4)             | 1,0<br>(0 bis 3,15)       | 0                          |
| Klarzelliges Karzinom  | 8                | 0,38<br>(0 bis 0,81)           | 0,38<br>(0 bis 0,81)      | 0                          |

**Tabelle 14: Darstellung der Mittelwerte der manuellen Auswertung für  $\alpha v\beta 6$  in Intensitäts- und Mengenanalyse der Tumorzellen, sowie im Endothel der Gefäße nach Histologie (\*Gefäßauswertung: 85 Fälle)**

Des Weiteren lässt sich bei den  $\alpha v\beta 6$ -Integrinen ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 0,0423$ ) in der Signalintensität zwischen den neuroendokrinen und den nicht neuroendokrinen Metastasen erkennen. Bei den neuroendokrinen Metastasen (8 Fälle) ergibt sich ein Mean score von 0,38 (95% CI: 0 bis 1,0) und bei den nicht neuroendokrinen Metastasen liegt der Mittelwert bei 1,71 (95% CI: 1,47 bis 1,95).



**Abbildung 18: Vergleich neuroendokrine und nicht neuroendokrine Metastasen bezogen auf die  $\alpha\beta 6$ -Intensität (manuelle Auswertung)**

### 3.5.5 Korrelation mit der Metastasenlokalisierung

Die Lokalisation der Metastase im ZNS-Gewebe scheint für die  $\alpha\beta 6$ -Expression keine Rolle zu spielen. Sowohl in der Intensitäts- als auch in der Mengenanalyse resultieren keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 15). Die höchste Intensität weisen die spinalen Metastasen auf, danach folgen die zerebralen Metastasen und die geringste Intensität zeigen die zerebellären Metastasen.

|            | Mengenanalyse:<br>Mean score (95% CI) | Intensitätsanalyse:<br>Mean score (95% CI) |
|------------|---------------------------------------|--|
| Zerebral   | 1,95<br>(1,57 - 2,33)                 | 1,64<br>(1,34 - 1,93)                      |
| Zerebellär | 1,84<br>(1,29 - 2,39)                 | 1,58<br>(1,15 - 2,01)                      |
| spinal     | 2,71<br>(1,23 - 4)                    | 2,29<br>(1,26 - 2,31)                      |

**Tabelle 15: Darstellung der Resultate der Mengen- und Intensitätsanalyse des Integrins  $\alpha\beta 6$  bei Betrachtung der Metastasenlokalisierung**

### 3.5.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad

Analog zu  $\alpha\beta 8$  zeigen die gut differenzierten Tumore die höchste Intensität für  $\alpha\beta 6$  mit einem Mean score von 2,0 (95% CI: 1,22 bis 2,88). Danach folgen die wenig differenzierten mit einem Mean score von 1,96 (95% CI: 1,57 bis 2,34) und die geringste Intensität weisen die mäßig differenzierten Metastasen mit einem Mean score von 1,35 (95% CI: 1,04 bis 1,67) auf. In der Kontingenztafel-

le ergibt sich in der Intensitätsanalyse zwischen den drei Differenzierungsgraden eine geringe statistische Signifikanz von  $p=0,0453$  und in der Mengenanalyse ein  $p$ -Wert von  $0,0154$ . Eine Tendenz von „gut in Richtung wenig“ oder umgekehrt lässt sich jedoch für  $\alpha\beta6$ , wie auch bei  $\alpha\beta8$ , nicht erkennen.

## **3.6 $\alpha\beta3$**

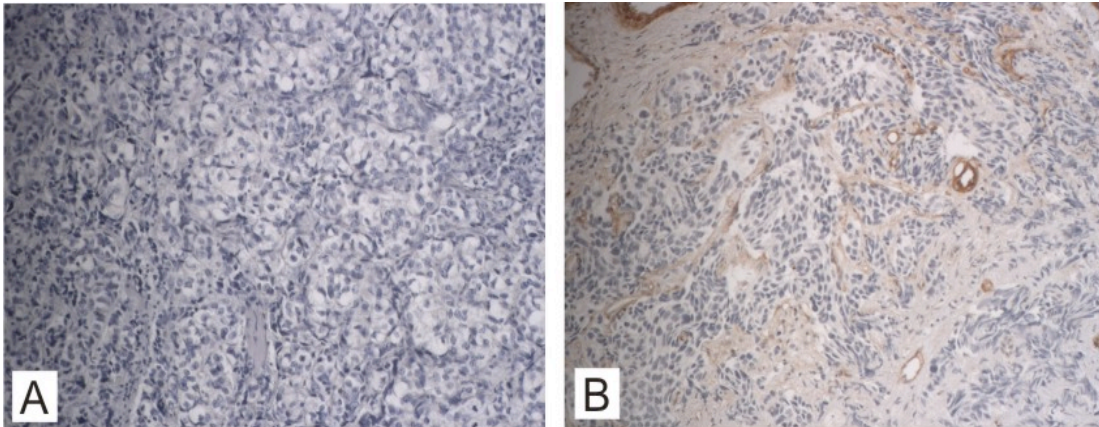
### **3.6.1 Expressionsmuster und Färbesignal**

$\alpha\beta3$  zeigt im Tumorparenchym nur ein sehr schwaches Signal. In der manuellen Auswertung ergibt sich für das Intensitätssignal ein Mean score von  $0,69$  (95% CI:  $0,53$  bis  $0,84$ ) und ein Median von  $0$ . Nur in  $6$  Fällen ( $5,22\%$ ) wird  $\alpha\beta3$  stark exprimiert, in  $8$  Fällen ( $6,96\%$ ) moderat, in  $39$  Fällen ( $33,91\%$ ) schwach und in  $62$  Fällen ( $53,91\%$ ) gibt es keinen Hinweis auf eine parenchymatöse  $\alpha\beta3$ -Expression. Dennoch zeigt sich eine stärkere mittlere Intensität als bei CytoB3, der cytoplasmatischen Untereinheit von  $\alpha\beta3$ , und dem Integrin  $\alpha\beta8$ . Der Anteil der positiven Zellen liegt im Durchschnitt zwischen  $25$  und  $50\%$  (Mean score:  $1,17$ ; 95% CI:  $0,90$  bis  $1,44$ ). Das Endothel der Gefäße ist meist stark positiv. Der Median liegt bei  $2$  und es errechnet sich ein Mean score von  $1,52$  (95% CI:  $1,37$  bis  $1,66$ ).

Das weitere Expressionsmuster der  $\alpha\beta3$ -Integrine verteilt sich folgendermaßen: ZNS-Gewebe erscheint negativ, ebenso Hämorrhagien und Fibrozyten. Das Bindegewebe weist teils eine schwache Positivität für  $\alpha\beta3$ -Integrine auf.

### **3.6.2 Vergleich Primärtumor und Metastase**

Im Vergleich der Intensitäten ergibt sich für die Primärtumore ein Mean score von  $0,68$  (95% CI:  $0,29$  bis  $1,08$ ) und für die korrespondierenden Metastasen ein Mean score von  $0,91$  (95% CI:  $0,40$  bis  $1,42$ ). Metastasen zeigen im Durchschnitt also eine etwas stärkere Expression als die Primärtumore. Der Unterschied ist signifikant ( $p=0,0006$ ).



**Abbildung 19: Immunhistochemie für  $\alpha v\beta 3$  mit 20facher Vergrößerung:**

**A: Primärtumor eines Mammakarzinoms Score 0**

**B: Metastase eines Mammakarzinoms Score 1 sowie positive Darstellung der Gefäße**

### 3.6.3 Korrelation mit der Tumorentität

Wie auch bei den  $\alpha v$ -, CytoB3-,  $\alpha v\beta 5$ - und  $\alpha v\beta 8$ -Integrinen zeigen Metastasen aus der Niere im Vergleich zu den anderen Tumorentitäten die höchste Intensitäts- und Mengenexpressionswerte. Von den 9 vorhandenen Fällen mit dem Ursprungsort Niere zeigen 4 Fälle (44,44%) eine schwache Intensität, 3 Fälle (33,33%) eine moderate und 2 Fälle (22,22%) eine starke Intensität. Die Metastasen der anderen Entitäten weisen ein negatives beziehungsweise schwaches Signal für  $\alpha v\beta 3$  auf. In der computerbasierten Auswertung ergibt sich für die 3 Fälle aus dem Gastrointestinaltrakt ein Mean score von 115,00 (95% CI: 84,88 bis 145,12), für die 10 Fälle aus der Brust von 104,15 (95% CI: 88,10 bis 120,20) und für die 24 pulmonalen Fälle von 111,44 (95% CI: 101,30 bis 121,58). Die Analyse der Gefäßendothelien zeigt keinen Zusammenhang mit dem Herkunftsorgan der Metastase.

| Tumorentität          | Intensität<br>score (95% CI) | Mean<br>Menge (95% CI) | Mean score<br>Gefäße (95% CI) |
|-----------------------|------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| Gastrointestinaltrakt | 0,33<br>(0,02 - 0,65)        | 1,0<br>(0,06 - 1,94)   | 1,92<br>(1,73 - 2,0)          |
| CUP                   | 0,82<br>(0,31 - 1,32)        | 1,55<br>(0,58 - 2,51)  | 1,55<br>(0,99 - 2,0)          |
| Lunge                 | 0,67<br>(0,39 - 0,95)        | 1,07<br>(0,65 - 1,50)  | 1,38<br>(1,11 - 1,66)         |
| Mamma                 | 0,23                         | 0,55                   | 1,57                          |



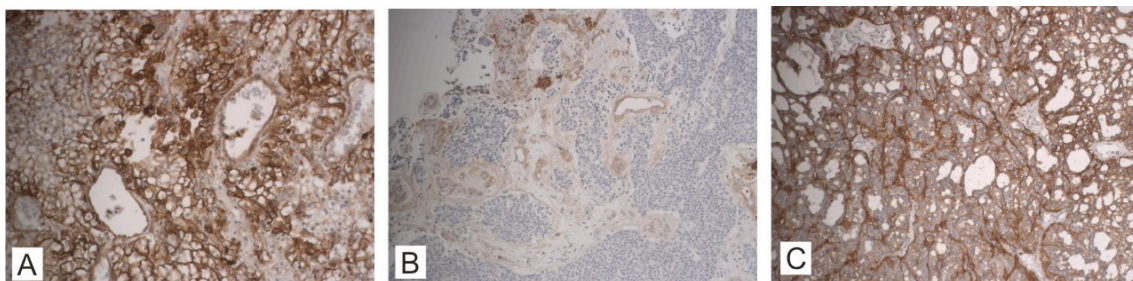
|          |                       |                      |                      |
|----------|-----------------------|----------------------|----------------------|
|          | (0,04 - 0,42)         | (0,08 - 1,01)        | (1,26 - 1,88)        |
| Niere    | 1,78<br>(1,14 - 2,42) | 3,33<br>(2,57 - 4,0) | 1,44<br>(0,77 - 2,0) |
| Prostata | 0,27<br>(0 - 0,59)    | 0,91<br>(0 - 2,01)   | 1,55<br>(1,0 - 2,0)  |

**Tabelle 16: Darstellung der Ergebnisse der manuellen Auswertung nach Herkunft in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse des Integrins  $\alpha\beta 3$**

Es ergeben sich folgende signifikanten Werte:

| Tumorentitäten               | p-Wert (Intensität) | p-Wert (Menge) |
|------------------------------|---------------------|----------------|
| Niere- Mamma                 | 0,0002              | <0,0001        |
| Niere- Prostata              | 0,0045              | 0,0066         |
| Niere- Gastrointestinaltrakt | 0,005               | 0,0029         |
| Niere- Lunge                 | 0,0075              | 0,0013         |
| Niere-CUP                    | n.s.                | 0,0446         |
| CUP- Mamma                   | 0,0276              | n.s.           |

**Tabelle 17: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Herkunft für die Menge der gefärbten Tumorzellen und für die Färbeintensität (n.s.= nicht signifikant)**



**Abbildung 20: Immunhistochemie für  $\alpha\beta 3$ :**

**A: klarzelliges Nierenkarzinom Score 3 (20fache Vergrößerung)**

**B: Mammakarzinom Score 1 (10fache Vergrößerung)**

**C: papilläres Nierenkarzinom Score 3 (20fache Vergrößerung)**

### 3.6.4 Korrelation mit der Tumorhistologie

Analog zu den Tumorentitäten zeigt sich auch hier das stärkste  $\alpha\beta 3$ -Vorkommen in den klarzelligigen Metastasen, die zu 87,5% der Niere entstammen. In der Intensitäts- und Mengenanalyse der manuellen Auswertung ergibt sich so ein signifikanter Unterschied zwischen Adenokarzinomen und klarzel-

ligen Metastasen (Intensität:  $p=0,0054$ ; Menge:  $p=0,0122$ ). In der Gefäßanalyse zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

| Histologischer Typ     | Anzahl der Fälle | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | Gefäße Mean score (95% CI) |
|------------------------|------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Adenokarzinom          | 87*              | 0,59<br>(0,40 - 0,77)          | 1,01<br>(0,72 - 1,31)     | 1,48<br>(1,30 - 1,65)      |
| Plattenepithelkarzinom | 6                | 0,50<br>(0 - 1,07)             | 1,33<br>(0 - 2,91)        | 1,67<br>(0,81 - 2,0)       |
| Kleinzeller            | 5                | 0,60<br>(0 - 1,71)             | 0,80<br>(0 - 2,42)        | 1,60<br>(0,49 - 2,0)       |
| Klarzelliges Karzinom  | 8                | 1,5<br>(0,73 - 2,27)           | 2,75<br>(1,51 - 3,99)     | 1,63<br>(1,0 - 2,0)        |

**Tabelle 18: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der manuellen Intensitäts- und Mengenanalyse der Tumorzellen, sowie der Expression im Endothel der Gefäße nach Histologie (\*Gefäßauswertung: 85 Fälle)**

In der Auswertung mit DTS zeigen Adenokarzinome (29 Fälle) einen mittleren Histoscore von 112,45 (95% CI: 104,1 bis 120,83). Im Vergleich mit den anderen Integrinen ist dieser mittlere Histoscore der Adenokarzinome geringer als der korrespondierende Histoscore der Integrine  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha\beta8$ ,  $\alpha\beta5$  und  $\alpha v$ . Nur CytoB3 weist einen noch niedrigeren mittleren Histoscore der Adenokarzinome (45,59) auf. Der mittlere Histoscore der Kleinzeller (2 Fälle) liegt bei 97,5 (95% CI: 27,6 bis 167,38) und der der Plattenepithelkarzinome (2 Fälle) bei 111,00 (95% CI: 0 bis 288,9). Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der computerbasierten Auswertung.

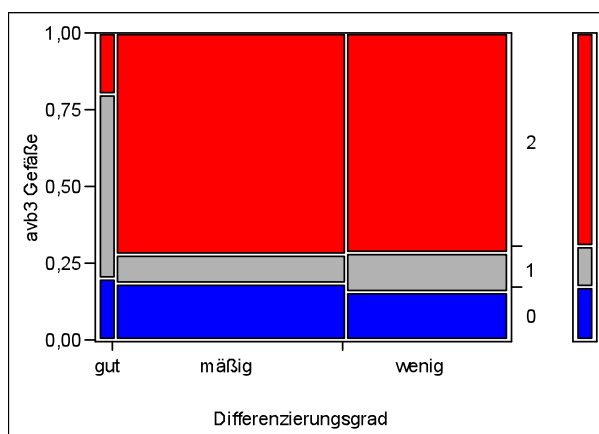
### 3.6.5 Korrelation mit der Metastasenlokalisierung

$\alpha\beta3$  Integrine werden in spinalen Metastasen deutlich stärker exprimiert als in zerebralen oder zerebellären. Sowohl bei der Auswertung der Intensitätsscores ( $p=0,0043$ ) als auch bei der Analyse der Mengenscores ( $p=0,0173$ ) ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen spinalen und zerebellären Metastasen. Spinale Filae exprimieren  $\alpha\beta3$  mit einer mittleren Intensität von 1,43 (95% CI: 0,70 bis 2,16) während sich bei zerebellären Metastasen nur ein Mean score von 0,42 (95% CI: 0,24 bis 0,60) ergibt. Analog zu den Integrinen  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha v$  und CytoB3 sowie den Liganden Fibrinogen und Fibronectin weisen spinale Meta-

stasen die höchste Intensität auf. Bei der Gefäßanalyse ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

### 3.6.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad

Beim Vergleich der unterschiedlichen Differenzierungsgrade errechnen sich signifikante Unterschiede in der  $\alpha\beta 3$ -Expression an den Gefäßendothelien ( $p=0,0261$ ). Für die wenig differenzierten Metastasen resultieren die höchsten Werte (Mean score: 1,56; 95% CI: 1,33 bis 1,78), gefolgt von den mäßig differenzierten (Mean score: 1,53; 95% CI: 1,33 bis 1,73). Das geringste  $\alpha\beta 3$ -Vorkommen an Gefäßendothelien zeigt sich bei den gut differenzierten Metastasen (Mean score: 1,0; 95% CI: 0,12 bis 1,88).



**Abbildung 21: Mosaikplot des Gesamtvergleichs der  $\alpha\beta 3$ -Expression des Gefäßendothels nach entsprechendem Differenzierungsgrad. Score 2:  $\alpha\beta 3$ -Expression > 50% der Gefäße; Score 1:  $\alpha\beta 3$ -Expression < 50% der Gefäße, Score 0: keine  $\alpha\beta 3$ -Expression der Endothelzellen**

Was die Intensitäts- und Mengenverteilung betrifft, werden in gut differenzierten Metastasen die höchsten  $\alpha\beta 3$  Werte gemessen: Mean score Intensität: 1,20 (95% CI: 0 bis 2,56); Mean score Menge: 1,60 (95% CI: 0 bis 3,27). Es zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

## 3.7 CytoB3

### 3.7.1 Expressionsmuster und Färbesignal

CytoB3, die cytoplasmatische Untereinheit von  $\alpha\beta 3$ , zeigt in neoplastischen Epithelien unter allen Integrinen die am geringsten detektierte Expression mit

einer Durchschnittsintensität von 0,28 in der manuellen Auswertung (95% CI: 0,14 bis 0,42). 101 Fälle (87,83%) weisen im Tumorparenchym kein Signal auf. In 6 Fällen (5,33%) lässt sich eine schwache, in 2 Fällen eine moderate (1,74%) und in 6 Fällen (5,22%) eine starke parenchymatöse Färbung erkennen. Es zeigt sich jedoch zu 56,64% ein zusätzliches Färbesignal im Gefäßendothel der Tumore. 41 Fälle (36,28%) demonstrieren dabei eine starke und 23 Fälle (20,35%) eine schwache Gefäßbeteiligung. Insgesamt scheint die Rezeptoraffinität der Antikörper gegen  $\alpha\beta 3$  stärker zu sein als die der Anti-CytoB3-Antikörper.

ZNS-Gewebe, Fibrozyten und bindegewebiges Material präsentieren keine CytoB3-Expression. Ein positives Signal lässt sich in Fibrinablagerungen in Gefäßen und in der Peripherie von Hämorrhagien erkennen.

### 3.7.2 Vergleich Primärtumor und Metastase

Die Primärtumore zeigen eine Durchschnittsintensität von 0,68 (95% CI: 0,18 bis 1,18) für CytoB3. Von den 22 Fällen sind 3 Fälle (13,68%) stark gefärbt. Unter diesen befinden sich ein papilläres Nierenkarzinom und 2 Schilddrüsenkarzinome. Der Mean score der Metastasen liegt bei 0,5 (95% CI: 0,01 bis 0,09) und stellt sich damit hochsignifikant ( $p=0,001$ ) vermindert dar. In der Mengenanalyse zeigt sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der Expression in den Metastasen ( $p=0,0015$ ). Der Vergleich der Gefäße ergibt einen p-Wert von 0,1324, wobei der Mean score der Primärtumore bei 0,5 (95% CI: 0,14 bis 0,86) und der der Metastasen bei 1,09 (95% CI: 0,68 bis 1,5) liegt.

### 3.7.3 Korrelation mit der Tumorentität

In der manuellen Auswertung werden folgende Ergebnisse ermittelt:

| Tumorentität          | Anzahl der Fälle (n) | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | Gefäße Mean score (95% CI) |
|-----------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Gastrointestinaltrakt | 11                   | 0,00                           | 0,00                      | 1,36<br>(0,82 - 1,91)      |
| CUP                   | 11                   | 0,00                           | 0,00                      | 0,45<br>(0 - 0,92)         |
| Lunge                 | 42                   | 0,17<br>(0 - 0,37)             | 0,1<br>(0 - 0,21)         | 0,74<br>(0,45 - 1,02)      |

|          |    |                       |                       |                       |
|----------|----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Mamma    | 22 | 0,05<br>(0 - 0,14)    | 0,18<br>(0 - 0,56)    | 1,00<br>(0,55 - 1,46) |
| Niere    | 9  | 1,44<br>(0,42 - 2,47) | 1,33<br>(0,32 - 2,35) | 0,78<br>(0,44 - 1,22) |
| Prostata | 11 | 0,36<br>(0 - 0,82)    | 0,82<br>(0 - 1,89)    | 1,64<br>(1,18 - 2,09) |

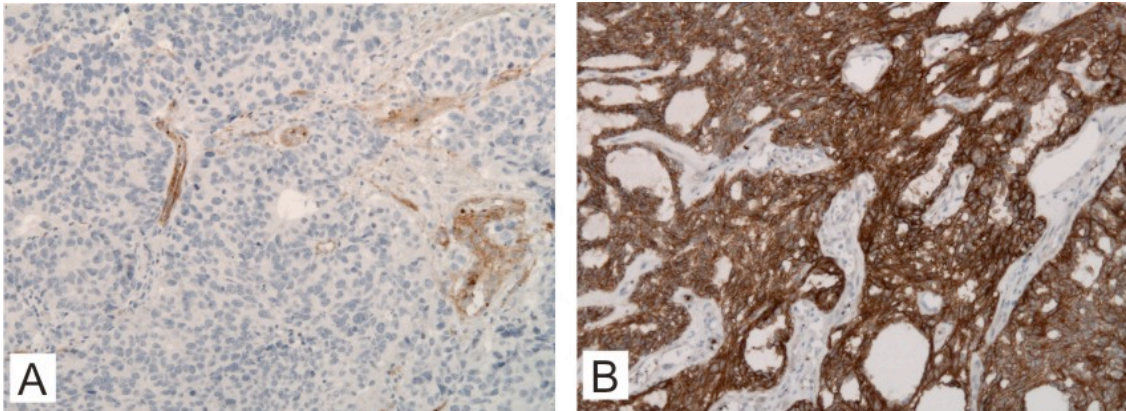
**Tabelle 19: Darstellung der Unterschiede zwischen den einzelnen Entitäten in Intensitäts,- Mengen- und Endothelanalyse für CytoB3**

Nierenkarzinome kennzeichnen sich im Vergleich zu den anderen Entitäten durch eine stärkere CytoB3-Expression der Tumorzellen. Die Signalstärke im Gefäßendothel weist keinen Zusammenhang mit der Expression im neoplastischen Epithel auf. Im Gastrointestinaltrakt ist trotz negativer Tumorzellen die stärkste CytoB3-Expression in den Gefäßendothelien vorzufinden. Bei der manuellen Auswertung ergeben sich folgende signifikante beziehungsweise sehr signifikante Vergleichsgruppen:

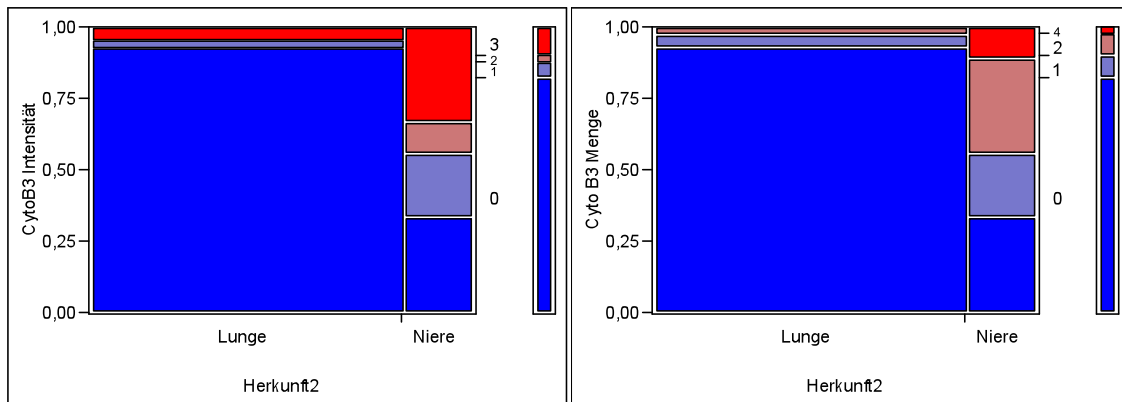
| Tumorentitäten               | p-Wert<br>(Intensität) | p-Wert<br>(Menge) | p-Werte<br>(Gefäße) |
|------------------------------|------------------------|-------------------|---------------------|
| Niere- CUP                   | 0,0146                 | 0,0149            | n.s.                |
| Niere- Gastrointestinaltrakt | 0,0107                 | 0,0107            | 0,0238              |
| Niere- Mamma                 | 0,0018                 | 0,0012            | 0,0001              |
| Niere- Lunge                 | 0,0003                 | 0,0002            | 0,0001              |
| Niere-Prostata               | n.s.                   | n.s.              | 0,004               |
| Prostata- Lunge              | 0,0353                 | 0,0353            | 0,0152              |
| CUP-Prostata                 | n.s.                   | n.s.              | 0,0063              |
| CUP- Gastrointestinaltrakt   | n.s.                   | n.s.              | 0,0418              |
| CUP-Mamma                    | n.s.                   | n.s.              | 0,0409              |

**Tabelle 20: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Herkunft sowohl für die Menge der gefärbten Tumorzellen als auch für die Färbeintensität (n.s.= nicht signifikant)**

Die Auswertung mit DTS ergibt bei den Metastasen aus der Mamma (7 Fälle) einen mittleren Histoscore von 49,71 (95% CI: 31,57 bis 67,86) und bei den Metastasen aus der Lunge (23 Fälle) von 37,98 (95% CI: 27,52 bis 48,44). Es resultieren keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Entitäten.



**Abbildung 22: Immunhistochemie CytoB3 mit 20facher Vergrößerung**  
**A: schwach gefärbten Metastase (Score 1) aus dem Gastrointestinaltrakt und**  
**B: stark gefärbten Metastase (Score 3) aus einem papillären Nierenkarzinom**



**Abbildung 23: Mosaikplot für CytoB3. Paarweiser Vergleich zwischen Metastasen aus der Lunge und aus der Niere. Dargestellt ist ein signifikanter Unterschied sowohl in der Mengen (rechts)- als auch in der Intensitätsanalyse (links).**

### 3.7.4 Korrelation mit der Tumorphistologie

CytoB3 zeigt seine stärkste Epithelexpression in den klarzelligem Karzinomen. Die anderen Histologieformen zeigen gar kein oder nur ein geringes CytoB3-Vorkommen. Bei der Auswertung der manuell erhobenen Daten sortiert nach vorherrschendem Histologietyp ergeben sich folgende Werte:

| Histologischer Typ     | Anzahl der Fälle (n) | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | Gefäße Mean score (95% CI) |
|------------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Adenokarzinom          | 87*                  | 0,22<br>(0 - 0,37)             | 0,30<br>(0,07 - 0,37)     | 0,93<br>(0,73 - 1,13)      |
| Plattenepithelkarzinom | 6                    | 0,00                           | 0,00                      | 1,17<br>(0,13 - 2,2)       |

|                          |   |                    |                       |                       |
|--------------------------|---|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| Kleinzeller              | 5 | 0,00               | 0,00                  | 1,4<br>(0,30 - 2,51)  |
| Klarzelliges<br>Karzinom | 8 | 1,13<br>(0 - 2,26) | 0,75<br>(0,01 - 1,49) | 1,13<br>(0,83 - 1,42) |

**Tabelle 21: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der einzelnen Histologieformen in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse des Integrins CytoB3 (\*Gefäßauswertung: 85 Fälle)**

Die direkten Vergleiche der Gruppen ergeben signifikant höhere Expressionswerte in den klarzelligem Karzinomen gegenüber den Adenokarzinomen:

| Histologieformen                  | p-Werte<br>(Intensität) | p-Werte<br>(Menge) | p-Werte<br>(Gefäße) |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|
| Klarzeller- Adenokarzinom         | 0,011                   | 0,0018             | <0,0001             |
| Klarzeller-Kleinzeller            | n.s.                    | n.s.               | 0,0466              |
| Klarzeller-Plattenepithelkarzinom | n.s.                    | n.s.               | 0,0252              |

**Tabelle 22: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Histologie sowohl für die Menge der gefärbten Tumorzellen und die Gefäße als auch für die Färbintensität (n.s.= nicht signifikant)**

Die Gefäßexpression von CytoB3 ist in den Adenokarzinomen am geringsten und am stärksten in den kleinzelligen Karzinomen (siehe Tabelle 21).

Bei der Auswertung mit DTS ergibt sich ein Mean score für die Adenokarzinome (27 Fälle) von 45,6 (95%CI: 35,9 bis 55,3), für die Plattenepithelkarzinome (2 Fälle) von 26,5 (95% CI: 0 bis 223,45) und für die Kleinzeller (2 Fälle) von 29,0 (95% CI: 16,3 bis 41,71). Die zwischen den analysierten Gruppen ermittelten Differenzen sind hier bei sehr breitem Konfidenzintervall, sprich zu geringem Stichprobenumfang und zu starker Variabilität, nicht signifikant (beachte Abwesenheit von klarzelligem Tumoren).

### **3.7.5 Korrelation mit der Metastasenlokalisation**

CytoB3 wird am stärksten in spinalen Metastasen exprimiert und nur sehr schwach in zerebellären Filae (signifikante Unterschiede:  $p=0,0387$  in der Intensitätsanalyse und  $p=0,0387$  in der Mengenanalyse). Bei Betrachtung der Expression in den Gefäßendothelien zeigen sich keine signifikanten Werte:

|            | Anzahl der Fälle           | Intensität<br>Mean score<br>(95% CI) | Menge Mean<br>score (95% CI) | Gefäße Mean<br>score (95% CI) |
|------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Zerebellär | 38<br>(Gefäßauswertung:37) | 0,13<br>(0 - 0,32)                   | 0,08<br>(0 - 0,20)           | 0,84<br>(0,54 - 1,14)         |
| Zerebral   | 77<br>(Gefäßauswertung:76) | 0,30<br>(0,12 - 0,48)                | 1,01<br>(0,15 - 0,61)        | 0,97<br>(0,77 - 1,18)         |
| spinal     | 7                          | 0,86<br>(0 - 2,21)                   | 0,29<br>(0 - 0,74)           | 0,86<br>(0,22 -1,50)          |

**Tabelle 23: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der Metastasenlokalisationen in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse des Integrins CytoB3**

### 3.7.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad

Im Vergleich der drei Differenzierungsgrade untereinander ergibt sich ein p-Wert nach Pearson von 0,5179. Es ist somit kein Zusammenhang zwischen der CytoB3-Expression und dem Differenzierungsgrad der Tumore erkennbar.

## 3.8 $\alpha v\beta 5$

### 3.8.1 Expressionsmuster und Färbesignal

$\alpha v\beta 5$ -Integrine werden in zerebralen beziehungsweise zerebellären Metastasen, mit einem Mean score von 1,66 (95% CI: 1,86 bis 1,45) in der manuellen Auswertung, ähnlich stark exprimiert wie  $\alpha v\beta 6$ . Der Median liegt bei score 2 und die unterschiedlichen Intensitäten sind folgendermaßen aufgeteilt: 35 Fälle sind (30,43%) stark gefärbt, 34 Fälle (29, 57%) moderat, 19 Fälle (16,52%) schwach und 27 Fälle (23,48%) sind negativ. In der Mengenanalyse der gefärbten Tumorzellen ergibt sich ein Mean score von 2,1 (95% CI: 1,83 bis 2,36). Im Gegensatz zu  $\alpha v\beta 6$  wird  $\alpha v\beta 5$  jedoch auch von den Gefäßendothelien stark exprimiert. Der Mean score liegt hierbei bei 1,32 (95% CI: 1,56 bis 1,48). In 41 Fällen (36,28%) demonstrieren 50% der Gefäße oder mehr ein positives Signal für  $\alpha v\beta 5$  und in 23 Fällen (20,35%) liegt eine  $\alpha v\beta 5$ -Expression in weniger als 50% der Gefäßendothelien vor. 49 Fälle (43,36%) sind negativ.



Tumorsepten sowie interzelluläres Bindegewebe lassen sich ebenfalls von den mit Farbstoff-gekoppelten Anti- $\alpha\beta 5$ -Antikörpern anfärben. Hämorrhagien erweisen sich als negativ und vor allem die Gefäße des angrenzenden ZNS-Gewebes präsentieren sich als positiv für  $\alpha\beta 5$ .

### 3.8.2 Vergleich Primärtumor und Metastase

Der Mean score der Ursprungstumore liegt bei 2 (95% CI: 1,64 bis 2,36) und ist damit höher als der Mittelwert der Metastasen (Mean score: 1,5; 95% CI: 0,96 bis 2,04). In der Auswertung der Kontingenztabelle ergibt sich ein p-Wert (Pearson's chi Quadrat) von 0,2548. Der oben genannte Unterschied ist statistisch also nicht signifikant. Unter den Ursprungstumoren zeigen 6 Fälle (27,27%) ein starkes Signal, 11 Fälle (50%) ein moderates und 4 Fälle (18,18%) ein schwaches Signal für  $\alpha\beta 5$ . Nur ein Fall (4,55%) ist negativ. Bei den zu vergleichenden Metastasen erweisen sich 7 Fälle (31,82%) als negativ. Nur in 4 Fällen stimmen Expression von Primarius und Metastase überein entsprechend einem Kappa-Wert von -0,0909 (schlechte Übereinstimmung nach Landis und Koch). Auch die Mengenanalyse ergibt eine schlechte Übereinstimmung mit einem Kappa-Wert von -0,1493.

### 3.8.3 Korrelation mit der Tumorentität

Im Vergleich der unterschiedlichen Ursprungsorgane der zerebralen beziehungsweise zerebellären Filae zeigen sich teils deutliche Unterschiede. In der manuellen Auswertung ergeben sich hierbei folgende Mittelwerte:

| Tumorentität          | Anzahl der Fälle (n) | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | Gefäße Mean score (95% CI) |
|-----------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Gastrointestinaltrakt | 11                   | 1,83<br>(1,24 - 2,43)          | 3,0<br>(2,28 - 3,72)      | 1,36<br>(0,82 - 1,91)      |
| CUP                   | 11                   | 1,82<br>(1,16 - 2,48)          | 2,45<br>(1,64 - 2,27)     | 1,45<br>(0,09 - 2,01)      |
| Lunge                 | 42                   | 1,50<br>(1,13 - 1,87)          | 1,69<br>(1,26 - 2,12)     | 1,52<br>(1,26 - 1,78)      |
| Mamma                 | 22                   | 1,14<br>(0,68 - 1,60)          | 1,68<br>(0,99 - 2,37)     | 0,76<br>(0,33 - 1,19)      |

|          |    |                       |                       |                       |
|----------|----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Niere    | 9  | 2,78<br>(2,44 - 3,13) | 3,22<br>(2,58 - 3,86) | 1,67<br>(1,28 - 2,05) |
| Prostata | 11 | 2,18<br>(1,40 - 2,97) | 2,64<br>(1,58 - 3,69) | 1,45<br>(0,9 - 2,0)   |

**Tabelle 24: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der einzelnen Tumorentitäten in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse des Integrins  $\alpha\beta 5$**

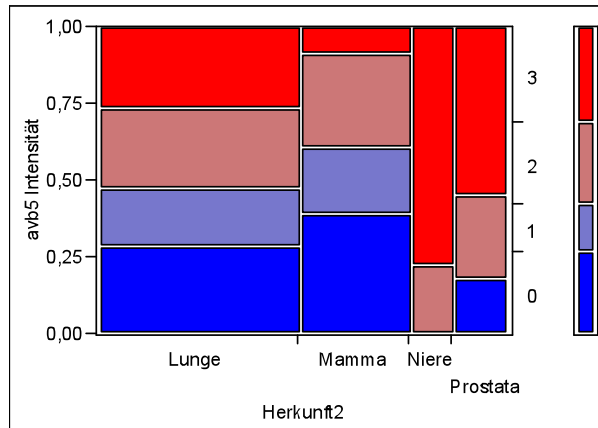
Das schwächste Signal für  $\alpha\beta 5$  zeigt sich in Metastasen aus den Mammae. In der Niere hingegen wird eine 2,4-fach höhere Intensität im Vergleich zu den Brustmetastasen detektiert. Eine ebenfalls hohe Intensität weisen Metastasen aus der Prostata auf, die konträr dazu bei der Auswertung der  $\alpha\beta 6$ -Integrine ein negatives Ergebnis aufzeigen. Die stärkste Gefäßexpression von  $\alpha\beta 5$  zeichnet sich ebenfalls in den Metastasen aus der Niere ab und die schwächste in den Filae aus der Brust.

Bei der statistischen Analyse im direkten Vergleich ergeben sich folgende signifikante p-Werte:

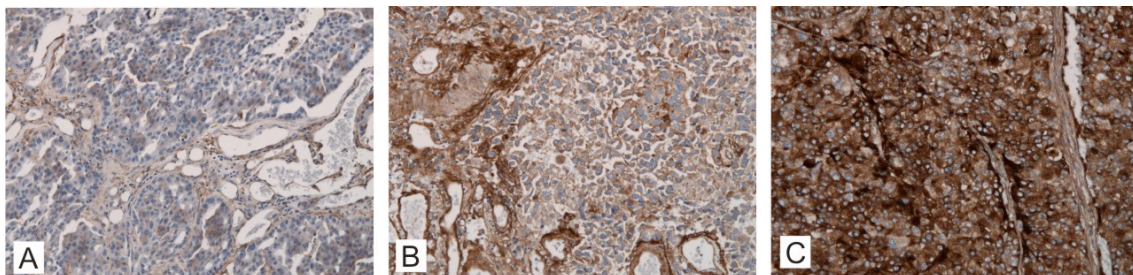
| Tumorentitäten  | p-Wert<br>(Intensität) | p-Wert<br>(Menge) | p-Werte<br>(Gefäße) |
|-----------------|------------------------|-------------------|---------------------|
| Niere- Mamma    | 0,0012                 | n.s.              | 0,0117              |
| Niere- Lunge    | 0,0228                 | n.s.              | 0,0184              |
| Prostata- Mamma | 0,0179                 | n.s.              | n.s.                |
| Lunge- Mamma    | n.s.                   | n.s.              | 0,008               |

**Tabelle 25: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Herkunftsorgan sowohl für die Menge der gefärbten Tumorzellen und die Gefäße als auch für die Färbeintensität (n.s.= nicht signifikant)**

Bei der Auswertung mit DTS geht in den 3 Fällen aus dem Gastrointestinaltrakt ein mittlerer Histoscore von 214,83 (95% CI: 98,22 bis 331,44) hervor, in den 24 pulmonalen Fällen ein mittlerer Histoscore von 138,02 (95% CI: 108,45 bis 167,59) und in den 10 Fällen aus der Brust von 147,5 (95% CI: 83,25 bis 211,75). Wie auch in der manuellen Auswertung präsentiert sich hier in den Metastasen aus dem Gastrointestinaltrakt eine stärkere Expression als in den Metastasen aus der Brust beziehungsweise aus der Lunge. Der Unterschied ist aufgrund zu geringer Fallzahl und zu hoher Streubreite jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 24: Mosaikplot der Kontingenzanalyse der Herkunftsorgane Niere, Lunge, Mamma und Prostata für das Integrin  $\alpha\beta 5$ . Dargestellt ist die Aufteilung des manuell ermittelten Intensitätsspektrums der Epithelzellen: score 3: starke Expression, score 2: moderate Expression, score 1: schwache Expression, score 0: keine Expression.**



**Abbildung 25: Immunhistochemie  $\alpha\beta 5$  mit 20facher Vergrößerung:**

**A: CUP-Tumor; Intensitätsscore 1**

**B: Metastase aus der Lunge; Intensitätsscore 2**

**C: Metastase aus der Prostata. Intensitätsscore 3**

### 3.8.4 Korrelation mit der Tumorhistologie

Bei der Betrachtung der  $\alpha\beta 5$  Intensität stellt sich heraus, dass  $\alpha\beta 5$ -Integrine signifikant unterschiedlich ( $p=0,0226$ ) abhängig von der Tumorhistologie exprimiert werden. In der manuellen Auswertung werden für die einzelnen Histologieformen folgende Werte ermittelt:

| Histologischer Typ     | Anzahl der Fälle | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | Gefäße Mean score (95% CI) |
|------------------------|------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Adenokarzinom          | 87*              | 1,67<br>(1,43 - 1,91)          | 2,17<br>(1,86 - 2,49)     | 1,2<br>(1,01 - 1,39)       |
| Plattenepithelkarzinom | 6                | 0,67<br>(0 - 1,52)             | 1,00<br>(0 - 2,33)        | 1,0<br>(0 - 2,0)           |

|                          |   |                    |                       |                      |
|--------------------------|---|--------------------|-----------------------|----------------------|
| Kleinzeller              | 5 | 0,40<br>(0 - 1,08) | 0,6<br>(0 - 1,71)     | 2,0<br>(2,0 - 2,0)   |
| Klarzelliges<br>Karzinom | 8 | 2,75<br>(2,26 - 3) | 2,88<br>(2,18 - 3,57) | 1,75<br>(1,36 - 2,0) |

**Tabelle 26: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der Histologieformen in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse des Integrins  $\alpha\beta 5$  (\*Gefäßauswertung: 85 Fälle).**

Besonders stark wird demzufolge  $\alpha\beta 5$  analog zur Tumorentität Niere von klarzelligem Karzinomen exprimiert. Plattenepithelkarzinome und Kleinzeller sind nur schwach positiv für  $\alpha\beta 5$ .

Das  $\alpha\beta 5$  Vorkommen im Gefäßendothel scheint hingegen unabhängig von der Tumorphistologie zu sein. Statistisch werden in den direkten Gruppenvergleichen folgende signifikante p-Werte ermittelt:

| Histologieformen                   | p-Werte<br>(Intensität) | p-Werte<br>(Menge) | p-Werte<br>(Gefäße) |
|------------------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|
| Klarzeller- Kleinzeller            | 0,0046                  | 0,0434             | n.s.                |
| Klarzeller- Adenokarzinom          | 0,045                   | n.s.               | n.s.                |
| Klarzeller- Plattenepithelkarzinom | 0,0103                  | n.s.               | n.s.                |

**Tabelle 27: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Histologie für die Menge der gefärbten Tumorzellen, die Gefäße und für die Färbeintensität (n.s.= nicht signifikant).**

In der digitalen Auswertung wird für die 28 Fälle der Adenokarzinome ein mittlerer Histoscore von 169,75 (95% CI: 139 bis 200,5), für die beiden kleinzelligen Karzinome von 107,5 (95% CI: 0 bis 300) und für die beiden Plattenepithelkarzinome von 107,0 (95% CI: 0 bis 300) errechnet. Es ergeben sich bei zu geringer Stichprobe und zu großer Variabilität keine signifikanten Unterschiede. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der manuellen Auswertung.

### **3.8.5 Korrelation mit der Metastasenlokalisierung**

Bei der Analyse des  $\alpha\beta 5$ -Vorkommens im Gefäßendothel resultiert ein signifikanter Unterschied zwischen den zerebralen und den zerebellären Metastasen ( $p= 0,015$ ). Dabei ist der Mean score der zerebralen Metastasen (Mean score:

1,49; 95% CI: 1,31 bis 1,67) signifikant höher als der der zerebellären Filae (Mean score: 0,97; 95% CI: 0,66 bis 1,28).

### **3.8.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad**

Es zeigt sich eine Abwärtstendenz in Richtung gering differenzierter Metastasen, die jedoch keine statistische Signifikanz zu gut oder mäßig differenzierten Tumoren aufweist (p-Werte sind im Anhang unter I.5 aufgeführt).

## **3.9 $\alpha v$**

### **3.9.1 Expressionsmuster und Färbesignal**

$\alpha v$ -Integrine, das heißt die Summe aller zuvor beschriebenen Subtypen, kommen in hoher Zahl und Intensität in den Epithelzellen von Karzinomen vor. Mit einem Median von 3,0 und einem Mean score von 2,36 (95% CI: 2,19 bis 2,53) in der Intensitätsanalyse der manuellen Auswertung zeigt sich folglich die stärkste Intensität. Manuell ausgewertet präsentieren sich 66 Fälle (57,39%) mit einer starken, 32 Fälle (27,83%) mit einer moderaten und 5 Fälle (4,35%) mit einer schwachen Intensität. In 12 Fällen (10,43%) werden  $\alpha v$ -Integrine nicht exprimiert. In der Mengenanalyse ergibt sich ein Mean score von 3,32 (95% CI: 3,08 bis 3,56) und in der Gefäßanalyse von 1,65 (95% CI: 1,52 bis 1,78). Auch Hämorrhagien weisen ein positives Signal auf. Das Vorkommen von  $\alpha v$ -Integrinen in Bindegewebe und Tumorsepten ist schwach positiv, wohingegen sich Fibrozyten als negativ erweisen. Angrenzendes ZNS-Gewebe zeigt eine hohe Dichte an  $\alpha v$ -Integrinen.

Erwähnenswert ist eine geringe Spezifität für entartetes Gewebe. Das Signal ist zwar meist stark positiv, jedoch sehr diffus und uncharakteristisch verteilt.

### 3.9.2 Vergleich Primärtumor und Metastase

|                                | Primärtumor           | Metastase             |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Mean score Intensität (95% CI) | 2,59<br>(2,24 - 2,94) | 2,59<br>(2,24 - 2,94) |
| Mean score Menge (95% CI)      | 3,18<br>(2,66 - 3,71) | 3,64<br>(3,21 - 4,06) |
| Mean score GefäÙe (95% CI)     | 1,18<br>(0,76 - 1,61) | 1,77<br>(1,50 - 2,04) |

**Tabelle 28:** Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte mit Konfidenzintervall von Ursprungstumor und Metastase. Angegeben sind Werte der Intensitäts- und Mengenanalyse der neoplastischen Epithelzellen der manuellen Auswertung, sowie die Ergebnisse der Gefäßbewertung (Menge der positiven Endothelzellen).

Beim Vergleich der Intensitäten ergibt sich ein identisches Profil für Primärtumor und Metastasen ( $p=1,0$ ,  $Kappa=-0,05$ , das heißt Übereinstimmungen eher zufälliger Natur). Der Mengenvergleich ist ebenfalls nicht signifikant ( $p=0,45$ ) bei einem Kappa-Wert von  $0,047$ . Es liegt also eine schlechte Übereinstimmung bezüglich der  $\alpha v$ -Expression im Karzinomepithel vor. Auch der Vergleich der Signalstärke im Gefäßendothel ergibt mit einem Kappa-Wert von  $-0,02$  eine zufällige, nicht signifikante Divergenz der zu vergleichenden Werte.

### 3.9.3 Korrelation mit der Tumorentität

In der manuellen Auswertung resultieren folgende Werte:

| Tumorentität          | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | GefäÙe Mean score (95% CI) |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Gastrointestinaltrakt | 2,42<br>(1,84 - 2,99)          | 3,25<br>(2,43 - 4,00)     | 1,82<br>(1,41 - 2,22)      |
| CUP                   | 2,0<br>(1,1 - 2,9)             | 2,55<br>(1,33 - 3,76)     | 1,09<br>(0,46 - 1,73)      |
| Lunge                 | 2,40<br>(2,13 - 2,68)          | 3,45<br>(3,09 - 3,81)     | 1,71<br>(1,52 - 1,91)      |
| Mamma                 | 2,0<br>(1,59 - 2,41)           | 3,36<br>(2,81 - 3,92)     | 1,82<br>(1,56 - 2,08)      |
| Niere                 | 3,0<br>(3,0 - 3,0)             | 4,0<br>(4,0 - 4,0)        | 2,0<br>(2,0 - 2,0)         |

|          |                       |                     |                       |
|----------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| Prostata | 2,27<br>(1,47 - 3,07) | 3,1<br>(1,99 - 4,0) | 1,27<br>(0,67 - 1,88) |
|----------|-----------------------|---------------------|-----------------------|

**Tabelle 29: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der Herkunftsorgane in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse von  $\alpha v$ .**

Die stärkste Expression von  $\alpha v$ -Integrinen zeichnet sich in nephrogenen Gehirnmetastasen ab. In allen, in dieser Studie betrachteten, Metastasen aus der Niere wird  $\alpha v$  sehr stark und von >75% der neoplastischen Epithelzellen exprimiert. Hinzu kommt bei allen Metastasen aus der Niere ein  $\alpha v$ -Vorkommen in >50% der Endothelzellen der Gefäße. Es lässt sich dabei eine signifikant höhere Expression in der Signalintensität zwischen Metastasen mit Herkunft aus der Niere im Vergleich zu denen aus der Mamma ( $p= 0.0078$ ) erkennen. Im Intensitäts- und Mengenvergleich errechnen sich keine weiteren signifikanten Werte. In der Kontingenzanalyse aller Herkunftsorgane ergibt sich bei der Intensitätsbetrachtung ein  $p$ -Wert von 0,1871. Wie stark  $\alpha v$  im Epithel der Metastasen vorkommt ist also weitgehend unabhängig von der Tumorentität. Auch in der computerbasierten Auswertung präsentiert sich kein signifikanter Unterschied. Metastasen aus dem Gastrointestinaltrakt weisen den höchsten mittleren Histoscore auf (Mean score: 165,83; 95% CI: 151,44 bis 180,23), der mittlere Histoscore der pulmonalen Metastasen beträgt 158,73 (95% CI: 134,18 bis 183,28) und der mittlere Histoscore von Metastasen aus der Mamma liegt bei 150,8 (95% CI: 107,28 bis 194,32).

Im Vergleich der Häufigkeit, mit der  $\alpha v$ -Integrine im Zytoplasma der Gefäßendothelzellen vorkommen, resultiert eine signifikante Diskrepanz zwischen den Tumorentitäten Niere und CUP ( $p=0,03$ ), CUP und Mamma ( $p= 0,0111$ ), CUP und Lunge ( $p= 0,0444$ ) sowie Prostata und Mamma ( $p= 0,0274$ ). Endothelzellen der CUP-Tumore und der Metastasen aus der Prostata weisen dabei eine geringere  $\alpha v$ -Expression auf als es in Metastasen aus den anderen Ursprungsorganen der Fall ist.

### 3.9.4 Korrelation mit der Tumorhistologie

Die Untersuchung der unterschiedlichen Histologieformen ergibt bei der Intensitätsanalyse kein signifikantes Resultat ( $p=0,2528$ ). Am stärksten werden  $\alpha v$ -Integrine in kleinzelligen und klarzelligen Karzinomen exprimiert.

Das schwächste Signal findet sich in den Zellen der Plattenepithelkarzinome.

| Histologischer Typ     | Anzahl der Fälle | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | Gefäße Mean score (95% CI) |
|------------------------|------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Adenokarzinom          | 87*              | 2,22<br>(2,00 - 2,44)          | 3,24<br>(2,95 - 3,54)     | 1,58<br>(1,42 - 1,74)      |
| Plattenepithelkarzinom | 6                | 1,83<br>(0,61 - 3,06)          | 2,67<br>(0,83 - 4,50)     | 1,50<br>(0,62 - 2,38)      |
| Kleinzeller            | 5                | 3,00<br>(3,00 - 3,00)          | 3,80<br>(3,25 - 4,36)     | 2,0<br>(2,0 - 2,0)         |
| Klarzelliges Karzinom  | 8                | 3,00<br>(3,00 - 3,00)          | 3,88<br>(3,58 - 4,17)     | 2,0<br>(2,0 - 2,0)         |

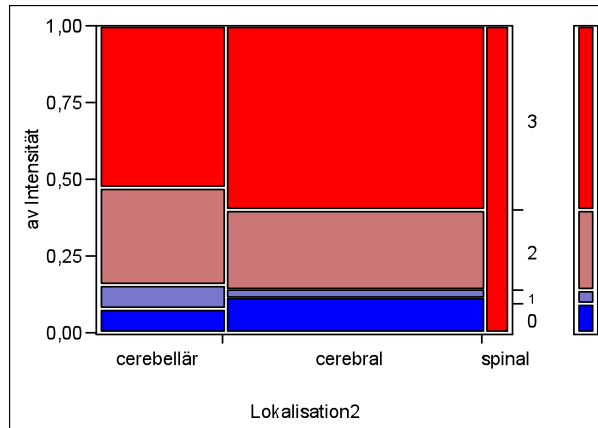
**Tabelle 30: Darstellung der unterschiedlichen Mittelwerte der einzelnen Histologieformen in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse der Integrinuntereinheit  $\alpha v$  (\*Gefäßauswertung: 85 Fälle).**

In der Mengenanalyse zeichnet sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Plattenepithelkarzinom und dem Adenokarzinom ( $p=0,0028$ ) ab. In den anderen Gruppenvergleichen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

### 3.9.5 Korrelation mit der Metastasenlokalisation

In spinalen Metastasen wird das stärkste Signal als auch die höchste Anzahl an  $\alpha v$ -exprimierenden Zellen registriert. Die mittlere Intensität beträgt 3,0 (95% CI: 3,0 bis 3,0) und der Mean score der Mengenauswertung liegt bei 3,71 (95% CI: 3,26 bis 4,17). In allen betrachteten spinalen Metastasen wird eine  $\alpha v$ -Expression von >50% der Gefäßendothelien beobachtet (Mean score: 2,0; 95% CI: 2,0 bis 2,0).





**Abbildung 26: Mosaikplot der unterschiedlichen Lokalisationen für die  $\alpha v$ -Untereinheit. Die in der Abbildung dargestellten Unterschiede zwischen den einzelnen Metastasenlokalisationen sind statistisch jedoch nicht signifikant ( $p=0,2674$ ).**

### 3.9.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad

Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede darlegen. Demzufolge kann festgehalten werden, dass  $\alpha v$ -Integrine weitgehend unabhängig vom Differenzierungsgrad exprimiert werden. In dieser Studie manifestieren sich die höchsten Werte für mäßig differenzierte Metastasen.

| Differenzierungsgrad | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | Gefäße Mean score (95% CI) |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Gut (G1)             | 2,20<br>(0,58 - 3,82)          | 3,20<br>(0,98 - 4,00)     | 1,50<br>(0 - 3,09)         |
| Mäßig (G2)           | 2,38<br>(2,16 - 2,61)          | 3,43<br>(3,12 - 3,73)     | 1,71<br>(1,55 - 1,87)      |
| Wenig (G3)           | 2,24<br>(1,94 - 2,55)          | 3,18<br>(2,78 - 3,58)     | 1,58<br>(1,34 - 1,81)      |

**Tabelle 31: Ergebnisse der manuellen Auswertung der  $\alpha v$ -Expression bei unterschiedlichen Differenzierungsgraden.**

## 3.10 Fibronectin

### 3.10.1 Expressionsmuster und Färbesignal

Der Integrinligand Fibronectin weist eine starke Selektivität für das Stroma der betreffenden Metastase auf. Auch Hämorrhagien stellen sich positiv dar. Die Tumorzellen selbst präsentieren sich als nur schwach positiv (Mean score: 0,68; 95% CI: 0,49 bis 0,87). In nur 13 Fällen (11,30%) ergibt sich ein starkes

Signal. Eine moderate beziehungsweise schwache Intensität zeigt sich in ebenfalls 13 Fällen (11,3%) und ein negatives Signal liegt in 76 Fällen (66,09%) vor. Der Median liegt bei 0. In der Mengenanalyse errechnet sich ein Mean score von 0,54 (95% CI: 0,37 bis 0,71) bei einem Median von 0. Das Vorkommen von Fibronectin im Gefäßendothel ist ausgeprägt. Der aus der manuellen Auswertung resultierende Mean score beträgt 1,58 (95% CI: 1,45 bis 1,70) bei einem Median von 2.

### 3.10.2 Vergleich Primärtumor und Metastase

Die mittlere Intensität der Primärtumore liegt bei 0,32 (95% CI: 0,03 bis 0,60) und die der zugehörigen Metastasen bei 0,64 (95% CI: 0,17 bis 1,10). Nur 12 Fälle (negatives Signal) entsprechen sich. Der Kappa-Wert von 0 belegt die schlechte Übereinstimmung.

### 3.10.3 Korrelation mit der Tumorentität

In der manuellen Auswertung ergeben sich folgende Ergebnisse:

| Tumorentität          | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | Gefäße Mean score (95% CI) |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Gastrointestinaltrakt | 0,17<br>(0 - 0,53)             | 0,17<br>(0 - 0,53)        | 1,64<br>(1,18 - 2,0)       |
| CUP                   | 2,09<br>(1,39 - 2,79)          | 1,55<br>(0,92 - 2,17)     | 2,0<br>(2,0 - 2,0)         |
| Lunge                 | 0,36<br>(0,10 - 0,61)          | 0,24<br>(0,07 - 0,40)     | 1,43<br>(1,18 - 1,68)      |
| Mamma                 | 0,73<br>(0,23 - 1,22)          | 0,50<br>(0,14 - 0,86)     | 1,43<br>(1,09 - 1,77)      |
| Niere                 | 0,56<br>(0 - 1,11)             | 0,67<br>(0 - 1,33)        | 1,78<br>(1,44 - 2,12)      |
| Prostata              | 0,91<br>(0,15 - 1,67)          | 0,73<br>(0 - 1,53)        | 1,64<br>(1,18 - 2,09)      |

**Tabelle 32: Darstellung der Ergebnisse der manuellen Auswertung nach Herkunft in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse des Integrinliganden Fibronectin.**

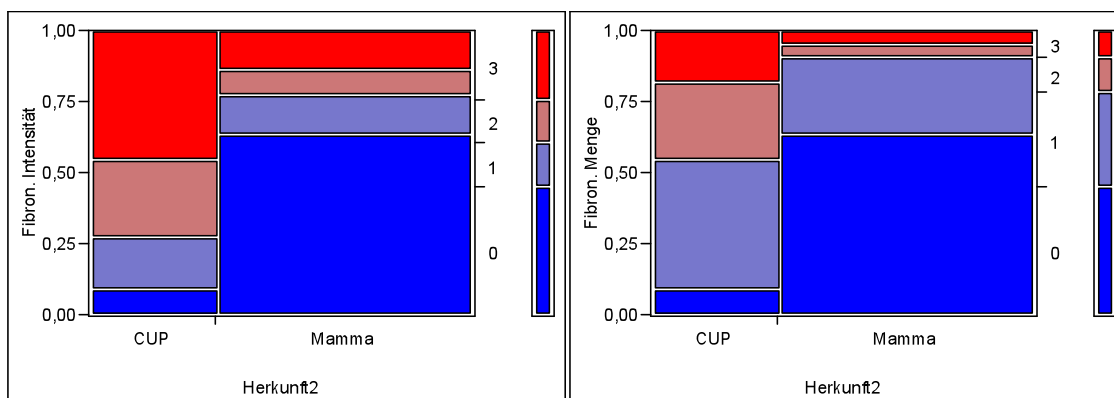
In dieser Studie wird der Ligand Fibronectin besonders in Metastasen, deren Ursprungsorgan nicht ermittelbar war, den sogenannten CUP-Tumoren,

exprimiert. Unter den 11 CUP-Tumoren zeigen sich 5 Fälle (45,45%) stark positiv, 3 Fälle (27,27%) moderat positiv, 2 Fälle (18,18%) schwach positiv und nur 1 Fall negativ (9,09%). Ein ebenfalls höheres Vorkommen an Fibronectin wird in Metastasen aus der Prostata detektiert. Das schwächste Signal findet sich bei den Tumoren aus dem Gastrointestinaltrakt. Demzufolge errechnen sich für die Gruppenvergleiche folgende signifikante beziehungsweise hoch signifikante Werte:

| Tumorentitäten             | p-Wert (Intensität) | p-Wert (Menge) | p-Wert (Gefäße) |
|----------------------------|---------------------|----------------|-----------------|
| Niere-CUP                  | 0,0327              | n.s.           | n.s.            |
| CUP-Mamma                  | 0,0227              | 0,0173         | 0,0376          |
| CUP- Gastrointestinaltrakt | 0,001               | 0,001          | n.s.            |
| CUP-Lunge                  | <0,0001             | <0,0001        | 0,0497          |
| CUP-Prostata               | n.s.                | 0,0461         | n.s.            |

**Tabelle 33: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Herkunft in Mengen-, Intensitäts und Endothelanalyse für Fibronectin (n.s.= nicht signifikant).**

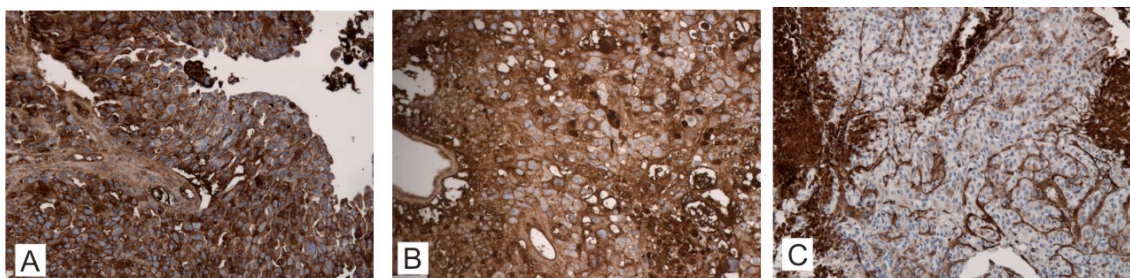
Die computerbasierte Auswertung deckt sich mit den manuellen Resultaten. Der niedrigste Histoscore errechnet sich ebenfalls bei den Metastasen aus dem Gastrointestinaltrakt mit einem Mean score von 80,33 (95% CI: 0,06 bis 160,61), gefolgt von Metastasen aus der Lunge (Mean score: 105,75; 95% CI: 91,36 bis 120,14). Metastasen aus der Brust zeigen einen Mean score von 128,8 (95% CI: 95,69 bis 161,91) auf.



**Abbildung 27: Darstellung der signifikant unterschiedlichen Fibronectinexpression im paarweisen Vergleich von CUP-Tumoren und zerebralen Metastasen des Mammakarzinoms als Mosaikplot in Intensitätsanalyse (links) und Mengenanalyse (rechts) der**

manuellen Auswertung. In beiden Fällen weisen die CUP-Tumore signifikant höhere Scorewerte auf.

Auffällig zeigen sich bei der manuellen Auswertung Metastasen embryonaler Hodentumore, die wegen zu geringer Fallzahl (2 Fälle) bei den oben beschriebenen Integrinsubtypen nicht in die Analyse mit einbezogen wurden. Beide Fälle zeigen eine starke Intensität des Signals für Fibronectin und scheinen somit, wie auch die CUP-Tumore, im Zusammenhang mit einer starken Fibronectinexpression zu stehen.



**Abbildung 28: Immunhistochemie Fibronectin mit 20facher Vergrößerung:**

**A: CUP-Tumor; Intensitätsscore 3**

**B: embryonales Hodenkarzinom Score 3**

**C: Metastase aus der Niere; Intensitätsscore 1**

### 3.10.4 Korrelation mit der Tumorphistologie

Histologisch aufgegliedert gehen bei der manuellen Auswertung der Fibronectinexpressionen folgende Resultate hervor:

| Histologischer Typ     | Anzahl der Fälle | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | Gefäße Mean score (95% CI) |
|------------------------|------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Adenokarzinom          | 87*              | 0,61<br>(0,39 - 0,83)          | 0,47<br>(0,28 - 0,66)     | 1,49<br>(1,34 - 1,65)      |
| Plattenepithelkarzinom | 6                | 0,50<br>(0 - 1,38)             | 0,33<br>(0 - 0,88)        | 1,33<br>(0,48 - 2,19)      |
| Kleinzeller            | 5                | 0,8<br>(0 - 2,42)              | 0,4<br>(0 - 1,08)         | 2,0<br>(2,0 - 2,0)         |
| Klarzelliges Karzinom  | 8                | 0,75<br>(0,16 - 1,34)          | 1,0<br>(0,23 -1,77)       | 1,88<br>(1,58 - 2,17)      |

**Tabelle 34: Darstellung der Mittelwerte der manuellen Auswertung in Intensitäts- und Mengenanalyse der Tumorzellen, sowie der Fibronectinexpression im Endothel der Gefäße nach Histologie (\*Gefäßauswertung: 85 Fälle).**

Ein sehr signifikanter beziehungsweise signifikanter Unterschied zeigt sich in der Intensitäts- und Mengenanalyse zwischen Adenokarzinomen und klarzelligeren Karzinomen (Intensität:  $p=0,0018$ ; Menge:  $p= 0,0302$ ). Es lassen sich keine weiteren bemerkenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Histologieformen erkennen. Auch scheint die histologische Klassifikation keinen Einfluß auf das Fibronectinvorkommen am Gefäßendothel zu haben.

### 3.10.5 Korrelation mit der Metastasenlokalisierung

Im Vergleich der Intensitätsscores ergibt sich im Gesamtvergleich ein p-Wert von 0,6686 und auch in den paarweisen Vergleichen errechnen sich keine signifikanten Unterschiede. Die stärkste Intensität liegt bei zerebellären Metastasen vor (Mean score: 0,82; 95% CI: 0,44 bis 1,19).

### 3.10.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad

| Differenzierungsgrad | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | Gefäße Mean score (95% CI) |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Gut                  | 0,60<br>(0 - 1,71)             | 0,60<br>(0 - 1,71)        | 1,50<br>(0,58 - 2,42)      |
| Mäßig                | 0,65<br>(0,40 - 0,90)          | 0,60<br>(0,33 - 0,80)     | 1,61<br>(1,45 - 1,77)      |
| wenig                | 0,73<br>(0,38 - 1,09)          | 0,49<br>(0,23 - 0,75)     | 1,53<br>(1,31 - 1,76)      |

**Tabelle 35: Mittelwerte der Intensitäts-, Mengen- und Gefäßanalyse nach Differenzierungsgrad**

Bei Betrachtung der Mean scores der Intensitätsanalyse lässt sich eine aufsteigende Expressionstendenz von gut in Richtung wenig differenzierten Metastasen erkennen. Diese Tendenz ist jedoch nicht signifikant (p-Werte: gut-mäßig: 0,8288; mäßig-wenig: 0,2732; gut-wenig: 0,4008). Vergleichbare Resultate zeigen sich auch in der Mengenanalyse. Aufgrund der nicht signifikanten Unterschiede ist die Fibronectinexpression vom Differenzierungsgrad unabhängig anzusehen.

## **3.11 Fibrinogen**

### **3.11.1 Expressionsmuster und Färbesignal**

Fibrinogen beschränkt sich in seiner Expression, wie auch Fibronectin, hauptsächlich auf das Stromagewebe. Im Gegensatz zu Fibronectin erweisen sich Fibrozyten jedoch als negativ für Fibrinogen. Bindegewebsfasern des Interstitiums sowie Tumorsepten lassen sich mit Anti-Fibrinogen-Antikörpern stark färben. In der manuellen Auswertung präsentiert sich die Intensität des neoplastischen Epithels mit einem Mean score von 0,55 (95% CI: 0,40 bis 0,70) noch geringer als die Fibronectindichte. Insgesamt liegen 21 moderat gefärbte Fälle (18,26%), 15 schwach gefärbte (13,04%) und 79 negative Fälle (68,70%) im untersuchten Kollektiv vor. Im Gegensatz zu Fibronectin tut sich bei der mikroskopischen Bewertung kein Fall mit stark gefärbtem Gewebeausschnitt (das heißt score 3) hervor. Der Anteil der als positiv detektierten Karzinomzellen ist mit einem Mean score von 0,39 (95% CI: 0,28 bis 0,50) und einem Median von 0 ebenfalls geringer als bei dem untersuchten Liganden Fibronectin. In nur 2 Fällen (1,74%) ergibt sich ein Anteil der positiven Zellen von 50-74%, in ebenfalls 2 Fällen (1,74%) von 25-49% und in 32 Fällen (27,83%) stellen sich 0-24% der Zellen gefärbt dar. Das Gefäßendothel zeigt ein starkes Fibrinogen-Vorkommen. Der Mean score beträgt 0,98 (95% CI: 0,85 bis 1,1) bei einem Median von 1. In nur 28 Fällen (24,78%) ist das Gefäßendothel negativ.

### **3.11.2 Vergleich Primärtumor und Metastase**

Wie auch bei der Fibronectinfärbung beobachtet, liegt der Mean score der Intensitäten für Fibrinogen bei den Primärtumoren niedriger als bei den korrespondierenden Metastasen (Primärtumore Mean score: 0,18; 95% CI: 0 bis 0,44; Metastasen: Mean score: 0,82; 95% CI: 0,39 bis 1,24). Es ergibt sich jedoch keine statistische Signifikanz ( $p=0,7948$ ). Auch bei der Betrachtung der Gefäßendothelien errechnet sich kein signifikanter Unterschied. Bei den Primärtumoren ergibt sich ein Mean score von 0,86 (95% CI: 0,52 bis 1,21) bei einem Median von 1, während bei den Gehirnmetastasen ein höherer Mean score von 1,41 (95% CI: 1,08 bis 1,73) und ein Median von 2 aus der Untersuchung resultiert (nicht signifikant:  $p=0,1043$ ).

### 3.11.3 Korrelation mit der Tumorentität

In der computerbasierten Analyse ergeben sich für die Metastasen aus dem Gastrointestinaltrakt ein Mean score von 53,83 (95% CI: 39,44 bis 68,23) und für die Metastasen aus der Lunge ein Mean score von 77,15 (95% CI: 62,07 bis 92,03). Bei den Metastasen aus der Brust liegt ein Mean score von 72,45 (95% CI: 49,82 bis 95,08) vor. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Entitäten sind statistisch nicht signifikant. Die manuelle Auswertung liefert bezüglich der Antikörperverteilung der einzelnen Entitäten ebenfalls schwache Ergebnisse (Tabelle 36):

| Tumorentität          | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | Gefäße Mean score (95% CI) |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Gastrointestinaltrakt | 0,25<br>(0 - 0,54)             | 0,25<br>(0 - 0,54)        | 1,27<br>(0,67 - 1,88)      |
| CUP                   | 0,36<br>(0 - 0,82)             | 0,27<br>(0 - 0,59)        | 1,36<br>(0,82 - 1,91)      |
| Lunge                 | 0,57<br>(0,30 - 0,84)          | 0,40<br>(0,20 - 0,61)     | 1,12<br>(0,84 - 1,40)      |
| Mamma                 | 0,36<br>(0,04 - 0,69)          | 0,23<br>(0,04 - 0,42)     | 1,19<br>(0,79 - 1,59)      |
| Niere                 | 0,44<br>(0 - 1,0)              | 0,56<br>(0 - 1,33)        | 1,78<br>(1,44 - 2,12)      |
| Prostata              | 0,91<br>(0,28 - 1,54)          | 0,64<br>(0,18 - 1,09)     | 1,73<br>(1,29 - 2,16)      |

**Tabelle 36: Darstellung der Ergebnisse der manuellen Auswertung nach Herkunft in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse des Integrinliganden Fibrinogen.**

Wie auch bei Fibronectin stellen sich Metastasen aus dem Gastrointestinaltrakt mit der geringsten Antikörperdichte dar. Die Intensität und Menge in Proben von CUP ist jedoch im Gegensatz zu Fibronectin eher gering. In Metastasen aus der Prostata ergibt sich die höchste Intensität und Menge. In Metastasen aus der Niere kommt der Ligand Fibrinogen am Gefäßendothel am stärksten vor. Im Vergleich aller Entitäten zeichnen sich in den Kontingenztabelle folgende Werte ab: Intensität:  $p=0,1753$ , Menge:  $p=0,8362$ , Gefäße:  $p=0,4875$ . Auch im paarweisen Vergleich zeigt sich keine statistische Signifikanz ( $p$ -Werte für die manuelle Auswertung im Anhang unter I.2 und für die digitale Auswertung unter

II.1). Embryonale Tumore weisen, im Gegensatz zu Fibronectin, für den Liganden Fibrinogen kein Signal auf.

### 3.11.4 Korrelation mit der Tumorhistologie

Der Vergleich der unterschiedlichen Histologieformen (Tabelle 38) ergibt in der Analyse der Intensitäten die stärkste Fibrinogendichte in Plattenepithelkarzinomen. Innerhalb der Plattenepithelkarzinome wird in 4 Fällen (66,67%) eine moderate Intensität und in 2 Fällen (33,33%) kein Signal detektiert. Auch im Mengenvergleich liegen die Plattenepithelkarzinome am höchsten. Es scheint also auch in Plattenepithelkarzinomen nur in wenigen Zellen Fibrinogen vorhanden zu sein. Die stärkste Fibrinogenexpression am Gefäßendothel wird in klarzelligem Karzinomen detektiert. Signifikante Resultate sind in Tabelle 38 dargestellt.

| Histologischer Typ     | Anzahl der Fälle | Intensität Mean score (95% CI) | Menge Mean score (95% CI) | GefäÙe Mean score (95% CI) |
|------------------------|------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Adenokarzinom          | 87*              | 0,54<br>(0,37 - 0,71)          | 0,38<br>(0,25 - 0,51)     | 1,21<br>(1,02 - 1,4)       |
| Plattenepithelkarzinom | 6                | 1,33<br>(0,25 - 2,42)          | 0,67<br>(0,12 - 1,21)     | 1,33<br>(0,25 - 2,42)      |
| Kleinzeller            | 5                | 0,40<br>(0 - 1,08)             | 0,40<br>(0 - 1,08)        | 1,6<br>(0,92 - 2,28)       |
| Klarzelliges Karzinom  | 8                | 0,25<br>(0 - 0,64)             | 0,5<br>(0 - 1,39)         | 2,0<br>(2,0 - 2,0)         |

**Tabelle 37: Darstellung der Ergebnisse der manuellen Auswertung nach Histologie in Intensitäts-, Mengen- und Endothelanalyse des Integrinliganden Fibrinogen (\*Gefäßauswertung: 85 Fälle).**

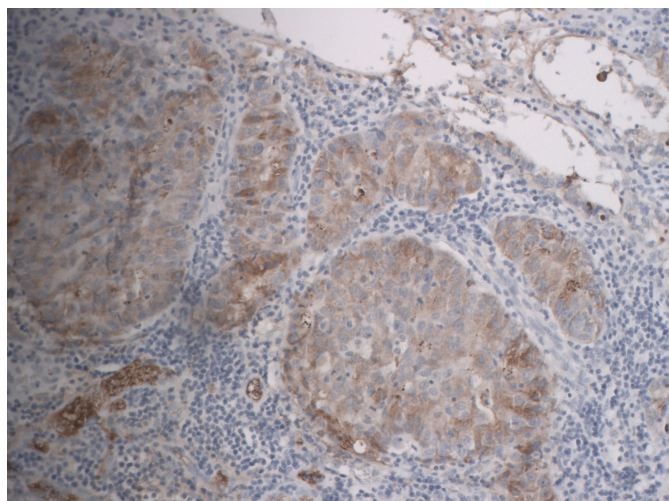
Es ergeben sich folgende signifikanten Werte:

| Histologieformen                             | p-Wert (Intensität) | p-Wert (GefäÙe) |
|--|---------------------|-----------------|
| Klarzelliges Karzinom-Adenokarzinom          | n.s.                | 0,0272          |
| Klarzelliges Karzinom-Plattenepithelkarzinom | 0,0195              | n.s.            |
| Plattenepithelkarzinom-Adenokarzinom         | 0,0344              | n.s.            |



|  |       |      |
|--|-------|------|
| Kleinzeller-<br>Plattenepithelkarzinom | 0,046 | n.s. |
|--|-------|------|

**Tabelle 38: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Histologie in Intensitäts- und Gefäßanalyse (n.s.= nicht signifikant).**



**Abbildung 29: Immunhistochemie für Fibrinogen mit 20facher Vergrößerung: Metastase eines Plattenepithelkarzinoms aus der Lunge (inflammatorische Zellen des Stromas sind negativ).**

### 3.11.5 Korrelation mit der Tumorlokalisation

Der Ligand Fibrinogen kommt am häufigsten in spinalen Metastasen vor. Wegen zu hoher Standardabweichung resultiert jedoch keine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen.

| Lokalisation | Intensität Mean score<br>(95% CI) | Menge Mean score<br>(95% CI) |
|--------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Zerebral     | 0,49<br>(0,32 - 0,67)             | 0,38<br>(0,23 - 0,52)        |
| Zerebellär   | 0,55<br>(0,27 - 0,84)             | 0,37<br>(0,17 - 0,56)        |
| spinal       | 1,14<br>(0,31 - 1,98)             | 0,71<br>(0,26 - 1,17)        |

**Tabelle 39: Darstellung der Resultate in Intensitäts- und Mengenanalyse nach Lokalisation.**

### **3.11.6 Korrelation mit dem Differenzierungsgrad**

Bei der Analyse der Intensitäten ist eine absteigende Tendenz von den gut differenzierten Metastasen zu den wenig differenzierten Metastasen vorhanden. Der Mean score der gut differenzierten Metastasen liegt bei 0,6 (95% CI: 0 bis 1,71), der Mean score der mäßig differenzierten Metastasen bei 0,54 (95% CI: 0,33 bis 0,74) und der Mean score der wenig differenzierten bei 0,47 (95% CI: 0,24 bis 0,69). Aus diesen Werten gehen jedoch keine signifikanten Unterschiede hervor ( $p=0,9098$ ).

### **3.12 Multivariate Integrinintensität der digitalen Analyse**

In der paarweisen Korrelationsanalyse werden die Histoscores der einzelnen Integrine verglichen. Aus dem Ergebnis erschließt sich eine signifikant positive Korrelation zwischen Fibronectin und Fibrinogen ( $p=0,0001$ ),  $\alpha v$  und  $\alpha v\beta 6$  ( $p<0,0001$ ),  $\alpha v\beta 8$  und  $\alpha v\beta 6$  ( $p=0,011$ ),  $\alpha v\beta 5$  und Fibronectin ( $p=0,0319$ ),  $\alpha v\beta 5$  und  $\alpha v\beta 6$  ( $p=0,0049$ ),  $\alpha v\beta 5$  und  $\alpha v$  ( $p=0,0007$ ) sowie  $\alpha v\beta 3$  und Fibrinogen ( $p<0,0001$ ) und eine negative Korrelation von  $\alpha v\beta 5$  und CytoB3 ( $p=0,0083$ ). Dies deutet darauf hin, dass zwischen den einzelnen Integrinen Zusammenhänge bestehen, die beispielsweise auf einer gemeinsamen Regulation beruhen könnten. Zur graphischen Veranschaulichung der paarweisen Zusammenhänge ist zusätzlich noch eine Scatterplot Matrix im Anhang unter III.2 beigelegt. Ferner befinden sich im Anhang noch die weiteren p-Werte der paarweisen Korrelationsanalyse unter III.1.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Immunhistochemie: manuelle versus computerbasierte Auswertung**

Die Immunhistochemie ist eine in der Pathologie etablierte und routinemäßig angewandte Methode zur Feststellung bestimmter Expressionsmuster spezifischer Proteine wie beispielsweise Rezeptoren und Rezeptorliganden auf formalinfixierten Gewebeschnitten. Für die Auswertung der gefärbten Schnitte

wird zurzeit noch die subjektive Einteilung der Schnitte durch den Pathologen in definierte Intensitätsscores als Goldstandard betrachtet. Für die Integrinsubtypen und Integrinliganden hat sich aufgrund der überwiegend diffus imponierenden cytoplasmatischen Anfärbung ein semiquantitativer Ansatz mit einem Score von 0 bis 3 für die Intensität der Färbung bewährt. Dies hat sich auch in anderen Studien bestätigt (Sipos et al, 2006; Schittenhelm et al, 2009). Mit der Einführung von Videokameras in den frühen 1980er Jahren und der ersten digitalen Scanner (2001) wurden neue Wege der Kommunikation und Diskussion innerhalb der Diagnosestellung, Lehre und Forschung geschaffen (Yagi et al, 2005; Huismann et al, 2010). Auch der Bereich der digitalen Bildanalyse wurde als neue, zukunftsorientierte Methode der Auswertung in einigen Studien wie zum Beispiel von Lloyd et al verwendet und geprüft (Lloyd et al, 2010). Die Herausforderung der Bewertung von immunhistochemischen Färbungen liegt dabei sowohl in der Heterogenität der Färbeintensität innerhalb eines Gewebeschnittes als auch in der beobachterabhängigen Wahrnehmung und Scorezuteilung des Tumorareals. Die digitale, computerbasierte Bildanalyse, in dieser Arbeit mittels der Software „Definiens Tissue Studio Version 2.0“, stellt einen Versuch dar, die immunhistochemische Färbung objektiv und leicht reproduzierbar mittels neuer Algorithmen auszuwerten. Diese Beobachterunabhängigkeit stellt den größten Vorteil der Methode dar. Zu erwähnen ist natürlich auch eine kürzere Auswertungszeit, die dem Beurteiler beispielsweise mehr Raum für eine sorgfältige Schnittausswahl oder die Überprüfung der Ergebnisse lässt. Denn ist die Software erst einmal auf das Erkennen von Zellen und Zellkernen trainiert, und sind die spezifischen Färbereigenschaften kalibriert, wird der Beurteiler nur noch benötigt, um die zu untersuchende Region zu definieren und nach Abschluss der automatisierten Untersuchungen die Resultate zu validieren. Als wichtig hat sich in dieser Studie die Markierung einer „Region of interest“ erwiesen, da nicht nur Tumorzellen sondern auch andere Zellen des Bindegewebes und des ZNS Integrine exprimieren und das von der Software bislang nicht zuverlässig unterschieden werden kann. Problematisch zeigt sich dabei allerdings, dass durch die Markierung einer zu klein gewählten ROI innerhalb eines sehr heterogen gefärbten Tumorareals die Anzahl der gefärbten

Zellen nicht für den gesamten Schnitt repräsentativ sein kann, da diese Markierung beobachterabhängig durchgeführt wird. Das Ergebnis ist dennoch objektiver als bei einer alleinigen visuellen Auswertung und durch die kontinuierliche Ergebnisskala auch als präziser zu betrachten. Positiv ist auch zu bemerken, dass die Software für jeden analysierten Bereich mehrere Werte errechnet und man so je nach Bedarf unterschiedliche Aspekte ein und derselben Auswertung betrachten kann. Hier wurde aus praktischen Gründen der Histoscore als Maß für die Intensität verwendet. Dieser bezieht sich auf die als gefärbt klassifizierten Zellen und berechnet sich wie folgt:  $1 \times \text{schwach gefärbte Zellen (\%)} + 2 \times \text{moderat gefärbte Zellen (\%)} + 3 \times \text{stark gefärbte Zellen (\%)}$ .

Es muss dementsprechend beachtet werden, vor allem bei einem hohen Anteil an negativen Zellen, dass der Histoscore nur für den gefärbten Bereich repräsentativ ist und nicht für das gesamte Tumorareal. In dieser Studie zeigt sich dennoch eine hoch signifikante positive Korrelation zwischen der digitalen Bildanalyse und der manuellen Auswertung, was die Effizienz und Sorgfalt der Software bestätigt, aber auch keinen Unterschied im Vergleich zu den Ergebnissen der manuellen Auswertung erkennen lässt. Studien, die die beiden Methoden zur Feststellung des Östrogenrezeptorstatus untersuchten, kamen auf ähnliche Ergebnisse (Mofidi et al, 2003; Kohlberger et al, 1999). Natürlich ist ein gewisser benötigter Zeitaufwand für eine intensive Einarbeitung in die Softwarehandhabung nachteilig zu erwähnen, der jedoch schon nach kurzer Zeit durch die schnelle Verarbeitung einer großen Datenmenge mittels DTS bei ausreichend hohen Fallzahlen wieder eingeholt werden kann. Wichtig ist die Verwendung und Qualitätssicherung der Software durch einen erfahrenen und routinierten Pathologen. Ist diese Voraussetzung gegeben, ist der Einsatz der Software „Definiens Tissue Studio“ in der pathologischen Routinediagnostik für bestimmte Fragestellungen vielversprechend, da in kürzerer Zeit konstant präzisere und objektivere Ergebnisse erzielt werden können.

## 4.2 $\alpha\beta 8$

### 4.2.1 Expressionsmuster und Funktion als Gefäßregulator

Das Karzinomepithel der meisten zerebralen Metastasen zeigt nur eine sehr schwache  $\alpha\beta 8$ -Expression und auch die Gefäßendothelien sind für den Integrinkomplex  $\alpha\beta 8$  negativ. Hingegen erweist sich das die Metastasen umgebende ZNS-Gewebe als stark positiv. Beschrieben wurde diese Tatsache bereits 1991 von Moyle et al, die in Tiergeweben eine höhere Expressionsrate der mRNA der Beta8-Untereinheit im ZNS als in allen anderen Organen feststellten (Moyle et al, 1991). Der Vergleich der einzelnen Karzinome bezogen auf das Herkunftsorgan ergibt in dieser Studie keinen signifikanten Unterschied. Innerhalb des ZNS wird  $\alpha\beta 8$  stärker von Gliazellen, vor allem Astrozyten, als von Neuronen selbst sezerniert (Nishimura et al, 1998). Nishimura et al bestätigen in ihrer Arbeit ebenfalls die Negativität des Endothels für  $\alpha\beta 8$ . Obwohl die Gefäße selbst das Integrin nicht exprimieren, wird  $\alpha\beta 8$  in der Literatur als zentraler Regulator in der Gefäßversorgung beschrieben. Über parakrine Signalwege zwischen Astrozyten und Endothelzellen wird die Gefäßentwicklung beeinflusst (Cambier et al, 2005) und so wird Beta8 unter anderem auch als wichtiger Faktor für die Gefäßausbildung während der embryonalen Entwicklung des ZNS beschrieben (McCarty et al, 2002; Proctor et al, 2005), während den Untereinheiten Beta3, Beta5 und Beta6 diese Funktion nicht zukommt. Die höchste  $\alpha\beta 8$ -Expression wird in dieser Arbeit bei Metastasen aus der Niere beobachtet (Mean score: 0,89). Diese Daten werden von der bestehenden Literatur in ihrer Aussagekraft untermauert und die Niere darin als Ort für das zweithäufigste Vorkommen von  $\alpha\beta 8$  nach dem ZNS beschrieben (Khan et al, 2011). Laut Khan et al wird  $\alpha\beta 8$  hauptsächlich von den Mesangiumzellen exprimiert, die dicht neben den glomerulären Endothelzellen liegen und über parakrine Mechanismen die Anordnung der Kapillaren regulieren.  $\alpha\beta 8$  scheint in der Niere also auch, wie im ZNS, die Rolle des Gefäßstabilisators zu übernehmen. Eine hohe  $\alpha\beta 8$ -Expression liegt daher vermutlich besonders in Organen mit hohen Durchblutungsanforderungen und engmaschiger Gefäßregulation vor.

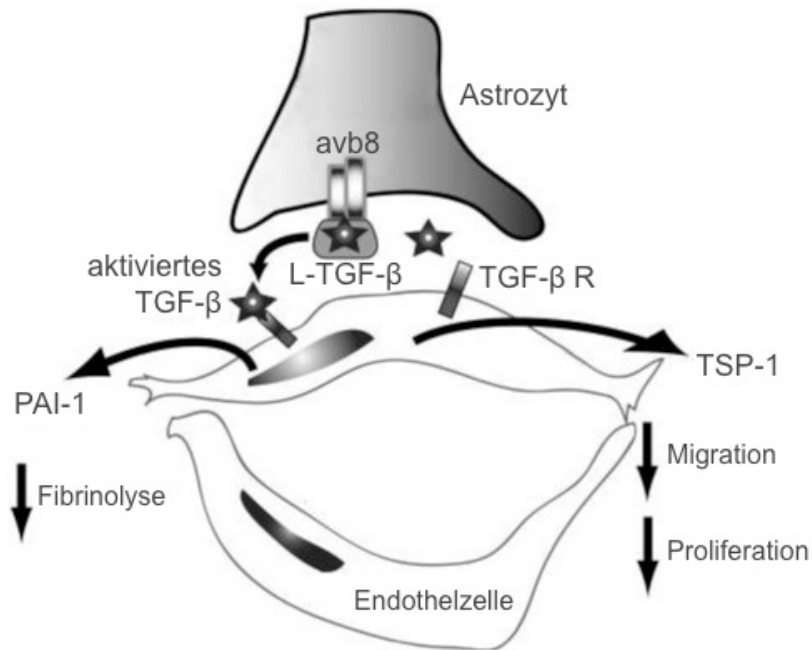
#### **4.2.2 $\alpha\beta 8$ und maligne Tumore: Unterschied zwischen hirneigenen Tumoren und zerebralen Metastasen**

Die Rolle von  $\alpha\beta 8$  in der Karzinomentwicklung wurde in der Literatur bis jetzt nur wenig beschrieben und zeigt noch viele Erkenntnislücken. Eine mögliche Erklärung für die schwache Expression von  $\alpha\beta 8$  in Karzinomen im Vergleich zu Gliomen findet sich bei der Betrachtung von TGF $\beta 1$ , einem Hauptliganden von  $\alpha\beta 8$ . Der Aktivierung des Wachstumsfaktors TGF $\beta 1$  wird eine Schlüsselrolle in der Tumorentwicklung zugeordnet. TGF $\beta 1$  reguliert Differenzierung, Apoptose sowie die Synthese und den Abbau von Matrixproteinen. Der Wachstumsfaktor induziert Veränderungen der Tumorzellen und des umgebenden Bindegewebes, die für das Wandern und Eindringen von metastatischen Zellen erforderlich sind (Glick, 2004). TGF $\beta 1$  wurde früh als potenter Wachstumsinhibitor von Epithelzellen erkannt, der die Entstehung von Karzinomzellen verhindern soll. Paradoxerweise zeigt sich jedoch gerade in Karzinomen mit schlechter Prognose eine Überexpression dieses Faktors. TGF $\beta 1$  hat dementsprechend in manchen Karzinomen anstelle seiner wachstumshemmenden Funktion gegensätzliche proonkogene Eigenschaften (Glick, 2004). Im Frühstadium fungiert es als wichtiger Wachstumsinhibitor und im Spätstadium verstärkt es über epigenetische Mechanismen die Tumordinvasion (Akhurst und Balmain, 1999).

Möglicherweise lässt sich über diese beiden situations- und zelltypabhängigen gegensätzlichen Funktionen – Tumorsuppressor und Onkogen – auch die unterschiedliche  $\alpha\beta 8$ -Expression in Tumoren des ZNS und Karzinomen anderer Organe erklären. Hirneigene Tumore zeigen eine sehr starke  $\alpha\beta 8$ -Expression, während die zerebralen Metastasen in dieser Arbeit keine oder eine nur sehr schwache Expression aufweisen. Cambier et al zeigten, dass  $\alpha\beta 8$  im normalen Epithel der Atemwege exprimiert wird, aber im Lungenkarzinom fehlt oder herunterreguliert ist. Auch in dieser Arbeit kam  $\alpha\beta 8$  kaum in Metastasen des Lungenkarzinoms vor (Mean score Intensität: 0,55). Bei hoher Proliferation zeigt sich dort also eine geringe  $\alpha\beta 8$ -Expression. In der gesunden Lunge führt die  $\alpha\beta 8$ -vermittelte Aktivierung von TGF $\beta 1$  zur Verhinderung von Zellwachstum und Nishimura et al beschreiben generell das stärkste Vorkom-

men von  $\alpha\beta 8$  in nicht-proliferierenden Zelltypen (Nishimura et al, 1998). Trotz des sehr geringen  $\alpha\beta 8$ -Vorkommens in Metastasen (Mean score Intensität: 0,59) präsentiert sich in dieser Studie ein noch geringeres Vorkommen im Primärtumor (Mean score Intensität: 0,32). Dies lässt sich mit einer Studie von Picon et al vereinbaren, die mittels Immunhistochemie die TGF $\beta$ 1-Expression im Kolonkarzinom untersuchten und dabei die Expression in Primärtumor und Metastase verglichen. Sie konnten dabei in zirka 75% eine erhöhte TGF $\beta$ 1-Expression in den Metastasen feststellen (Picon et al, 1998). Daraus lässt sich schließen, dass TGF $\beta$ 1 in metastatischen Zellen vermutlich als Onkogen wirkt und so die verstärkte Proliferation und Metastasenbildung begünstigt. So lässt sich schlussfolgern, dass TGF $\beta$ 1 in Metastasen durch Hemmung bestimmter Regulationsmechanismen vermehrt exprimiert wird und durch positive Rückkopplung auch eine Hochregulation von  $\alpha\beta 8$  stattfindet.

Die  $\alpha\beta 8$ -Expression in hirneigenen Tumoren wurde von Tchaicha et al anhand des Glioblastoms beschrieben: Glioblastome sind gekennzeichnet durch starkes invasives Wachstum, eine hohe Rate an Gefäßproliferaten und Einblutungen.  $\alpha\beta 8$  wird dabei als Regulator sowohl für das invasive Wachstum als auch für die Angiogenese beschrieben. Es liegt eine schwache  $\alpha\beta 8$ -Expression bei gering invasiven Glioblastomen mit starker Angiogenese und eine sehr starke  $\alpha\beta 8$ -Expression bei stark invasiven Glioblastomen mit beschränkter Angiogenese vor (Tchaicha et al, 2011). In Glioblastomen scheint  $\alpha\beta 8$  daher die Tumorinvasivität positiv und die Angiogenese negativ zu regulieren. Die pathologische Gefäßneubildung und Hämorrhagien werden durch Herunterregulation des Gefäßstabilisators  $\alpha\beta 8$  von den Tumorzellen induziert während die Invasivität der Tumorzellen durch eine Hochregulation von  $\alpha\beta 8$  induziert wird (Tchaicha et al, 2010). Dies zeigt wieder die unterschiedlichen Funktionen (anti-proliferativ und proliferationsfördernd), die das Integrin situations- und zelltypabhängig über seinen Hauptliganden TGF $\beta$ 1 erfüllen kann und erklärt auch die deutlich reduzierte Expression von  $\alpha\beta 8$  in ZNS-Karzinommetastasen.



**Abbildung 30: Modell der Gefäßregulierung über  $\alpha v \beta 8$ -vermittelte Aktivierung von TGF $\beta$ .** Die Vorstufe L-TGF- $\beta$  (latentes TGF $\beta$ ) bindet an das Integrin  $\alpha v \beta 8$  und wird dadurch aktiviert. Durch die Bindung von TGF- $\beta$  an einen Rezeptor der Endothelzelle (TGF- $\beta$  R) kommt es zur Freisetzung von PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) und TSP-1 (Thrombospondin-1), die die Migration, Proliferation und lokale Fibrinolyse herabsetzen. Die Abbildung verdeutlicht die stabilisierende Wirkung von  $\alpha v \beta 8$  auf die zerebrale Blutversorgung. Bei Verlust oder Herunterregulierung von  $\alpha v \beta 8$  kann es daher zu Angiogenese, Gefäßwandverdickung oder Gefäßanomalien kommen (in Anlehnung an Cambier et al, 2005).

## 4.3 $\alpha v \beta 6$

### 4.3.1 Expressionsmuster und Rolle in der Epitheldifferenzierung

Die  $\alpha v \beta 6$ -Expression ist beschränkt auf die neoplastischen Epithelzellen und zeigt dort hauptsächlich eine cytoplasmatische und zum Teil membranassoziierte immunhistochemische Färbereaktion. Das ZNS-Gewebe erweist sich hingegen als negativ für  $\alpha v \beta 6$ . Im Gegensatz zum Integrin  $\alpha v \beta 8$ , das im gesunden Epithel stärker exprimiert wird und dort anti-proliferative Funktionen aufweist, wird  $\alpha v \beta 6$  nicht oder nur sehr schwach vom gesunden Epithel gebildet. Bei Wundheilungsprozessen und in Karzinomen wird es jedoch hochreguliert (Bandyopadhyay et al, 2009). Die proliferative Wirkung von  $\alpha v \beta 6$  wird in dieser Studie durch eine hohe Dichte des Rezeptors im Karzinomepithel



bestärkt. Sowohl in der Intensitäts- als auch in der Mengenanalyse gehört  $\alpha\beta6$  zu den drei am stärksten exprimierten Integrinen in den zerebralen Karzinommetastasen (Mean score Intensität: 1,66; Mean score Menge: 1,66). Dies wird auch durch die digitale Analyse mittels DTS untermauert. Die Gefäßendothelien zeigen hingegen keine Expression von  $\alpha\beta6$  und im Gegensatz zu  $\alpha\beta8$  wird in der Literatur auch kein Effekt von  $\alpha\beta6$  auf die Gefäße beschrieben. Es lässt sich in dieser Studie auch kein Zusammenhang zwischen den klinischen Daten Alter und Geschlecht und der  $\alpha\beta6$ -Expression herstellen. Dies wird durch ähnliche Beobachtungen von Arihiro et al für die  $\alpha\beta6$ -Expression in Brustkarzinomen bestärkt (Arihiro et al, 2000). Zwischen Primärtumor und Metastase zeigt sich in dieser Arbeit keine Übereinstimmung. In Metastasen (Mean score Intensität: 1,68) wird ein schwächeres Signal detektiert als in den Primärtumoren (Mean score Intensität: 2,27). Prudkin et al untersuchten die  $\alpha\beta6$ -Expression in Lungenkarzinomen und in aus der Lunge kommenden Gehirnmetastasen mittels Immunhistochemie in paraffinfixiertem Gewebe und kamen zu gleichen Ergebnissen (Prudkin et al, 2009). Es lässt sich hier die Hypothese aufstellen, dass die  $\alpha\beta6$ -Expression in Karzinom-Metastasen durch Abnahme beziehungsweise Verlust von Adhäsions- und Zell-Zell-Kontakten herunterreguliert ist. Bei Prudkin et al ließ sich zusammen mit der Herunterregulation von  $\alpha\beta6$  in Gehirnmetastasen auch eine Herunterregulation von Adhäsionsproteinen feststellen. Das verdeutlicht, dass eine Abnahme von Adhäsions- und Zell-Zell-Kontakten in der Regel mit einer Abnahme von  $\alpha\beta6$  vergesellschaftet ist. Auch zeigt sich hier die höchste  $\alpha\beta6$ -Expression in gut differenzierten Tumoren, was vermuten lässt, dass  $\alpha\beta6$  an der Karzinomdifferenzierung beteiligt ist, zum Beispiel über die Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten (Prudkin et al, 2009). Auch in einer Studie von Sipos et al an Adenokarzinomen des Gastrointestinaltraktes wird  $\alpha\beta6$  in den gut differenzierten Karzinomen am stärksten exprimiert (Sipos et al, 2004). Möglicherweise ist daher die Herunterregulation von  $\alpha\beta6$  in Hirnmetastasen zum Teil auch durch eine Dedifferenzierung der Hirnmetastasen im Vergleich zu den Primärtumoren bedingt.

#### 4.3.2 Vergleich der unterschiedlichen Entitäten und Histologieformen

In der Literatur wird die  $\alpha\beta6$ -Expression bisher vor allem in Karzinomen der Lunge (Prudkin et al, 2009), der Brust (Arihiro et al, 2000), des Gastrointestinaltrakts (Sipos et al, 2004; Bates et al, 2005), des Ovars (Ahmed et al, 2002) und Endometriums (Hecht et al, 2008) und in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (Thomas et al, 2000) untersucht. Dort ergibt sich ebenfalls eine Überexpression des Integrins  $\alpha\beta6$  in neoplastischem Gewebe. In dieser Studie zeigen sich teils starke Unterschiede zwischen den einzelnen Entitäten und Histologieformen. Metastasen aus der Niere (Mean score Intensität: 0,44) und aus der Prostata (Mean score Intensität: 0) exprimieren  $\alpha\beta6$  gar nicht oder nur sehr schwach. Das stärkste  $\alpha\beta6$ -Vorkommen präsentiert sich in Metastasen aus dem Gastrointestinaltrakt (Mean score Intensität: 2,17). Im paarweisen Vergleich ergeben sich einige signifikante Unterschiede zwischen den Entitäten. Im Gegensatz zu  $\alpha\beta8$ , das am stärksten in Metastasen aus der Niere vorkommt, zeigt  $\alpha\beta6$  dort nur ein schwaches Signal. Eine wichtige Tatsache, die das Integrin  $\alpha\beta6$  von  $\alpha\beta8$  unterscheidet, ist dessen fehlender Einfluss auf die Gefäßproliferation. Möglicherweise liegt in diesem Unterschied die fehlende  $\alpha\beta6$ -Expression in der Niere begründet. In der Literatur ist nach meinem Wissen nichts über das Vorkommen von  $\alpha\beta6$  in der Niere beschrieben. Auch in hirneigenen Tumoren fehlt die  $\alpha\beta6$ -Expression, wohingegen  $\alpha\beta8$  stark hochreguliert ist (Hochschuldissertationsschrift Schwab, 2012).

Es zeigt sich des Weiteren in dieser Arbeit ein signifikanter Unterschied in der Menge der  $\alpha\beta6$ -Expression zwischen den Adenokarzinomen und den klarzelligeren Karzinomen ( $p= 0,0161$ ). Dies steht natürlich im Zusammenhang mit dem oben beschriebenen Unterschied zwischen den Nierenkarzinomen (welche in der aktuellen Studie überwiegend aus klarzelligen Nierenzellkarzinomen zusammengesetzt sind) und den anderen Entitäten. Hinzukommend resultiert bei den  $\alpha\beta6$ -Integrinen ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p= 0,0423$ ) in der Signalintensität zwischen den neuroendokrinen und den nicht neuroendokrinen Metastasen. Dabei liegt der Mean score in der Intensitätsanalyse bei den neuroendokrinen Tumoren bei nur 0,38, während der Mean score bei den nicht neuroendokrinen Tumoren bei 1,71 liegt. Dieser Unterschied wird auch von

Sipos et al beschrieben (Sipos et al, 2004), der die  $\alpha\beta6$ -Expression in Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts mittels Immunhistochemie untersucht hat. Da sich endokrine Zellen wie auch Neurone aus dem Neuroektoderm entwickeln und sich somit auch partiell in ihren Eigenschaften ähneln, erklärt sich so möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem Fehlen des Integrins  $\alpha\beta6$  in neuroendokrinen Karzinomen und dem Fehlen im ZNS-Gewebe. In der paarweisen Korrelationsanalyse der Histocores zeigt sich keine Korrelation zwischen  $\alpha\beta6$  und seinem Liganden Fibronectin. Somit wird die  $\alpha\beta6$ -Expression unabhängig von der Expression von Fibronectin reguliert. Diese Annahme wird in der Studie von Sipos et al bestätigt (Sipos et al, 2004). Es zeigt sich jedoch ein positiver Zusammenhang zwischen  $\alpha\gamma$  und  $\alpha\beta6$  ( $p < 0,0001$ ) und  $\alpha\beta8$  und  $\alpha\beta6$  ( $p = 0,011$ ). Da der Antikörper gegen  $\alpha\gamma$  natürlich auch an die  $\alpha\gamma$ -Untereinheit von  $\alpha\beta6$  bindet, ist das Färbesignal für  $\alpha\gamma$  auch von der  $\alpha\beta6$ -Expression abhängig und erklärt so die positive Korrelation. Ein Zusammenhang zwischen der  $\alpha\beta8$ - und  $\alpha\beta6$ -Expression ist möglicherweise über den gemeinsamen Liganden LAP-TGF $\beta$ 1 herzustellen, der zwar rezeptorabhängig unterschiedliche Funktionen aufweist, aber möglicherweise jeweils einen Teil zur Rezeptorregulation beiträgt.

## **4.4 $\alpha\beta3$ und CytoB3**

### **4.4.1 Expression und Funktion im Tumorphenchym**

Das Färbemuster des Antikörpers gegen das Integrin  $\alpha\beta3$  und des Antikörpers gegen dessen cytoplasmatische Beta-Einheit (CytoB3) ist ähnlich. Die Färbeintensität der Antikörper zeigt hingegen leichte Unterschiede. Der Antikörper gegen CytoB3 scheint eine etwas geringere Affinität zu haben. Es zeichnet sich in dieser Studie eine schwächere Signalstärke für CytoB3 (Mean score: 0,28) als für  $\alpha\beta3$  (Mean score: 0,69) ab. Die immunhistochemische Färbung Anti-CytoB3 demonstriert in dieser Arbeit insgesamt die schwächste Färbeintensität. Generell lässt sich hier sagen, dass sowohl die Expression von  $\alpha\beta3$  als auch von CytoB3 im Tumorphenchym eher schwach ist. In der Literatur wird die  $\alpha\beta3$ -Expression vor allem in Knochenmetastasen sehr ausführlich beschrieben. Es wurde dabei stets eine starke Expression des Integrins  $\alpha\beta3$  beobach-

tet (Liapis et al, 1996; Eckhardt et al, 2005; Takayama et al, 2005). Es zeigt sich in der spezifischen Umgebung des Knochengewebes eine starke Expression von  $\alpha\beta 3$ , während sich die Expression in Gehirnmastasen in dieser Studie nur schwach präsentiert. Die stärkste Expression liegt in spinalen Mastasen vor ( $\alpha\beta 3$ : Mean score Intensität: 1,43; CytoB3: Mean score Intensität: 0,86). Im direkten Vergleich ergibt sich für  $\alpha\beta 3$  ein signifikanter Unterschied zwischen spinalen und zerebellären Mastasen ( $p=0,0043$ ). Dies verdeutlicht die Umgebungsabhängigkeit der  $\alpha\beta 3$ -Expression, die womöglich auf die unterschiedliche Gewebeverteilung seiner Liganden zurückzuführen ist. So kommt zum Beispiel einer der Hauptliganden von  $\alpha\beta 3$  Osteopontin vor allem im Knochengewebe vor, während die Osteopontin-Expression im ZNS (und damit auch die  $\alpha\beta 3$ -Expression in zerebralen Mastasen) schwächer ausfällt. Beta3-positive Zelllinien zeigen ein 20fach erhöhtes Risiko für Mastasen in der Wirbelsäule (Sloan et al, 2006). Bezüglich der Progression vom Primärtumor hin zur zerebralen Mastase lässt sich in dieser Studie eine Aufregulation des Integrins  $\alpha\beta 3$  feststellen ( $p=0,0006$ ). Dies lässt sich zum Beispiel durch veränderte Adhäsionsmechanismen oder aber durch die veränderte Umgebung erklären. Des Weiteren können Unterschiede bezüglich der Herkunft hergeleitet werden. Sowohl bei  $\alpha\beta 3$  als auch bei CytoB3 zeigt sich die höchste Expression in Mastasen aus der Niere ( $\alpha\beta 3$ : Mean score Intensität: 1,78; Mean score Menge: 3,33; CytoB3: Mean score Intensität: 1,44; Mean score Menge: 1,33). Es ergeben sich signifikante bis hoch signifikante Unterschiede im direkten Vergleich zwischen Nierentumoren und den anderen untersuchten Entitäten. Die  $\alpha\beta 3$ - Expression in Nierenzellkarzinomen wurde erstmalig von Wechsel et al beschrieben (Wechsel et al, 1999). In deren Studie zeigt sich eine starke Zunahme von  $\alpha\beta 3$  in Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu gesundem Nierenparenchym. Von 53 untersuchten IHC-Färbungen in gesundem Gewebe konnten nur zwei (4%) ein starkes Färbesignal aufweisen, während von den 79 Nierenzellkarzinomen 19 Fälle (24%) ein starkes Signal zeigten. In der Studie von Wechsel et al wie auch in dieser Arbeit lassen sich keine Unterschiede zwischen den klarzelligen und den papillären Nierenzellkarzinomen erkennen.

In dieser Arbeit wird weiterhin eine positive Korrelation zwischen  $\alpha\beta 3$  und dem Liganden Fibrinogen festgestellt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass  $\alpha\beta 3$  innerhalb der hier untersuchten Integrine als einziges den Liganden Fibrinogen bindet und es durch eine Umstrukturierung der Extrazellulärmatrix und Hochregulation von Fibrinogen auch zu einer Hochregulation von  $\alpha\beta 3$  kommt. Jedoch zeigen die beiden Moleküle trotz der positiven Korrelation in ihrer Regulation in der Verteilung der Expressionshäufigkeit bezogen auf das Herkunftsorgan unterschiedliche Muster. So kommt  $\alpha\beta 3$  am stärksten in den Metastasen aus der Niere vor, während die Fibrinogenexpression in der Niere im Vergleich mit den anderen Entitäten nur im Mittelfeld des Intensitätsspektrums von Fibrinogen liegt. Fibrinogen kommt hingegen am stärksten in Metastasen aus der Prostata vor. Dies verdeutlicht, dass Fibrinogen und  $\alpha\beta 3$  zwar durchaus in ihrer Regulation voneinander abhängig sind, aber es trotzdem weitere organabhängige Mechanismen geben muss, die die  $\alpha\beta 3$ - beziehungsweise Fibrinogenexpression auf spezifische Weise beeinflussen.

#### **4.4.2 Expression und Funktion im Gefäßendothel**

Die Endothelzellen der Gefäße weisen ein meist positives Signal für  $\alpha\beta 3$  und CytoB3 auf. Dabei zeigt sich, wie auch oben schon erwähnt, ein schwächeres Signal für die cytoplasmatische Untereinheit CytoB3 ( $\alpha\beta 3$ : Mean score: 1,52; CytoB3: Mean score: 0,93). Die bereits bestehende Literatur über das Integrin  $\alpha\beta 3$  bestätigt dessen starke Expression von Endothelzellen und beschreibt ausführlich die Rolle in der Angiogenese (Lim et al, 2005; Lorger et al, 2009; Rice et al, 2006). Es ergeben sich in dieser Studie Unterschiede zwischen den Differenzierungsgraden:  $\alpha\beta 3$  wird vom Gefäßendothel am stärksten in wenig differenzierten Metastasen exprimiert (Mean score: 1,56), gefolgt von den mäßig differenzierten (Mean score: 1,53) und das geringste  $\alpha\beta 3$ -Vorkommen zeigt sich bei den gut differenzierten Metastasen (Mean score: 1,0). Diese Unterschiede sind signifikant. Auch bei den hirneigenen Tumoren resultieren je nach WHO-Grad Unterschiede. So ergibt sich eine hochsignifikante Hochregulation vom diffusen Astrozytom Grad II WHO zum Glioblastom Grad IV WHO ( $p < 0,0001$ ). Auch zwischen dem anaplastischen Astrozytom Grad III WHO und dem Glioblastom waren die Unterschiede signifikant ( $p < 0,0001$ ) (Hochschuldis-

sertationsschrift Schwab, 2012). Im späten Stadium, also bei geringem Differenzierungsgrad, liegt eine hohe Wachstumsrate der Karzinomzellen vor, was folglich auch zu der Notwendigkeit einer starken Proliferation der Endothelzellen führt. In der Literatur werden unterschiedliche Mechanismen beschrieben, die im Rahmen pathologischer Prozesse zu einer  $\alpha\beta3$  vermittelten überschießenden Gefäßneubildung führen. Lorger et al beschreiben beispielsweise eine  $\alpha\beta3$  induzierte Hochregulation von VEGF auch unter nicht hypoxischen Bedingungen in zerebralen Metastasen (Lorger et al, 2009). Daraus folgt die adäquate Versorgung der metastatischen Zellen und somit die Möglichkeit von ungehindertem Wachstum. Rice et al beschreiben die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B über  $\alpha\beta3$  und die dadurch vermittelte Hemmung der Apoptose (Rice et al, 2006). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B korreliert mit der Entstehung von Metastasen und verstärktem Zellüberleben in multiplen Tumorzelllinien.

Im Gegensatz zum  $\alpha\beta3$ -Vorkommen in den Tumorzellen zeigt sich die  $\alpha\beta3$ -Expression im Gefäßendothel nicht abhängig vom Herkunftsort der Metastase.

## **4.5 $\alpha\beta5$**

### **4.5.1 Die Rolle von $\alpha\beta5$ in Angiogenese und Metastasierung**

$\alpha\beta5$  wird von den Karzinomzellen ähnlich stark exprimiert wie  $\alpha\beta6$  (Mean score Intensität: 1,66). Zusätzlich lässt sich jedoch auch ein ausgeprägtes Signal in den Endothelzellen der Gefäßproliferate feststellen (Mean score: 1,32). In 56,64% der zerebralen Metastasen ist das Gefäßendothel für  $\alpha\beta5$  positiv. Es ergibt sich bei der Analyse des  $\alpha\beta5$ -Vorkommens im Gefäßendothel ein signifikanter Unterschied der Intensitäten zwischen den zerebralen und den zerebellären Metastasen ( $p= 0,015$ ). Dabei ist der Mean score der zerebralen Metastasen (Mean score: 1,49; 95% CI: 1,31 bis 1,67) signifikant höher als der der zerebellären Filae (Mean score: 0,97; 95% CI: 0,66 bis 1,28). Hieraus lässt sich ableiten, dass die Expression von  $\alpha\beta5$  abhängig von dem jeweiligen umgebenden Gewebe ist und möglicherweise eine unterschiedliche molekulare Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix Einfluss auf die  $\alpha\beta5$ -vermittelte Angiogenese nimmt.

Bei weiterer Betrachtung der Datenlage zeigt sich eine höhere  $\alpha\beta 5$ -Intensität in den Primärtumoren (Mean score: 2,0) als in den zerebralen Metastasen (Mean score: 1,5). Dieser Unterschied könnte darauf hinweisen, dass ein späterer Adhäsionsverlust der metastatischen Zellen auch zu einer Abnahme des Integrins  $\alpha\beta 5$  führt. Als dominanter  $\alpha\beta 5$ -Ligand des umgebenden Extrazellulärgewebes, der die Adhäsion der Tumorzellen bedingt, zählt das Glykoprotein Vitronectin. Tatsächlich spielt  $\alpha\beta 5$  eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Metastasen, indem es die Migration vor allem entlang Vitronectin ermöglicht. Enns et al zeigten, dass vor allem eine frühe Metastasierung durch Adhäsion zirkulierender Tumorzellen an Gefäßendothelien des Metastasierungsortes über  $\alpha\beta 5$  ermöglicht wird (Enns et al, 2005). Die Ergebnisse dieser Studie deuten nun darauf hin, dass es nach Einwanderung und Etablierung der metastatischen Zellen in das zerebrale Gewebe durch Abnahme der Adhäsionskontakte zu einer Herunterregulation von  $\alpha\beta 5$  kommt. Auch zeigen die Daten dieser Arbeit eine Abwärtstendenz der  $\alpha\beta 5$ -Expression in Richtung gering differenzierter Metastasen. Ein geringer Differenzierungsgrad lässt auf eine Reduktion der interzellulären Kontakte rückschließen und somit auf eine verminderte Expression tumor-assoziiertes Adhäsionsmoleküle.

Ferner zeigt sich in dieser Studie eine positive Korrelation zwischen  $\alpha\beta 5$  und Fibronectin ( $p=0,0319$ ),  $\alpha\beta 5$  und  $\alpha\beta 6$  ( $p=0,0049$ ) sowie  $\alpha\beta 5$  und  $\alpha$  ( $p=0,0007$ ). Die Parallelen in der Regulation der Genexpression deuten darauf hin, dass die Synthese der oben genannten Integrine beziehungsweise deren Liganden entweder durch die gleichen Transkriptionsfaktoren aktiviert wird oder aber unterschiedliche regulatorische Faktoren durch die selben Veränderungen der Zellumgebung herauf- beziehungsweise herunterreguliert werden.

#### **4.5.2 Vergleich der unterschiedlichen Entitäten und Histologieformen**

In den Plattenepithelkarzinomen und den kleinzelligen Karzinomen wurde  $\alpha\beta 5$  nur sehr schwach exprimiert. Der Mean score für die Plattenepithelkarzinome liegt in der Intensitätsanalyse bei nur 0,67 und in der Mengenanalyse bei 1,00. Janes und Watt beschreiben in Plattenepithelkarzinomen eine Herunterregulation von  $\alpha\beta 5$  im Übergang von Karzinomvorstufen zum Karzinom. Die von ihnen beschriebene geringe  $\alpha\beta 5$ -Expression wird in dieser Arbeit damit

bestätigt. Gleichzeitig konnten Janes und Watt eine Hochregulation des Integrins  $\alpha\beta 6$  feststellen. Die Ergebnisse ihrer Studie lassen darauf schließen, dass der Wechsel von  $\alpha\beta 5$  zu  $\alpha\beta 6$  die Adhäsions- und ECM-abhängige Apoptose (Anoikis) hemmt (Janes and Watt, 2004).  $\alpha\beta 5$  ist demnach in Plattenepithelkarzinomen im Vergleich zu  $\alpha\beta 6$  eher von geringerer Bedeutung. Für die kleinzelligen Karzinome ergibt sich in der Intensitätsanalyse ein Mean score von 0,4 bei einem Mean score von 0,6 in der Mengenanalyse. In Adenokarzinomen und Klarzellern kommt  $\alpha\beta 5$  hingegen stärker und häufiger vor (Adenokarzinom: Mean score Intensität: 1,67; Mean score Menge: 2,17; Klarzeller: Mean score Intensität: 2,75; Mean score Menge: 2,88). Im paarweisen Vergleich ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den Intensitäten der klarzelligen Karzinomen und den restlichen Histologieformen und ein signifikanter Unterschied in der Mengenanalyse zwischen den klarzelligen und den kleinzelligen Karzinomen. In der Literatur sind meines Wissens keine Daten dazu beschrieben. Bei genauer Betrachtung der Adenokarzinome zeichnet sich eine moderate bis starke Expression in Metastasen aus dem Gastrointestinaltrakt (Mean score Intensität: 1,83; Menge: 3,0) und aus der Prostata (Mean score Intensität: 2,18; Menge: 2,64) ab, während Metastasen aus der Brust  $\alpha\beta 5$  eher schwach exprimieren (Mean score Intensität: 1,14; Menge: 1,68). Es ergibt sich ein signifikanter Wert in der Intensitätsanalyse zwischen Karzinomen aus der Prostata und Karzinomen aus der Brust ( $p=0,0179$ ). Der Vergleich mit dem Integrin  $\alpha\beta 6$ , welches insgesamt in ähnlichem Ausmaß exprimiert wird, spiegelt für beide eine starke Expression in Metastasen des Gastrointestinaltrakts wider.  $\alpha\beta 6$  wird jedoch in Metastasen aus der Prostata gar nicht exprimiert (Mean score:0), während  $\alpha\beta 5$  im Parenchym der Prostata von Bedeutung ist. Das Vorkommen von  $\alpha\beta 5$  in Metastasen aus der Prostata wurde von Tantivejkul et al beschrieben, die anhand von Knochenmetastasen die Wichtigkeit von  $\alpha\beta 5$  für das Überleben der metastatischen Tumorzellen erklärt haben (Tantivejkul et al, 2004). Auch zeigt  $\alpha\beta 5$  eine starke Expression in der Niere, während  $\alpha\beta 6$  in klarzelligen Karzinomen kaum vorkommt. Dies verdeutlicht eine gewisse Spezifität bestimmter Organe für bestimmte Integrinkomplexe wie



zum Beispiel  $\alpha\beta 5$ . Die Bedeutung dieser Organspezifität ist bislang jedoch noch unklar.

## **4.6 $\alpha v$**

### **4.6.1 Immunhistochemisches Signal als Verrechnungsergebnis der einzelnen Expressionsmuster**

Das Expressionsmuster der  $\alpha v$ -Untereinheit entspricht einer Summation der oben beschriebenen Expressionsmuster der Integrinsubtypen, da die  $\alpha v$ -Untereinheit nur mit diesen zusammen auftritt. Das starke Vorkommen im Gefäßendothel ist somit durch die gemeinsame Expression von  $\alpha\beta 3$  und  $\alpha\beta 5$  zu erklären. Im ZNS-Gewebe hingegen dominiert die  $\alpha\beta 8$ -Expression und im neoplastischen Epithel  $\alpha\beta 6$  und  $\alpha\beta 5$ , sodass  $\alpha v$  dementsprechend auch in beiden Strukturen anzutreffen ist. Demzufolge ergibt sich für die  $\alpha v$ -Untereinheit die stärkste in dieser Studie gemessene Intensität (Mean score: 2,36) und Menge (Mean score: 3,32) als auch die meisten positiven Gefäßendothelien (Mean score: 1,65). Es ergibt sich ein diffus unspezifisches, aber kräftiges Färbemuster. Da  $\alpha\beta 5$  und  $\alpha\beta 6$  unter den untersuchten Integrinen im Karzinomepithel überwiegen, ergibt sich eine signifikant positive Korrelation zwischen  $\alpha v$  und  $\alpha\beta 6$  ( $p < 0,0001$ ) und zwischen  $\alpha v$  und  $\alpha\beta 5$  ( $p = 0,0007$ ). Die oben beschriebenen eindrucklichen Ergebnisse in der Intensitäts-, Mengen- und Gefäßanalyse lassen die Alpha- $v$ -Untereinheit zunächst als geeignetes therapeutisches Ziel erscheinen, da sich mit nur einem Antikörper die Integrine  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$  und  $\alpha\beta 8$  und deren Funktionen blockieren lassen. Es zeigt sich jedoch auch im gesunden umgebenden Gewebe ein positives Signal für  $\alpha v$ , während sich die Expression von  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$  und  $\alpha\beta 6$  hauptsächlich auf das entartete Epithel beschränkt. Eine Hemmung der Alpha- $v$ -Untereinheit würde also durch die beschriebene unspezifische Verbreitung sowohl im neoplastischen als auch nicht-neoplastischen Gewebe sicherlich eine nicht gewünschte Schädigung von gesunden Zellen, vor allem auch in anderen integrinexprimierenden Organen, auslösen. Das starke und diffuse Signal verdeutlicht die weite Verbreitung der Integrine im menschlichen Gewebe. Die stärkste Intensität ergibt sich in spinalen Metastasen (Mean score: 3,0). Dies

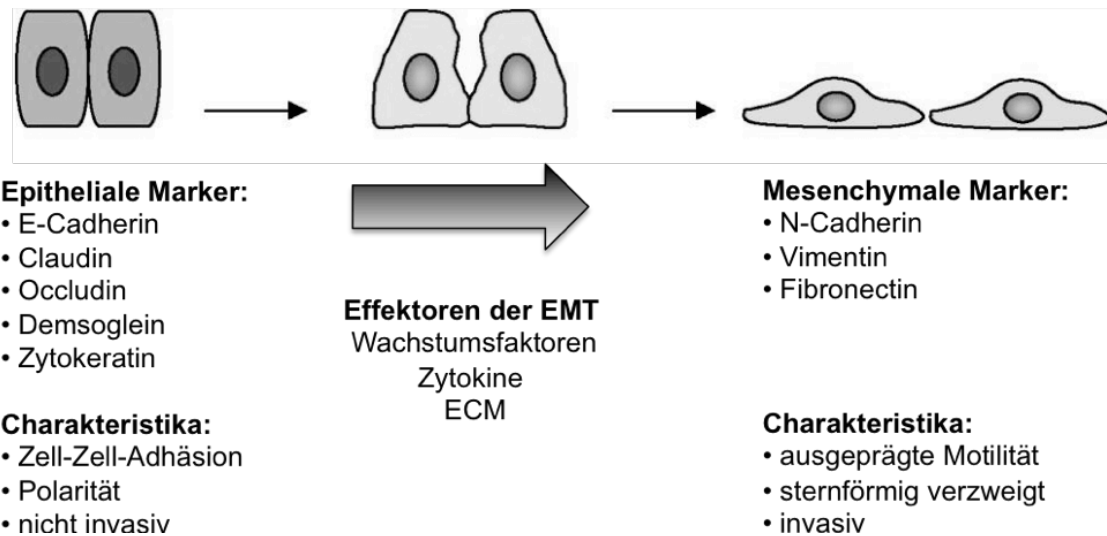
trifft auch für  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha\beta3$ , CytoB3 und Fibrinogen zu. Möglicherweise provoziert die ausgeprägte knöcherne Umgebung der Medulla spinalis eine höhere Expression der aufgezählten Integrinsubtypen. Im Vergleich der unterschiedlichen Entitäten ist das Signal in den Metastasen aus der Niere führend (Intensität Mean score: 3,0; Menge Mean score: 4,0). CUP-Metastasen und Metastasen aus der Mamma weisen die geringste Signalstärke auf. Analog dazu lässt sich festhalten, dass bei den untersuchten Integrinsubtypen in Summe die Expression in Metastasen aus der Niere beziehungsweise in klarzelligem Karzinomen dominiert. Das Vorkommen von  $\alpha$ -Subtypen in Nierenkarzinomen wird in der Literatur, mit Ausnahme des Integrins  $\alpha\beta3$ , nur wenig beschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Funktionen der Integrinkomplexe insbesondere in Nierenkarzinomen von großer Wichtigkeit sind und sich weiterführende Untersuchungen als vielversprechend erweisen könnten.

## **4.7 Fibronectin**

### **4.7.1 Fibronectin als Marker für die epitheliale-mesenchymale Transition**

Fibronectin zeigt eine starke Selektivität für das Stroma der betreffenden Metastase. Die Tumorzellen selbst sind nur schwach positiv (Mean score Intensität: 0,68) und von den 115 untersuchten Gewebsschnitten ergibt sich im Karzinomepithel bei nur 11% ein starkes Signal und bei ebenfalls 11% eine moderate Signalintensität. In den Endothelzellen der Gefäße hingegen wird Fibronectin stark exprimiert (Mean score: 1,58). Fibronectin ist als Glykoprotein der Extrazellulärmatrix an der Entwicklung vieler menschlicher Karzinome beteiligt (Hu et al, 2004; Zheng et al, 2007) und erhöht die Fähigkeit der Karzinomzellen zur Invasion und Migration unter anderem auch durch eine Induktion von MMP-9 (Han et al, 2006; Meng et al, 2009). In der aktuellen Forschungsliteratur wird Fibronectin im Zusammenhang mit Karzinomen vor allem als Marker für die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beschrieben (Gout et al, 2008). Als EMT bezeichnet man den temporären Übergang von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften, die für die Metastasierung eine elementare Rolle spielt. Das bedeutet für die Zelle eine tiefgreifen-

de biologische Veränderung, bei der sie die eigentlichen Charakteristika einer Epithelzelle verliert. Dieser Vorgang wird auch während der Embryonalentwicklung beobachtet. Die Zellen lösen dabei ihre Zellkontakte auf und regulieren Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherine herunter. Dadurch können sie in angrenzende Bereiche migrieren und die Basalmembran passieren. Die frei bewegliche Zelle kann nun den Extrazellulärraum, Blut- und Lymphgefäße durchdringen und in ihrem Zielorgan wieder zur Epithelzelle zurückdifferenzieren. Zu den in der Literatur beschriebenen mesenchymalen Markern zählen N-Cadherine, Fibronectin, Vimentin und Actin (Devarajan et al, 2011). Die Expression von Fibronectin korreliert dabei positiv mit der EMT (Yang et al, 2004). Die genauen Mechanismen sind noch unbekannt. Die Umwandlung zu mesenchymalen Zellen wird auf parakrinem Weg über eine Interaktion mit der Tumorumgebung hervorgerufen (Davarajan et al, 2011). Dabei spielen Integrine wieder eine gewisse Rolle. Wenn die disseminierten Zellen in der Mikroumgebung des Zielorgans angekommen sind, zeigen sich die mesenchymalen Tumorzellen jedoch als nicht effektiv, um zu Makrometastasen heranzuwachsen. Folglich kehrt die Zelle über MET (mesenchymal-epitheliale Transition) wieder zum epithelialen Status zurück. Dieses Phänomen kann so das geringe Vorkommen von Fibronectin in den hier untersuchten Schnitten erklären, da sich die Zellen in den operierten Metastasen, die eine gewisse Größe erreicht haben, bereits überwiegend wieder zu Zellen mit epithelialen Eigenschaften umgewandelt haben und so die Fibronectinexpression deshalb nur gering ist.



**Abbildung 31: Darstellung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). EMT ist ein biologischer Prozess, bei dem die Epithelzellen ihre typischen Eigenschaften wie zum Beispiel Zell-Zell-Adhäsion verlieren und die Charakteristika der Mesenchymzellen annehmen, einhergehend mit einem Verlust epithelialer Marker wie E-Cadherin und Cytokeratinen und der Expression mesenchymaler Marker wie N-Cadherine, Fibronectin und Vimentin. Migration und Invasion wird somit ermöglicht. Dieser Vorgang wird während der Embryogenese und bei der Metastasierung von Karzinomen beobachtet. Induziert und reguliert wird die EMT über bestimmte Wachstumsfaktoren (TGF $\beta$ , PDGF, EGF), Cytokine (Interleukin 8) und Komponente der ECM. (in Anlehnung an Gout et al, 2008)**

In dieser Studie ist das Vorkommen von Fibronectin in den Epithelzellen der Metastasen am größten in den CUP-Tumoren. Es ergibt sich die höchste Intensität (Mean score: 2,1), Menge (Mean score: 1,55) und die stärkste Expression in den Endothelzellen der Gefäße (Mean score 2,0). Unter den 11 CUP-Tumoren sind 5 Fälle (45,45%) stark positiv, 3 Fälle (27,27%) moderat positiv, 2 Fälle (18,18%) schwach positiv und nur 1 Fall negativ (9,09%). Demzufolge ergeben sich folgende signifikante Werte:

| Tumorentitäten              | p-Wert (Intensität) | p-Wert (Menge) | p-Wert (Gefäße) |
|-----------------------------|---------------------|----------------|-----------------|
| Niere-CUP                   | 0,0327              | n.s.           | n.s.            |
| CUP-Mamma                   | 0,0227              | 0,0173         | 0,0376          |
| CUP- Gastrointestinal-trakt | 0,001               | 0,001          | n.s.            |
| CUP-Lunge                   | <0,0001             | <0,0001        | 0,0497          |

|              |      |        |      |
|--------------|------|--------|------|
| CUP-Prostata | n.s. | 0,0461 | n.s. |
|--------------|------|--------|------|

**Tabelle 40: Darstellung signifikanter Resultate in den direkten Vergleichen nach Herkunft in Mengen-, Intensitäts und Endothelanalyse für Fibronectin (n.s.= nicht signifikant)**

Betrachtet man Fibronectin nun als Marker für eine Umstrukturierung hin zu Mesenchymzellen, so lässt sich daraus schließen, dass der Anteil der migrationsfähigen Tumorzellen in den CUP-Tumoren höher ist als in den restlichen betrachteten Metastasen, die EMT also besonders ausgeprägt ist oder die MET noch nicht stattgefunden hat. Aus der geringen Anzahl differenzierter Epithelzellen resultiert auch bei manchen CUP-Tumoren die Schwierigkeit den CUP-Tumoren mikroskopisch ein spezifisches Ursprungsgewebe oder eine Histologieform zuzuordnen. Durch eine aberrante Expression von Strukturproteinen im Tumorgewebe ist selbst mit immunhistochemischen Methoden eine genaue Zuordnung des Primärtumors oft nicht möglich. CUP-Tumore unterscheiden sich meistens von den anderen Metastasen auch noch durch eine höhere Wachstumsrate und einen sehr kleinen Primärtumor, der oft selbst nach intensiver Diagnostik nicht aufzufinden ist. Passend zu der erhöhten Wachstumsrate zeigten Devarajan et al an einer Brustkrebszelllinie, dass eine erhöhte Anzahl an Krebsstammzellen und somit ein verstärktes Tumorstadium durch EMT induziert wird (Devarajan et al, 2011). Auffällig zeigen sich bei der manuellen Auswertung Metastasen embryonaler Karzinome des Hodens, die wegen zu geringer Fallzahl (2 Fälle) jedoch nicht in die Analyse der Ergebnisse mit einbezogen wurden. Beide Fälle präsentieren eine starke Intensität (Score 3) des Signals für Fibronectin und scheinen somit, wie auch die CUP-Tumore, in Zusammenhang mit starker Fibronectinexpression zu stehen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass embryonale Karzinome aus embryonalen Vorläuferzellen stammen, deren totipotenten Eigenschaften beibehalten und sich so komparabel mit der Embryonalentwicklung in verschiedene Gewebe differenzieren können. So lässt sich das gehäufte Vorkommen von mesenchymalen Markern in embryonalen Karzinomen erklären.

Die EMT könnte durch Blockade beteiligter Transkriptionsfaktoren oder anderer Moleküle des Signalwegs möglicherweise ein neues Therapieziel für Patienten mit CUP-Tumoren und auch für Patienten mit Embryonalkarzinomen darstellen.

Dies gilt möglicherweise auch für die Metastasierungseigenschaften der Karzinome insgesamt. Die Rolle der involvierten Integrinuntereinheiten ist dabei sicher auch von Interesse.

Bei der Analyse der unterschiedlichen Histologieformen zeigt sich im paarweisen Vergleich ein signifikanter Unterschied zwischen Adenokarzinomen (Mean score Intensität: 0,6; Mean score Menge: 0,47) und klarzelligen Karzinomen (Mean score Intensität: 0,75; Mean score Menge: 1,0). In der Mengenanalyse ergibt sich ein p-Wert von 0,0302 und in der Intensitätsanalyse ein p-Wert von 0,0018. Die Fibronectinexpression ist also auch von der Histologieform abhängig und zeigt wie auch die meisten der untersuchten Integrinsubtypen das stärkste Vorkommen in klarzelligen Karzinomen. In der multivariaten Analyse ergibt sich eine positive Korrelation zwischen Fibronectin und Fibrinogen ( $p < 0,0001$ ) und  $\alpha v \beta 5$  und Fibronectin ( $p = 0,0316$ ), woraus man auf Gemeinsamkeiten in der Regulation der Genexpression schließen kann. Dies lässt sich beispielsweise durch gemeinsame Transkriptionsfaktoren erklären.

## **4.8 Fibrinogen**

### **4.8.1 Stromale und epitheliale Expression**

Fibrinogen ist ein Plasmaprotein von 350kDa, das eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung spielt. Dabei wird es durch das Enzym Thrombin zu Fibrin umgewandelt, das für die Bildung des sekundären Thrombus verantwortlich ist. Eine klare Verbindung zwischen Hämostase und Metastasenbildung bei Tumoren wurde bereits in einigen Studien belegt. So treten bei Karzinompatienten beispielsweise gehäuft Koagulationsstörungen auf, bei denen erhöhte Fibrinogenwerte festgestellt werden konnten (Biggerstaff et al, 1999). Weiterhin fördert es Adhäsion, Proliferation und Migration während Entzündung, Wundheilung und Neoplasien (Fitzgerald 1999). Fibrinogen und Fibrin stellen relevante Matrixbestandteile dar, an denen disseminierte Tumorzellen während der hämatogenen Metastasierung adhären können. In dieser Arbeit zeigt sich bei Fibrinogen, wie auch bei Fibronectin, eine starke Betonung des Stromagewebes. Im Gegensatz zur Antikörperverteilung bei Fibronectin weisen Fibrozyten keine Fibrinogenexpression auf. Bindegewebsfasern des Interstitiums sowie

Tumorsepten lassen sich mit Fibrinogenantikörpern stark färben. Eine starke Fibrinogenexpression im Stroma von Karzinomen wird auch in der Literatur beschrieben und erläutert dessen proinflammatorisches Potential. Fibrinogen induziert integrinvermittelt die Produktion von Interleukin-6 und Interleukin-8 und fördert so Fibrose und Entzündung im umgebenden Stromagewebe des Tumors (Masamune et al, 2009). In dieser Arbeit lässt sich auch eine signifikant positive Korrelation mit dem Integrinliganden Fibronectin ( $p=0,0001$ ) ableiten, was darauf zurückzuführen ist, dass Fibronectin als ebenfalls wichtiger Bestandteil der ECM ähnlichen Regulationsmechanismen unterliegt wie Fibrinogen. In der manuellen Auswertung zeigt sich die Intensität des neoplastischen Epithels mit einem Mean score von 0,55 (95% CI: 0,4 bis 0,7) noch geringer als die Fibronectindichte. Im Vergleich der einzelnen Entitäten untereinander sind keine statistisch signifikanten Unterschiede auszumachen. Unter den Histologieformen ergibt sich die stärkste Fibrinogendichte in Plattenepithelkarzinomen (Mean score: 1,33; 95% CI: 0,25 bis 2,42). Im paarweisen Vergleich ergeben sich folgende signifikante Werte in der Intensitätsanalyse: Klarzelliges Karzinom – Plattenepithelkarzinom:  $p=0,0195$ ; Adenokarzinom – Plattenepithelkarzinom:  $p=0,0344$ ; kleinzelliges Karzinom – Plattenepithelkarzinom:  $p=0,046$ . Das epitheliale Vorkommen von Fibrinogen wird in der bestehenden Literatur nur unzureichend beschrieben. Das Plasmafibrinogen als Bestandteil der Gerinnungskaskade wurde in Plattenepithelkarzinomen hingegen schon häufig beschrieben. Dabei zeigte sich beispielsweise bei Greve et al bei der Untersuchung von 20 Plattenepithelkarzinomen aus der Kopf-Hals-Region eine signifikante Plasmafibrinogenerhöhung im Vergleich zu gesunden Patienten (Greve et al, 2010). Hinzukommend zeigt sich eine hohe Fibrinogenplasmakonzentration bei Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom der Zervix als Risikofaktor für Lymphknotenmetastasen (Tian et al, 2008).

Im Epithel der Adenokarzinome scheint Fibrinogen jedoch nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Das Parenchym von Plattenepithelkarzinomen müsste an einem größeren Patientenkollektiv noch genauer untersucht werden, um das Ergebnis dieser

Studie mit der hier beobachteten erhöhten Expression in Hirnmetastasen zu verifizieren.

#### **4.8.2 Endotheliale Expression und Rolle bei der Adhäsion und Invasion**

Das Gefäßendothel imponiert mit einer relativ starken Fibrinogenexpression. Zirka 50% der Gefäßproliferate sind positiv für Fibrinogen (Mean score 0,98; 95% CI: 0,85 bis 1,1). Das häufige Vorkommen von Fibrinogen an den Gefäßendothelzellen ist entweder Hinweis für dessen Funktion in der Tumormetastasierung oder ein Zeichen der Gefäßneubildung, die assoziiert ist mit einem gehäuften Vorkommen von Mikrothromben aufgrund einer suboptimalen Blutzirkulation. Als multivalenter Ligand kann Fibrinogen an mehrere unterschiedliche Liganden binden, so unter anderem auch an den hier untersuchten Zellrezeptor  $\alpha\beta_3$ , der ebenfalls ein starkes Signal am Gefäßendothel aufweist. Die anderen  $\alpha$ -Integrine hingegen besitzen keine Bindungsstelle für Fibrinogen. Daraus resultiert auch die hoch signifikante positive Korrelation zwischen  $\alpha\beta_3$  und Fibrinogen ( $p < 0,0001$ ), die durch positive Rückkopplung zu erklären ist. Auch Zhang et al beobachten eine gemeinsame Regulation von  $\alpha\beta_3$  und Fibrinogen (Zhang et al, 2010).

Im Blutkreislauf ist es den Karzinomzellen möglich, auch unter den normalen Flussbedingungen in den Gefäßen über  $\alpha\beta_3$  an Fibrinogen beziehungsweise Fibrin zu binden und so an der Gefäßwand zu arrestieren. Dies zeigte sich bei Zhang et al bei einer Untersuchung an Melanomzellen (Zhang et al, 2011). So können die Karzinomzellen anschließend ins Gewebe des Zielorgans eindringen.

#### **4.9 Fazit und Ausblick**

Metastasen stellen die führende Todesursache bei Krebspatienten dar, zirka 90% aller Todesfälle bei Patienten mit Krebserkrankung sind darauf zurückzuführen. Jedoch bleiben einige zu Grunde liegenden Mechanismen der Metastasenentstehung teilweise noch schwer fassbar und ohne empirisch belegte Erklärung, warum bestimmte Tumorentitäten bestimmte Organe wie zum Beispiel das ZNS bevorzugen. Weitere Forschung im Hinblick auf das Zusammenwirken von Tumorzelle und Extrazellulärmatrix ist daher erstrebenswert.



Durch dynamische Interaktion können Integrine Veränderungen der Tumorumgebung erkennen und induzieren. So stellen die Subtypen dieser Transmembranproteine mittlerweile ein beliebtes Ziel für eine neue Therapieoption dar.

Ziel dieser Arbeit war es, die von Merck-Serono (Darmstadt, Germany) neu entwickelten Antikörper gegen  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha\beta8$ ,  $\alpha v$  und CytoB3 an in Paraffin gebetteten Gehirnschnitten zu testen. Zudem wurden die Antikörper gegen die Liganden Fibrinogen (AbD Serotec, Düsseldorf, Germany), Fibronectin (Novocastra, Newcastle, United Kingdom), Vitronectin (Millipore Corporation, USA and Canada) und Osteopontin (RnD Systems, Germany) mittels Immunhistochemie geprüft. Unter Austestung folgender Verdünnungen konnten für die von Merck entwickelten Antikörper gegen die Integrine als auch für die Antikörper gegen Fibrinogen und Fibronectin an Paraffinschnitten gute Resultate erzielt werden:

| Antikörperziel | $\alpha\beta3$ | $\alpha\beta5$ | $\alpha\beta6$ | $\alpha\beta8$ | $\alpha v$ | Cy-toB3 | Fibrinogen | Fibronectin |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|---------|------------|-------------|
| Verdünnung     | 1:50           | 1:800          | 1:1000         | 1:1000         | 1:200      | 1:50    | 1:1000     | 1:100       |

**Tabelle 41: Erfolgreich getestete Verdünnungen der einzelnen Antikörper bei einer Ausgangskonzentration von 1 $\mu$ g/ $\mu$ l**

Die Verwendung der Antikörper gegen Osteopontin und Vitronectin erbrachte trotz mehrmaligen Versuchen keine erfolgreiche Farbreaktion. Diese Antikörper sind somit nicht paraffingängig.

Da die meisten bisherigen Integrin-Antikörper nur für Kryomaterial geeignet waren, kann der Einsatz der Antikörper gegen die in der Tabelle 41 aufgelisteten Zielstrukturen dementsprechend die zukünftige Routinearbeit auch an Paraffinmaterial erleichtern.

Zudem hat sich in dieser Arbeit die Software „Definiens Tissue Studio“ als kompetentes Medium zur Beurteilung immunhistochemischer Schnitte erwiesen, da in kürzerer Zeit präzisere (kontinuierliche Ergebnisskala) und objektivere Resultate erzielt werden können. Auch bei starker Heterogenität des Färberegebnisses eines Gewebeschnittes kann durch beobachterunabhängige und leicht reproduzierbare Auswertung eine Qualitätssicherung gewährleistet werden. Jedoch auch die manuelle Auswertung erwies sich, was die Aussage-

kraft der Datenanalyse betrifft, der digitalen ebenbürtig (hoch signifikante Korrelationen), erfordert jedoch einen höheren Zeitaufwand.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit lautete, Unterschiede in der Integrinexpression hinsichtlich Tumorentität, Histologie, Differenzierungsgrad und Lokalisation zu erkennen, um daraus Schlüsse zu ziehen, in welchen Karzinometastasen sich eine Blockade von welchem Subtyp als sinnvoll erweist. Zusätzlich sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Primärtumor und Metastase dargestellt werden.

Nach Betrachtung und Analyse der erhobenen Daten, lässt sich nun sagen, dass sich sowohl zwischen den einzelnen Integrinsubtypen als auch innerhalb eines Subtyps eine große Bandbreite des immunhistochemischen Signals zeigt. Dies verdeutlicht einerseits die unterschiedliche Funktion und Relevanz in der Metastasen- beziehungsweise Karzinomentwicklung der unterschiedlichen Subtypen, demonstriert aber auch das heterogene Spektrum an malignen Tumoren, das hier untersucht wurde. Generell zeigt sich kein Zusammenhang zwischen der Integrinexpression und dem Alter und Geschlecht des Patienten.

Jedoch ergeben sich bei einigen Integrinsubtypen signifikante Unterschiede bezüglich der Tumorentität und -histologie. So wird  $\alpha\beta 8$  und  $\alpha\beta 3$  besonders stark in Nierenzellkarzinomen exprimiert,  $\alpha\beta 6$  vor allem in Adenokarzinomen mit Ausnahme der Prostatakarzinome und neuroendokrinen Karzinome und  $\alpha\beta 5$  verstärkt in klarzelligen Karzinomen und Karzinomen aus dem Gastrointestinaltrakt und der Prostata. Dies gilt jedoch nur für die Integrinexpression im Karzinomepithel, das Integrinvorkommen im Gefäßendothel ergibt hingegen keine Selektivität für bestimmte Entitäten und/ oder Histologieformen.

Erstaunlicherweise resultierte aus den Ergebnissen die Erkenntnis einer sehr geringen Integrinexpression in kleinzelligen Karzinomen, die aufgrund ihrer hohen Metastasierungsrate und demnach ausgeprägten Proliferations- und Migrationsfähigkeit auch ein starkes Integrinvorkommen hätten erwarten lassen. Hier scheinen andere Faktoren das biologische Verhalten dieser Tumore zu steuern.

Insgesamt ergeben sich für eine Therapie mit inhibierenden Antikörpern durchaus spezifische  $\alpha\text{-Komplexe}$ , die für bestimmte Karzinome den anderen

Integrinen vorzuziehen sind. Eine unspezifische Hemmung, zum Beispiel mit Antikörpern gegen die  $\alpha$ v-Untereinheit, erweist sich nicht als sinnvoll, da auch im gesunden Gewebe eine starke Reaktion zu erwarten wäre (zum Beispiel durch Blockade von  $\alpha$ v $\beta$ 8 im gesunden ZNS-Gewebe). Durch selektive Hemmung von  $\alpha$ v $\beta$ 5,  $\alpha$ v $\beta$ 3 und  $\alpha$ v $\beta$ 6 könnten bei den passenden Karzinomen mit entsprechender Aufregulation, die idealerweise am Operationsmaterial in der pathologischen Routinediagnostik miterfasst werden sollten, so Therapieerfolge erzielt werden. In den aktuellen Studien konzentriert man sich vor allem auf die Hemmung von  $\alpha$ v $\beta$ 5 und  $\alpha$ v $\beta$ 3 in den Tumorgefäßen, aber auch eine Therapie gegen  $\alpha$ v $\beta$ 6 könnte besonders bei bestimmten Adenokarzinomen viel versprechend sein. Auch der Ansatz einer Antikörpertherapie gegen  $\alpha$ v $\beta$ 8 bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen könnte ein aussichtsreiches Unterfangen darstellen. Für die Hemmung von  $\alpha$ v $\beta$ 6 spricht auch, dass es im gesunden Epithel kaum exprimiert wird.

Weiterhin lässt sich in dieser Arbeit keine Korrelation der Integrinexpression zwischen Primärtumor und Metastase herstellen. Das heißt, das Expressionsmuster im Epithel der Metastase kann sich vom Integrinvorkommen im Epithel des Primärtumors stark unterscheiden und macht daher eine Neubestimmung in Hirnmetastasen vor therapeutischen Ansätzen zwingend notwendig. Charakteristisch für die metastatischen Zellen erweist sich das Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3, bei dem sich eine signifikante Aufregulation feststellen lässt ( $p=0,0006$ ), während  $\alpha$ v $\beta$ 5 in metastatischen Zellen herunterreguliert wird. Taherian et al, die die gleichen  $\alpha$ v-Subtypen an unterschiedlichen Brustkrebszelllinien untersuchten, gaben ebenfalls an, dass in metastatischen Zellen vor allem  $\alpha$ v $\beta$ 3-Integrine stark erhöht exprimiert werden, während  $\alpha$ v $\beta$ 5-Integrine herunterreguliert sind (Taherian et al, 2011). In Metastasen würde sich dementsprechend eine Therapie mit Anti- $\alpha$ v $\beta$ 3-Antikörpern anbieten, während die Ansprechwahrscheinlichkeit bei einer Therapie mit Anti- $\alpha$ v $\beta$ 5-Antikörpern im Primärtumor größer zu erwarten wäre als in den Metastasen.

Zusätzlich liegt bei manchen Subtypen eine Abhängigkeit von der Lokalisation vor. So zeigt  $\alpha$ v $\beta$ 3 beispielsweise ein signifikant häufigeres Vorkommen in

spinalen als in zerebralen Metastasen. Die Lokalisation der Metastasen scheint also einen Einfluss auf die Expression zu nehmen.

Zelladhäsion unterliegt in metastatischen Zellen einer schnellen Veränderung in der Regulation, Krebszellen können sich so von der ECM loslösen und wieder mit ihr verbinden. Dabei spielen die Integrinliganden eine wichtige Rolle. So auch Fibrinogen und Fibronectin, die in dieser Arbeit ebenfalls ein charakteristisches Expressionsmuster aufweisen und in bestimmten Karzinomtypen gehäuft vorkommen. Bestimmte Abschnitte ihres Signaltransduktionswegs könnten sich daher beispielsweise als möglicher therapeutischer Angriffspunkt anbieten.

Es liegt zwar für bestimmte Integrinsubtypen beziehungsweise Integrinliganden ein bevorzugtes Vorkommen in definierten Karzinomen vor, dennoch erweist sich innerhalb dieses Karzinomtyps eine große Heterogenität, die bezeichnend für das unterschiedliche Ausmaß der Angiogenese, Proliferation, Invasion und Migration ist. Einerseits sind weitere, größere Studien vonnöten, die die heterogene Gruppe der Karzinome in noch bessere und kleinere Kategorien einteilt, um der großen Variationsbreite der Integrinexpression mehr Struktur zu geben und die therapeutische Effizienz zu steigern. Andererseits wäre es wichtig, vor Therapiebeginn beispielsweise die Quantität der Tumorangiogenese bei den zu behandelnden Patienten festzustellen, um eine individuell optimal angepasste Therapie zu ermöglichen. In diesem Bereich wurden mittlerweile schon einige Anstrengungen unternommen. Um das genaue Expressionsmuster der Integrine vorhersagen zu können, wurden beispielsweise radioaktiv markierte  $\alpha\beta 5$ - und  $\alpha\beta 3$ -Antagonisten in Form von kurzen RGD-Peptiden oder monoklonalen Antikörpern getestet, um den Status des Karzinoms zu demonstrieren. Getestet wurden in präklinischen Studien an Zelllinien, in bestimmten Geweben und in Studien an Mäusen (Chen et al, 2004; Gutheil et al, 2006; Liu et al, 2011). Mittels Positronen-Emissions-Tomographie könnte dann nicht nur vor Beginn der Therapie die Effektivität des Zytostatikums vorhergesagt, sondern auch der Verlauf der Therapie überwacht und prognostische Aussagen getroffen werden. Die Effizienz könnte nun noch dadurch erhöht werden, dass je nach Karzinom zuerst nach dem Integrinsubtyp gesucht wird, der gehäuft, das heißt am wahrscheinlichsten, in dem bestimmten Karzinomtyp exprimiert wird. Das

bedeutet beispielsweise für Prostatakarzinome eine Suche nach  $\alpha\beta 5$  und für Mammakarzinome nach  $\alpha\beta 6$ . Das würde helfen, die Patienten zu identifizieren, die von einer gezielten Therapie profitieren könnten und so ließe sich eine individuelle Optimierung der Therapie gewährleisten.

#### **4.10 Zusammenfassung**

Für die von Merck-Serono (Darmstadt, Germany) entwickelten Antikörper gegen die Integrine  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$ ,  $\alpha v$  und CytoB3 als auch für die Antikörper gegen Fibrinogen und Fibronectin konnten in dieser Arbeit an Paraffinschnitten gute Resultate erzielt werden. Dadurch lässt sich die zukünftige Routinearbeit erleichtern. Zudem hat sich die Software „Definiens Tissue Studio“ als kompetentes Medium zur Beurteilung immunhistochemischer Schnitte erwiesen, da in kürzerer Zeit präzisere und objektivere Resultate erzielt werden können.

Nach Betrachtung und Analyse der erhobenen Daten, lässt sich nun sagen, dass sich sowohl zwischen den einzelnen Integrinsubtypen als auch innerhalb eines Subtyps eine große Bandbreite des immunhistochemischen Signals zeigt. Es lässt sich in dieser Arbeit keine Korrelation der Integrinexpression zwischen Primärtumor und Metastase herstellen. Das heißt, das Expressionsmuster im Epithel der Metastase kann sich vom Integrinvorkommen im Epithel des Primärtumors stark unterscheiden und macht daher eine Neubestimmung in Hirnmetastasen vor therapeutischen Ansätzen zwingend notwendig. Jedoch ergeben sich bei einigen Integrinsubtypen signifikante Unterschiede bezüglich der Tumorentität und –histologie. Auch bezüglich des Differenzierungsgrades und der Lokalisation zeigen sich bei bestimmten Integrinsubtypen ebenfalls Unterschiede. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar für bestimmte Integrinsubtypen beziehungsweise Integrinliganden ein bevorzugtes Vorkommen in definierten Karzinomen vorliegt, dennoch erweist sich innerhalb dieses Karzinomtyps eine große Heterogenität. Es sind daher weitere, größere Studien vonnöten, die die heterogene Gruppe der Karzinome in noch bessere und kleinere Kategorien einteilt, um der großen Variationsbreite der Integrinexpression mehr Struktur zu geben.

## Anhang

### I. P-Werte der manuellen Auswertung (ordinalskaliert) mittels Chi-Quadrat-Test

#### I.1 Geschlecht

|               | $\alpha\beta8$ | $\alpha\beta6$ | CytoB3 | $\alpha\beta5$ | $\alpha\gamma$ | Fibronectin | Fibrinogen | $\alpha\beta3$ |
|---------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|-------------|------------|----------------|
| a) GefäÙe     |                |                |        |                |                |             |            |                |
| W:m           | 0,6687         | 0,5122         | 0,6746 | 0,0096         | 0,0320         | 0,7569      | 0,775      | 0,0930         |
| b) Intensität |                |                |        |                |                |             |            |                |
| W:m           | 0,7885         | 0,3141         | 0,6257 | 0,5511         | 0,0375         | 0,1201      | 0,4498     | 0,2978         |
| c) Menge      |                |                |        |                |                |             |            |                |
| W:m           | 0,5728         | 0,116          | 0,7443 | 0,8424         | 0,056          | 0,7959      | 0,4439     | 0,1524         |

#### I.2 Herkunft

|                    | $\alpha\beta8$ | $\alpha\beta6$ | CytoB3 | $\alpha\beta5$ | $\alpha\gamma$ | Fibro-<br>nectin | Fibri-<br>nogen | $\alpha\beta3$ |
|--------------------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|------------------|-----------------|----------------|
| a) GefäÙe          |                |                |        |                |                |                  |                 |                |
| Niere-Mamma        | 0              | 0,3379         | 0,0001 | 0,0117         | 0,3497         | 0,4057           | 0,1662          | 0,53           |
| Niere- Prostata    | 0              | 0              | 0,004  | 0,3503         | 0,0654         | 0,6455           | 0,4973          | 0,9576         |
| Niere-GI           | 0              | 0,4029         | 0,0238 | 0,4029         | 0,3534         | 0,6455           | 0,2339          | 0,2117         |
| Niere- Lunge       | 0,6360         | 0,473          | 0,0001 | 0,0184         | 0,3516         | 0,3484           | 0,1053          | 0,9857         |
| Niere-CUP          | 0,3534         | 0,3534         | 0,0732 | 0,3503         | 0,03           | 0,0993           | 0,3503          | 0,9576         |
| CUP-Mamma          | 0,1604         | 0,9682         | 0,0409 | 0,1079         | 0,0111         | 0,0376           | 0,8124          | 0,5206         |
| CUP-Prostata       | 0,3061         | 0,3061         | 0,0063 | 1              | 0,8897         | 0,1761           | 0,3803          | 1              |
| CUP-GI             | 0,3061         | 0,5908         | 0,0418 | 0,8707         | 0,0650         | 0,1761           | 0,8187          | 0,2960         |
| Lunge-Mamma        | 0,4760         | 0,7379         | 0,3587 | 0,008          | 0,321          | 0,6684           | 0,9264          | 0,1425         |
| CUP-Lunge          | 0,2985         | 0,8395         | 0,2227 | 0,3246         | 0,0444         | 0,0497           | 0,6205          | 0,8506         |
| GI-Mamma           | 0              | 0,3554         | 0,1994 | 0,072          | 0,9697         | 0,7448           | 0,8390          | 0,2777         |
| Prostata-<br>Mamma | 0              | 0,3022         | 0,1103 | 0,0842         | 0,0274         | 0,7448           | 0,1374          | 0,5295         |

|                 |          |        |        |        |        |         |        |         |
|-----------------|----------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|
| Lunge-Prostata  | 0,6054   | 0,4123 | 0,0152 | 0,3426 | 0,1771 | 0,7148  | 0,0944 | 0,8506  |
| GI-Prostata     | 0        | 0,3329 | 0,6640 | 0,8707 | 0,1353 | 1       | 0,3803 | 0,296   |
| Lunge-GI        | 0,6054   | 0,5722 | 0,0667 | 0,0746 | 0,5617 | 0,7148  | 0,8589 | 0,1255  |
| b) Intensität   |          |        |        |        |        |         |        |         |
| Niere-Mamma     | 0,3425   | 0,0272 | 0,0018 | 0,0012 | 0,0078 | 0,4570  | 0,612  | 0,0002  |
| Niere- Prostata | 0,1432   | 0,1157 | 0,1629 | 0,3503 | 0,1293 | 0,4041  | 0,4257 | 0,0045  |
| Niere-GI        | 0,2183   | 0,0099 | 0,0107 | 0,0861 | 0,0854 | 0,0854  | 0,4966 | 0,005   |
| Niere- Lunge    | 0,0995   | 0,0229 | 0,0003 | 0,0228 | 0,1297 | 0,1487  | 0,4612 | 0,0075  |
| Niere-CUP       | 0,671    | 0,0134 | 0,0149 | 0,1055 | 0,0654 | 0,0327  | 0,9576 | 0,1035  |
| CUP-Mamma       | 0,6781   | 0,7410 | 0,4727 | 0,2948 | 0,1350 | 0,0227  | 0,7243 | 0,0276  |
| CUP-Prostata    | 0,1353   | 0,0005 | 0,1761 | 0,2144 | 0,8707 | 0,0869  | 0,2876 | 0,1471  |
| CUP-GI          | 0,2057   | 0,7047 | 0      | 0,9954 | 0,4267 | 0,001   | 0,544  | 0,1820  |
| Lunge-Mamma     | 0,54     | 0,9054 | 0,5288 | 0,4544 | 0,1763 | 0,4314  | 0,6159 | 0,3013  |
| CUP-Lunge       | 0,7204   | 0,4881 | 0,6594 | 0,5817 | 0,2575 | <0,0001 | 0,4644 | 0,6763  |
| GI-Mamma        | 0,5105   | 0,4534 | 0,575  | 0,2203 | 0,4252 | 0,2754  | 0,1690 | 0,6524  |
| Prostata-Mamma  | 0,3544   | 0,001  | 0,2137 | 0,0179 | 0,1905 | 0,5557  | 0,2673 | 0,9416  |
| Lunge-Prostata  | 0,1909   | 0,0002 | 0,0353 | 0,2001 | 0,5661 | 0,2349  | 0,4216 | 0,7119  |
| GI-Prostata     | 0,59     | 0,0002 | 0,1523 | 0,1871 | 0,6193 | 0,2181  | 0,0703 | 0,7523  |
| Lunge-GI        | 0,2491   | 0,3389 | 0,6352 | 0,4735 | 0,8819 | 0,6651  | 0,0965 | 0,775   |
| c) Menge        |          |        |        |        |        |         |        |         |
| Niere-Mamma     | P=0,2344 | 0,2140 | 0,0012 | 0,0873 | 0,3849 | 0,4570  | 0,2806 | <0,0001 |
| Niere- Prostata | 0,0922   | 0,1157 | 0,1219 | 0,288  | 0,236  | 0,3088  | 0,3606 | 0,0066  |
| Niere-GI        | 0,1579   | 0,0533 | 0,0107 | 0,584  | 0,295  | 0,12    | 0,4966 | 0,0029  |
| Niere- Lunge    | 0,3049   | 0,0215 | 0,0002 | 0,0644 | 0,5419 | 0,1617  | 0,6284 | 0,0013  |
| Niere-CUP       | 0,6950   | 0,0143 | 0,0149 | 0,5853 | 0,0654 | 0,111   | 0,5224 | 0,0446  |
| CUP-Mamma       | 0,3179   | 0,1804 | 0,4727 | 0,4026 | 0,3255 | 0,0173  | 0,7739 | 0,1267  |
| CUP-Prostata    | 0,1359   | 0,0005 | 0,1761 | 0,406  | 0,664  | 0,0461  | 0,3342 | 0,2255  |
| CUP-GI          | 0,3482   | 0,3364 | 0      | 0,5530 | 0,5229 | 0,001   | 0,9013 | 0,1375  |
| Lunge-Mamma     | 0,66     | 0,4453 | 0,3219 | 0,6240 | 0,6817 | 0,2855  | 0,6805 | 0,1237  |
| CUP-Lunge       | 0,6379   | 0,5681 | 0,6594 | 0,5351 | 0,0549 | <0,0001 | 0,9019 | 0,5587  |

|                |        |        |        |        |        |        |        |        |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| GI-Mamma       | 0,6431 | 0,6803 | 0,5750 | 0,1296 | 0,9192 | 0,2023 | 0,9443 | 0,1973 |
| Prostata-Mamma | 0,6527 | 0,0027 | 0,3329 | 0,3627 | 0,6757 | 0,4852 | 0,1433 | 0,1262 |
| Lunge-Prostata | 0,3334 | 0,0006 | 0,0353 | 0,1103 | 0,4059 | 0,0602 | 0,4391 | 0,2703 |
| GI-Prostata    | 0,3975 | 0,0007 | 0,1523 | 0,6101 | 0,6534 | 0,0591 | 0,2719 | 0,0729 |
| Lunge-GI       | 0,6480 | 0,2327 | 0,6352 | 0,0301 | 0,3989 | 0,3575 | 0,8711 | 0,1867 |

### I.3 Histologie

|                                      | $\alpha v\beta 8$ | $\alpha v\beta 6$ | CytoB3  | $\alpha v\beta 5$ | $\alpha v$ | Fibro-nectin | Fibri-nogen | $\alpha v\beta 3$ |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------|---------|-------------------|------------|--------------|-------------|-------------------|
| a) GefäÙe                            |                   |                   |         |                   |            |              |             |                   |
| Klarzeller-Kleinzeller               | 0                 | 0                 | 0,0466  | 0,2242            | 0          | 0,4106       | 0,0518      | 0,6881            |
| Klarzeller-Adenokarzinom             | 0,9083            | 0,5559            | <0,0001 | 0,1666            | 0,2843     | 0,3499       | 0,0272      | 0,8764            |
| Klarzeller-Plattenepithelkarzinom    | 0,2308            | 0                 | 0,0252  | 0,0541            | 0,2111     | 0,2586       | 0,0778      | 0,663             |
| Plattenepithelkarzinom-Kleinzeller   | 0,3384            | 0                 | 0,8850  | 0,0637            | 0,3611     | 0,1793       | 0,1297      | 0,8865            |
| Plattenepithelkarzinom-Adenokarzinom | 0,0472            | 0,6430            | 0,8271  | 0,4591            | 0,6861     | 0,7858       | 0,4701      | 0,606             |
| Adenokarzinom-Kleinzeller            | 0,9461            | 0,6917            | 0,5199  | 0,1092            | 0,4522     | 0,2489       | 0,2942      | 0,6876            |
| b) Intensität                        |                   |                   |         |                   |            |              |             |                   |
| Klarzeller-Kleinzeller               | 0,596             | 0,3849            | 0,3066  | 0,0046            | 0          | 0,3501       | 0,5688      | 0,3216            |
| Klarzeller-Adenokarzinom             | 0,5792            | <0,0001           | 0,011   | 0,0450            | 0,0744     | 0,0018       | 0,2797      | 0,0054            |
| Klarzeller-Plattenepithelkarzinom    | 0,0852            | 0,1643            | 0,2407  | 0,0103            | 0,0584     | 0,492        | 0,0195      | 0,1861            |
| Plattenepithelkar-                   | 0,2307            | 0,5465            | 0       | 0,6323            | 0,1552     | 0,5582       | 0,046       | 0,3819            |



|                                      |        |        |        |        |        |        |        |        |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| zinom-Kleinzeller                    |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Plattenepithelkarzinom-Adenokarzinom | 0,336  | 0,3114 | 0,8560 | 0,1884 | 0,5774 | 0,6878 | 0,0344 | 0,8582 |
| Adenokarzinom-Kleinzeller            | 0,8595 | 0,0877 | 0,8861 | 0,0661 | 0,2176 | 0,5454 | 0,1678 | 0,6371 |
| c) Menge                             |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Klarzeller-Kleinzeller               | 0,6722 | 0,3849 | 0,1644 | 0,0434 | 0,7154 | 0,2956 | 0,4204 | 0,2079 |
| Klarzeller-Adenokarzinom             | 0,4026 | 0,0161 | 0,0018 | 0,2021 | 0,5077 | 0,0302 | 0,1373 | 0,0122 |
| Klarzeller-Plattenepithelkarzinom    | 0,2959 | 0,0857 | 0,1225 | 0,0963 | 0,3362 | 0,2326 | 0,0998 | 0,1964 |
| Plattenepithelkarzinom-Kleinzeller   | 0,402  | 0,387  | 0      | 0,8214 | 0,5582 | 0,8190 | 0,3765 | 0,52   |
| Plattenepithelkarzinom-Adenokarzinom | 0,7843 | 0,4551 | 0,9421 | 0,4705 | 0,0028 | 0,8264 | 0,3172 | 0,5408 |
| Adenokarzinom-Kleinzeller            | 0,7052 | 0,4316 | 0,9580 | 0,2213 | 0,5301 | 0,7385 | 0,9478 | 0,8226 |

#### I.4 Lokalisation

|                    | $\alpha v\beta 8$ | $\alpha v\beta 6$ | Cytob3 | $\alpha v\beta 5$ | $\alpha v$ | Fibronectin | Fibrinogen | $\alpha v\beta 3$ |
|--------------------|-------------------|-------------------|--------|-------------------|------------|-------------|------------|-------------------|
| a) GefäÙe          |                   |                   |        |                   |            |             |            |                   |
| Spinalzerebellär   | 0                 | 0,1479            | 0,0993 | 0,4698            | 0,3616     | 0,4463      | 0,165      | 0,4717            |
| Spinalcerebral     | 0,8665            | 0,2631            | 0,0946 | 0,2256            | 0,3033     | 0,4579      | 0,2074     | 0,5916            |
| Cerebralzerebellär | 0,3864            | 0,4529            | 0,7553 | 0,015             | 0,0582     | 0,8076      | 0,7973     | 0,8553            |
| b) Intensität      |                   |                   |        |                   |            |             |            |                   |
| Spinalzere-        | 0,2126            | 0,589             | 0,0387 | 0,9728            | 0,1371     | 0,4635      | 0,1004     | 0,0043            |

|                     |        |        |        |        |        |        |        |        |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| bellär              |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Spinal-cerebral     | 0,7564 | 0,5472 | 0,2106 | 0,5053 | 0,2153 | 0,5216 | 0,1088 | 0,1312 |
| Cerebral-zerebellär | 0,0388 | 0,4298 | 0,1395 | 0,0357 | 0,4895 | 0,4777 | 0,3342 | 0,2402 |
| c) Menge            |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Spinal-zerebellär   | 0,3297 | 0,6455 | 0,0387 | 0,6229 | 0,3563 | 0,9676 | 0,0644 | 0,0173 |
| Spinal-cerebral     | 0,4526 | 0,6428 | 0,2173 | 0,3831 | 0,5818 | 0,7840 | 0,0812 | 0,0839 |
| Cerebral-zerebellär | 0,0595 | 0,856  | 0,3343 | 0,3221 | 0,8353 | 0,2874 | 0,0478 | 0,0731 |

## I.5 Differenzierungsgrad

|               | $\alpha\beta 8$ | $\alpha\beta 6$ | CytoB3 | $\alpha\beta 5$ | $\alpha\gamma$ | Fibronectin | Fibrinogen | $\alpha\gamma 3$ |
|---------------|-----------------|-----------------|--------|-----------------|----------------|-------------|------------|------------------|
| a) Gefäße     |                 |                 |        |                 |                |             |            |                  |
| Wenig-gut     | 0,0031          | 0,6956          | 0,399  | 0,8125          | 0,8306         | 0,2029      | 0,4955     | 0,0262           |
| Mäßig-gut     | 0,0003          | 0,8448          | 0,1665 | 0,868           | 0,6109         | 0,3493      | 0,2738     | 0,0042           |
| Wenig-mäßig   | 0,8005          | 0,4207          | 0,0528 | 0,6671          | 0,5722         | 0,5544      | 0,1225     | 0,7661           |
| b) Intensität |                 |                 |        |                 |                |             |            |                  |
| Wenig-gut     | 0,895           | 0,0321          | 0,2764 | 0,1736          | 0,8510         | 0,4008      | 0,9215     | 0,1991           |
| Mäßig-gut     | 0,9132          | 0,1360          | 0,6326 | 0,662           | 0,8502         | 0,8288      | 0,8219     | 0,2181           |
| Wenig-mäßig   | 0,4731          | 0,0537          | 0,447  | 0,0973          | 0,2992         | 0,2732      | 0,6118     | 0,6977           |
| c) Menge      |                 |                 |        |                 |                |             |            |                  |
| Wenig-gut     | 0,3891          | 0,0365          | 0,3655 | 0,8531          | 0,6406         | 0,5319      | 0,2844     | 0,1079           |
| Mäßig-gut     | 0,1146          | 0,1443          | 0,4438 | 0,9450          | 0,8721         | 0,9398      | 0,004      | 0,094            |
| Wenig-mäßig   | 0,258           | 0,1076          | 0,3737 | 0,4295          | 0,2576         | 0,3734      | 0,6431     | 0,1476           |

## II. P-Werte der digitalen Auswertung (kontinuierlich skaliert) mittels Student's t-test

### II.1 Herkunft

|             | $\alpha\beta 8$ | $\alpha\beta 6$ | Cytob3 | $\alpha\beta 5$ | $\alpha\gamma$ | Fibronectin | Fibrinogen | $\alpha\beta 3$ |
|-------------|-----------------|-----------------|--------|-----------------|----------------|-------------|------------|-----------------|
| Lunge-Mamma | 0,1368          | 0,203           | 0,2528 | 0,7381          | 0,7148         | 0,1126      | 0,7100     | 0,4072          |
| Lunge-GI    | 0,2244          | 0,3023          | 0,3733 | 0,1023          | 0,8404         | 0,2774      | 0,2606     | 0,8024          |
| GI-Mamma    | 0,0510          | 0,8217          | 0,6972 | 0,18            | 0,6921         | 0,0585      | 0,4013     | 0,4798          |

### II.2 Histologie

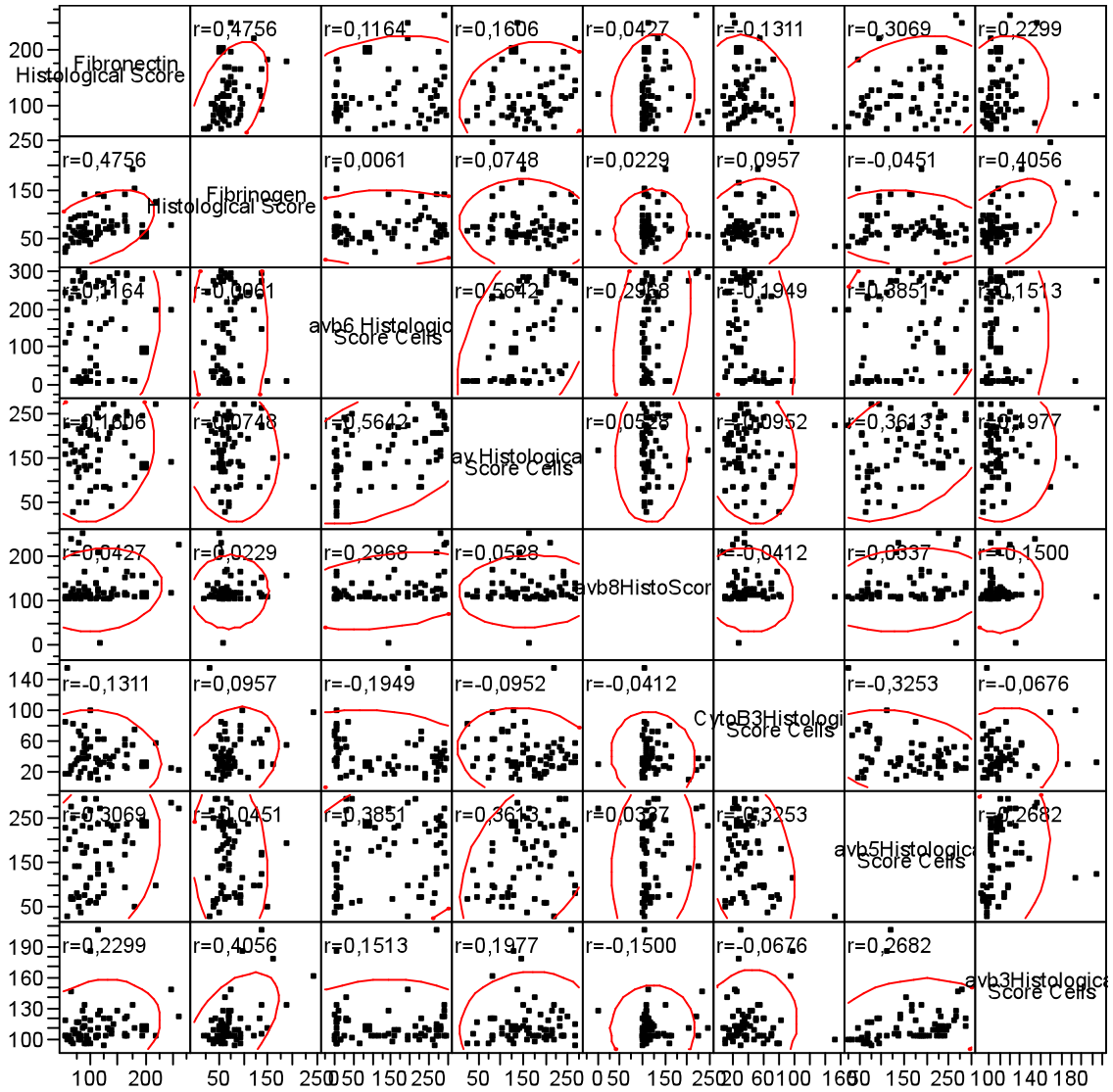
|                                      | $\alpha\beta 8$ | $\alpha\beta 6$ | Cy-tob3 | $\alpha\beta 5$ | $\alpha\gamma$ | Fibronectin | Fibrinogen | $\alpha\beta 3$ |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|---------|-----------------|----------------|-------------|------------|-----------------|
| Adenokarzinom-Kleinzeller            | 0,2725          | 0,8876          | 0,3538  | 0,2879          | 0,263          | 0,6234      | 0,8310     | 0,3522          |
| Adenokarzinom-Plattenepithelkarzinom | 0,4167          | 0,1204          | 0,2872  | 0,2841          | 0,8395         | 0,3574      | 0,4993     | 0,9277          |
| Kleinzeller-Plattenepithelkarzinom   | 0,8301          | 0,2940          | 0,9178  | 0,995           | 0,4969         | 0,7499      | 0,7336     | 0,5373          |

### III. Multivariate Integrinintensität der digitalen Analyse

#### III.1 paarweise Korrelationsanalyse

| Variable                                 | by Variable                              | Correlation | Count | Signif Prob |
|--|--|-------------|-------|-------------|
| Fibrinogen Histological Score Cells      | Fibronectin Histological Score Cells     | 0,4625      | 63    | 0,0001      |
| $\alpha\beta 6$ Histological Score Cells | Fibronectin Histological Score Cells     | 0,1640      | 65    | 0,1917      |
| $\alpha\beta 6$ Histological Score Cells | Fibrinogen Histological Score Cells      | 0,0388      | 64    | 0,7610      |
| $\alpha\gamma$ Histological Score Cells  | Fibronectin Histological Score Cells     | 0,1773      | 62    | 0,1681      |
| $\alpha\gamma$ Histological Score Cells  | Fibrinogen Histological Score Cells      | -0,0894     | 65    | 0,4786      |
| $\alpha\gamma$ Histological Score Cells  | $\alpha\beta 6$ Histological Score Cells | 0,4868      | 64    | <,0001      |
| $\alpha\beta 8$ HistoScore               | Fibronectin Histological Score Cells     | 0,1317      | 61    | 0,3118      |
| $\alpha\beta 8$ HistoScore               | Fibrinogen Histological Score Cells      | 0,0304      | 59    | 0,8191      |
| $\alpha\beta 8$ HistoScore               | $\alpha\beta 6$ Histological Score Cells | 0,3261      | 60    | 0,0110      |
| $\alpha\beta 8$ HistoScore               | $\alpha\gamma$ Histological Score Cells  | 0,0664      | 59    | 0,6171      |
| CytoB3Histological Score Cells           | Fibronectin Histological Score Cells     | -0,1590     | 62    | 0,2172      |
| CytoB3Histological Score Cells           | Fibrinogen Histological Score Cells      | 0,2183      | 63    | 0,0856      |
| CytoB3Histological Score Cells           | $\alpha\beta 6$ Histological Score Cells | -0,2339     | 63    | 0,0650      |
| CytoB3Histological Score Cells           | $\alpha\gamma$ Histological Score Cells  | -0,1569     | 65    | 0,2120      |
| CytoB3Histological Score Cells           | $\alpha\beta 8$ HistoScore               | -0,1050     | 60    | 0,4247      |
| $\alpha\beta 5$ Histological Score Cells | Fibronectin Histological Score Cells     | 0,2665      | 65    | 0,0319      |
| $\alpha\beta 5$ Histological Score Cells | Fibrinogen Histological Score Cells      | -0,1246     | 64    | 0,3265      |
| $\alpha\beta 5$ Histological Score Cells | $\alpha\beta 6$ Histological Score Cells | 0,3199      | 65    | 0,0094      |
| $\alpha\beta 5$ Histological Score Cells | $\alpha\gamma$ Histological Score Cells  | 0,4171      | 63    | 0,0007      |
| $\alpha\beta 5$ Histological Score Cells | $\alpha\beta 8$ HistoScore               | 0,1691      | 61    | 0,1926      |
| $\alpha\beta 5$ Histological Score Cells | CytoB3Histological Score Cells           | -0,3299     | 63    | 0,0083      |
| $\alpha\beta 3$ Histological Score Cells | Fibronectin Histological Score Cells     | 0,1612      | 64    | 0,2033      |
| $\alpha\beta 3$ Histological Score Cells | Fibrinogen Histological Score Cells      | 0,5163      | 65    | <,0001      |
| $\alpha\beta 3$ Histological Score Cells | $\alpha\beta 6$ Histological Score Cells | 0,0163      | 64    | 0,8983      |
| $\alpha\beta 3$ Histological Score Cells | $\alpha\gamma$ Histological Score Cells  | 0,0759      | 64    | 0,5512      |
| $\alpha\beta 3$ Histological Score Cells | $\alpha\beta 8$ HistoScore               | 0,0132      | 60    | 0,9205      |
| $\alpha\beta 3$ Histological Score Cells | CytoB3Histological Score Cells           | 0,0842      | 64    | 0,5082      |
| $\alpha\beta 3$ Histological Score Cells | $\alpha\beta 5$ Histological Score Cells | 0,2367      | 65    | 0,0576      |

### III. 2 Scatterplot Matrix



## Literaturverzeichnis

Akerley W, Boucher KM, Bentz JS, Arbogast K, Walters T. A phase II study of erlotinib as initial treatment for patients with stage IIIB-IV non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009; 4: 214-219

Ahmed N, Pansino F, Clyde R, Murthi P, Quinn MA, Rice GE, et al. Overexpression of alpha(v)beta6 integrin in serous epithelial ovarian cancer regulates extracellular matrix degradation via the plasminogen activation cascade. *Carcinogenesis.* 2002; 23: 237-244

Akhurst RJ, Balmain A. Genetic events and the role of TGF beta in epithelial tumor progression. *J Pathol.* 1999; 187: 82-90

Albert JM, Cao C, Geng L, Leavitt L, Hallahan DE, Lu B. Integrin alpha v beta 3 antagonist Cilengtide enhances efficacy of radiotherapy in endothelial cell and non-small-cell lung cancer models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 65: 1536-1543

Alderson P.O., Adams D.F McNeil B.J., Sanders R., Siegelman S.S., Finberg H.J., Hessel S.J., Abrams H.L. Computed tomography, ultrasound, and scintigraphy of the liver in patients with colon or breast carcinoma: a prospective comparison. *Radiology.* 1983; 149: 225-230

Amaravadi RK, Schuchter LM, McDermott DF, Kramer A, Giles L, Gramlich K, Carberry M, Troxel AB, Letrero R, Nathanson KL, Atkins MB, O'Dwyer PJ, Flaherty KT. Phase II Trial of Temozolomide and Sorafenib in Advanced Melanoma Patients with or without Brain Metastases. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 7711-7718

Arihiro K, Kaneko K, Fujii S, Inai K, Yokosaki Y. Significance of alpha9beta1 and alphavbeta6 integrin expression in breast carcinoma. *Breast Cancer.* 2000; 7: 19-26

Bandyopadhyay A and Raghavan S. Defining the role of integrin alphavbeta6 in cancer. *Curr Drug Targets.* 2009; 10: 645-652

Barkan D, Green JE, Chambers AF. Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer.* 2010; 46: 1181-1188

Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, et al. Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Investig.* 2005; 115: 339-347

Beekman KW, Colevas AD, Cooney K, Dipaola R, Dunn RI, Gross M, Keller ET, Pienta KJ, Ryan CJ, Smith D, Hussain M. Phase II evaluations of cilengitide in asymptomatic patients with androgen-independent prostate cancer: scientific rational study design. *Clin Genitourin Cancer*. 2006; 4: 299-302

Bello L, Francolini M, Marthyn P, et al. Alpha (v) beta3 and alpha (v) beta 5 integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery*. 2001; 49: 380-389

Bendell J, Domchek S, Burstein H, Harris L, Younger J, Kuter I, et al. Central Nervous System Metastases in Women who Receive Trastuzumab-Based Therapy for Metastatic Breast Carcinoma. *Cancer*. 2003; 97: 2972-2977

Berghoff A, Bago-Horvath Z, De Vries C, Dubsky P, Pluschnig U, Rudas M, Rottenfusser A, Knauer M, Eiter H, Fitzal F, Dieckmann K, Mader RM, Gnant M, Zielinski CC, Steger GG, Preusser M, Bartsch R. Brain metastases free survival differs between breast cancer subtypes. *Br J Cancer*. 2012 ; 106: 440-446

Biggerstaff, J. P., N. Seth, A. Amirkhosravi, M. Amaya, S. Fogarty, T. V. Meyer, F. Siddiqui, and J. L. Francis. Soluble fibrin augments platelet/tumor cell adherence in vitro and in vivo, and enhances experimental metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 1999; 17: 723-730

Bissel MJ, Rizki A, Mian IS. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr Opin Cell Biol*. 2003; 15: 753-762

Bloom HJ, Richardson WW, Field JR. Host resistance and survival in carcinoma of breast: a study of 104 cases of medullary carcinoma in a series of 1,411 cases of breast cancer followed for 20 years. *Br Med J*. 1997; 3: 181-188

Boenisch T, Herausgeber. *Handbuch Immunchemische Färbemethoden*. Dako Deutschland GmbH, Hamburg 2006

Breuss JM, Gillet N, Lu L, Sheppard D, Pytela R. Restricted distribution integrin  $\beta 6$  mRNA in primate epithelial tissue. *J Histochem Cytochem*. 1993; 41: 1521-1527

Cambier S, Gline S, Mu D, Collins R, Araya J, Dolganov G, Einheber S, Boudreau N, Nishimura SL. Integrin  $\alpha(v)\beta 8$ -mediated activation of transforming growth factor- $\beta$  by perivascular astrocytes: an angiogenic control switch. *Am J Pathol*. 2005; 166: 1883-1894

Cambier S, Mu D, O'Connell D, Boylen K, Travis W, Liu WH, Broaddus VC, Nishimura SL. A role of the integrin  $\alpha v\beta 8$  in the negative regulation of epithelial cell growth. *Cancer Res*. 2000; 60: 7084-7093

Carbonell WS, Ansorge O, Sibson N, Muschel R. The vascular basement membrane as "soil" in brain metastasis. *PLoS One* 2009; 4: e5857

Carey LA, Ewend MG, Metzger R, Sawyer L, Dees EC, Sartor CI, et al Central nervous system metastases in women after multimodality therapy for high risk breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; 88: 273-280

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and disease. *Nature.* 2000; 407: 249-257

Carragher NO, Fincham VJ, Riley D and Frame MC. Cleavage of focal adhesion kinase by different proteases during SRC-regulated transformation and apoptosis. Distinct roles for calpain and caspases. *J Biol Chem.* 2001; 276: 4270-4275

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 563-572

Chambers AF, Naumov GN, Varghese HJ, Nadkarni KV, MacDonald IC, Groom AC. Critical steps in hematogenous metastasis. An overview. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001; 10: 243-255

Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, et al Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol.* 2004; 2: E7

Chang HY, Nuyten DS, Sneddon JB, et al Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 3738-3743

Chen X, Park R, Shahinian A.H, Tohme M, Khankaldyyan V, Bozorgzadeh M.H, Bading J.R, Moats R, Laug W.E, Conti P.S. 18F-labeled RGD peptide: initial evaluation for imaging brain tumor angiogenesis. *Nucl Med Biol.* 2004; 31: 179-189

Demicheli R, Valagussa P, Bonadonna G. Does surgery modify growth kinetics of breast cancer micrometastases? *Br J Cancer.* 2001; 85: 490-492

Devarajan E, Song YH, Krishnappa S, Alt E. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer lines is mediated through PDGF-D released by tissue-resident stem cells. *Int J Cancer.* doi: 10.1002/ijc.26493

Dong G, Chen Z, Kato T, Van Waes C: The host environment promotes the constitutive activation of nuclear factor-kappaB and proinflammatory cytokine expression during metastatic tumor progression of murine squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1999; 59: 3495-3504

Dudek AZ, Mahaseth H. Circulating angiogenic cytokines in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with treatment response and survival *Cancer Invest.* 2005; 23: 193-200



Du Toit RS, Locker AP, Ellis IO, Elston CW, Nicholson RI, Blamey RW. Invasive lobular carcinomas of the breast-the prognosis of histopathological subtypes. *Br J Cancer*. 1989; 60: 605-609

Eckhardt BL, Parker BS, van Laar RK, Restall CM, Natoli AL, Tavarria MD, Stanley KL, Sloan EK, Moseley JM, Anderson RL. Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. *Mol Cancer Res*. 2005; 3: 1-13

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991; 19: 403-410

Elston C.W., Ellis I.O. Classification of malignant breast disease. In: *The Breast Systemic Pathology*. CW Elston and IO Ellis (Ed.) Churchill Livingstone: Edinburgh, 1998; 239-247

Enns A, Korb T, Schlüter K, Gassmann P, Spiegel HU, Senninger N, Mitjans F, Haier J. Alpha5beta1-integrins mediate early steps of metastasis formation. *Eur J Cancer*. 2005; 41: 1065-1072

Evans A, James J, Cornford E, Chan S, Burrell H, Pinder S, et al Brain metastases from breast cancer: identification of a high-risk group. *Clin Oncol*. 2004; 16: 345-349

Fabi A, Felici A, Metro G, Mirri A, Bria E, Telera S, Moscetti L, Russillo M, Lanzetta G, Mansueto G, Pace A, Maschio M, Vidiri A, Sperduti I, Cognetti F, Carapella CM. Brain metastases from solid tumors: disease outcome according to type of treatment and therapeutic resources of the treating center. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011; 30: 10

Felding-Habermann B, Müller BM, Rosmerdahl CA, Cheresh DA. Involvement of integrin alphaV gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J Clin Invest*. 1992; 89: 2018-2022

Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH, Hughes PE, Pampori N, Shattil SJ, Saven A, Mueller BM. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 1853-1858

Fidler IJ, Langley RR. The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*. 2011; 128: 2527-2535

Fitzgerald DJ. Fibrinogen receptor and platelet signalling. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999; 10 Suppl 1: S77-79

Friess H, Langrehr JM, Oettle H, Raedle J, et al A randomized multi-center phase II trial of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) and gemcitabine compared with gemcitabine alone in advanced unresectable pancreatic cancer. *BMC Cancer*. 2005; 6: 258

Gavrilovic IT, Posner JB. Brain metastases: epidemiology and pathophysiology. *J Neuro-Oncol*. 2005; 75: 5-14

Ghia A, Tomé WA, Thomas S, Cannon G, Khuntia D, Kuo JS, Mehta MP. Distribution of brain metastases in relation to the hippocampus: implications for neurocognitive functional preservation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007; 68: 971-977

Gingras MC, Roussel E, Bruner JM, et al Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *J Neuroimmunol*. 1995; 57: 143-153

Gladson CL. Expression of integrin alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastoma tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 1143-1149

Glick AB. TGF $\beta$ 1, Back to the Future. Revisiting its Role as a Transforming Growth Factor. *Cancer Biology and Therapy*. 2004; 3: 276-283

Goldberg SF, Harms JF, Quon K, et al Metastasis-suppressed C8161 melanoma cells arrest in lung but fail to proliferate *Clin Exp Metastasis*. 1999; 1,7: 601-607

Gould RJ, Polokoff MA, Friedmann PA et al Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1990; 195: 168-171

Gout S, Huot J. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron*. 2008; 1: 69-83

Greve J, Schuler PJ, Bas M, Adamzik M, Brandau S, Arweiler-Harbeck D, Lang S, Hoffmann TK. Coagulation factors as potential tumour markers in patients with head and neck carcinomas. *Laryngorhinootologie*. 2010; 89: 612-615

Gril B, Evans L, Palmieri D, Steeg PS. Translational research in brain metastasis is identifying molecular pathways that may lead to the development of new therapeutic strategies. *Eur J Cancer*. 2010; 46: 1204-1210

Gutheil J.C. Campbell T.N. Pierce P.R. Watkins J.D. Huse W.D. Bodkin D.J. Cheresch D.A. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 3056-3061

Han S, Ritzenthaler JD, Sitaraman SV, Roman J. Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281: 29614-29624

Hecht JL, Dolinski BM, Gardner HA, Violette SM, Weinreb PH. Overexpression of the alphavbeta6 integrin in endometrial cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008; 16: 543-547

Herth FJF, Eberhardt R. Screeningprogramme für das Bronchialkarzinom – Contra. *Dtsch Med Wochenschr*. 2005; 130: 467

Hu M, Carles-Kinch KL, Zelinski DP, Kinch MS. EphA2 induction of fibronectin creates a permissive microenvironment for malignant cells. *Mol Cancer Res*. 2004; 2: 533-540

Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ: Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion and metastasis. *Oncogene*. 2001; 20: 4188-4197

Hubbs JL, Boyd JA, Hollis D, Chino JP, Saynak M, Kelsey CR. Factors associated with the development of brain metastases: analysis of 975 patients with early stage nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2010; 116: 5038-5046.

Huisman A, Looijen A, Van den Brink S, Diest P. Creation of a fully digital pathology slide archive by high-volume tissue slide scanning. *Hum Pathol*. 2010; 41: 751-757

Janes SM, Watt FM. Switch from alphavbeta5 to alphavbeta6 integrin expression protects squamous cell carcinomas from anoikis. *J Cell Biol*. 2004; 166: 419-431

Jellinger K. Häufigkeit und Charakteristik der zerebralen Karzinom-Metastasen; Hirnmetastasen – Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. Zuckschwerdt, München 1984

Jin H., Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer*. 2004; 90: 561-565

Jodele S, Blavier L, Yoon JM, DeClerck YA. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2006; 25: 35-43

Johnson JD, Young B. Demographics of brain metastases. *Clin N Am*. 1996; 7: 337-344

Kang Y, Siegel PM, Shu W, et al A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 2003; 3: 537-549

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S et al VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the premetastatic niche. *Nature*. 2005; 438: 820-827

Kaplan RN, Rfii S, Lyden D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res*. 2006; 66: 11089-11093

Kaya A, Ciledag A, Gulbay BE, et al The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels ins sera of non-small cell lung cancer patients. *Respir Med*. 2004; 98: 632-636

Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 3271-3277

Khan S, Lakhe-Reddy S, McCarty JH, Sorenson CM, Sheibani N, Reichardt LF, Kim JH, Wang B, Sedor JR, Schelling JR. Mesangial cell integrin avb8 provides glomerular endothelial cell cytoprotection by sequestering TGF $\beta$ 1 and regulating PECAM-1. *Am J Pathol*. 2011; 178: 609-620

Kim S, Bakre M, yin H, Varner J. Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A. *J Clin Invest*. 2002; 110: 933-941

Klein CA, Holzel D. Systemic cancer progression and tumor dormancy: mathematical models meet single cell genomics. *Cell Cycle*. 2006; 5: 1788-1798

Kohlberger PD, Breltenecker F, Kalder A, Losch A, Gitsch G, Breitenecker G, et al Modified true-color computer-assisted image analysis versus subjective scoring of estrogen receptor expression in breast cancer: A comparison. *Anticancer Res*. 1999; 19: 2189-2193

Kondziolka D, Patel A, Lunsford LD, Kassam A, Flickinger JC. Stereotactic radiosurgery plus whole brain radiotherapy versus radiotherapy alone for patients with multiple brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999; 45: 427-434

Kusters B, Leenders WP, Wesseling P, Smits D, Verrijp K, Ruiter DJ, et al Vascular endothelial growth factor-A(165) induces progression of melanoma brain metastases without induction of sprouting angiogenesis. *Cancer Res*. 2002; 62: 341-345

Landis R, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. In: *Biometrics*. 1977; 33: 159-174

Leenders W, Kusters B, Verrijp K, Maass C, Wesseling P, Heerschap A, et al Antiangiogenic Therapy of cerebral Melanoma Metastases Results in Sustained

Tumor Progression via Vessel Co-Option. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 6222-6230

Liapis H, Flath A, Kitazawa S. Integrin alpha V beta 3 expression by bone-residing breast cancer metastases. *Diagn Mol Pathol.* 1996; 5: 127-135

Lim M, Guccione S, Haddix T, Sims I, Cheshier S, Chu P, Vogel H, Harsh G. alpha(v)beta(3) integrin in central nervous system tumors. *Hum Pathol.* 2005; 36: 665-669

Liu Z, Jia B, Zhao H, Chen X, Wang F. Specific targeting of human integrin alpha(v)beta (3) with (111)In-labeled Abegrin in nude mouse models. *Mol Imaging Biol.* 2011; 13: 112-120

Lloyd MC, Allam-Nandyala P, Purohit CN, Burke N, Coppola D, Bui MM. Using image analysis as a tool for assessment of prognostic and predictive biomarkers for breast cancer: How reliable is it? *J Pathol Inform.* 2010; 1: 29

Lorger M, Krueger JS, O'Neal M, Staffin K, Felding-Habermann B. Activation of tumor cell integrin alphavbeta3 controls angiogenesis and metastatic growth in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 10666-10671

Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol.* 1998; 153: 865-873

MacDonald JT, Stewart CF, Kocak M, Goldman S, Ellenbogen RG, Phillips P, Lafond D, Young Poussaint T, Kieran MW, Boyett JM, Kun LE. Phase I clinical trial of cilengitide in children with refractory brain tumors: Pediatric brain tumor consortium study PBTC-012. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 919-924

Markland FS, Shieh K, Zhou Q et al A novel snake venom disintegrin that inhibits human varian cancer dissemination and angiogenesis in an orthotopic nude mouse model. *Haemostasis.* 2001; 31: 183-191

Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Hirota M, Hamada S, Shimosegawa T. Fibrinogen induces cytokine and collagen production in pancreatic stellate cells. *Gut.* 2009; 58: 550-559

Matjans F, Sander D, Adán J, Sutter A, Martinez JM, Jäggle CS, Moyano JM, Kreysch HG, Piulats J, Goodman SL. An anti-alpha v-integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice. *J Cell Sci.* 1998; 108: 2825-2838

Matter ML, Ruoslahti E. A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem.* 2001; 276: 27757-27763

McCarty JH, Monahan-Earley RA, Brown LF, Keller M, Gerhardt H, Rubin K, Shani M, Dvorak HF, Wolburg H, Bader BL, Dvorak AM, Hynes RO. Defective associations between blood vessels and brain parenchyma lead to cerebral hemorrhage in mice lacking alphav integrins. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 7667-7677

Mc Closkey SA, Botnick LE, Rose CM, Malcolm AW, Ozohan ML, Mena R, Llasmas L, Tao ML. Long-term outcomes after breast conservation therapy for early stage breast cancer in a community setting. *Breast J.* 2006; 12: 138-144

Meng XN, Jin Y, Yu Y, Bai J, Liu GY, Zhu J, Zhao YZ, Wang Z, Chen F, Lee KY, et al: Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. *British journal of cancer.* 2009; 101: 327-334

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM et al Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature.* 2005; 436: 518-524

Moch, H., Gasser, T., Amin, M.B., Torhorst, J., Sauter, G., Mihatsch, M.J. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma. *Cancer.* 2000; 89: 604-614

Mofidi R, Walsh R, Ridgway PF, Crotty T, McDermott EW, Keavney TV, et al Objective measurement of breast cancer oestrogen receptor status through digital image analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2003; 29: 20-24

Montgomery AM, Reisfeld RA, Cheresch DA. Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91: 8856-8860

Mountzios G, Emmanouilidis C, Vardakis N, Kontopodis E, Hatzidaki D, Popis E, Karachaliou N, Kotsakis A, Agelidou M, Georgoulas V. Paclitaxel plus bevacizumab in patients with chemoresistant relapsed small cell lung cancer as salvage treatment: A phase II multicenter study of the Hellenic Oncology Research Group. *Lung Cancer.* doi: 10.1016/j.lungcan.2012.02.002

Moyle M, Napier MA, McLean JW. Cloning and expression of a divergent integrin subunit beta 8. *J Biol Chem.* 1991; 266: 19650-19658

Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulation pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.* 1999; 96: 319-328

Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, Hochberg F, Narasimha S, Akella S, Fisher JD, et al Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 1651-1657

Nathoo N, Chahlavi A, Barnett GH, Toms SA. Pathobiology of brain metastases. *J Clin pathol.* 2004; 58: 237-242

Naumov GN, Wilson SM, MacDonald IC, Schmidt EE, Morris VL, Groom AC, Hoffman RM, Chambers AE. Cellular expression of green fluorescent protein, coupled with high-resolution in vivo videomicroscopy, to monitor steps in tumor metastasis *J Cell Sci.* 1999; 112: 1835-1842

Naumov GN, MacDonald IC, Weinmeister PM, et al Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. *Cancer Res.* 2002; 62: 2162-2168

Nayak L, Lee EQ, Wen PY. Epidemiology of brain metastases. *Curr Oncol Rep.* 2012; 14: 48-54

Nishimura SL, Boylen KP, Einheber S, Milner TA, Ramos DM, Pytela R. Synaptic and glial localization of the integrin  $\alpha$ v $\beta$ 8 in mouse and rat brain. *Brain Res.* 1998; 791: 271-282

Nugent JL, Bunn PA Jr, Matthews MJ, et al CNS metastases in small cell bronchogenic carcinoma: increasing frequency and changing pattern with lengthening survival. *Cancer.* 1979; 44: 1885-1893

Pantel K, Schlimok G, Braun S, et al Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85: 1419-1424

Park ES, Kim SJ, Kim SW, Yoon SL, Leem SH, Kim SB, Kim SM, Park YY, Cheong JH, Woo HG, Mills GB, Fidler IJ, Lee JS. Cross-species hybridization of microarrays for studying tumor transcriptome of brain metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 17456-17461

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Pisani P, Estimating the world cancer burden : Globocan 2000. *Int J Cancer.* 2001; 94: 153-156

Pavlidis N, Fizazi K. Carcinoma of unknown primary (CUP). *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009; 69: 271-278

Pelayo R, et al Cell cycle quiescence of early lymphoid progenitors in adult bone marrow. *Stem Cells.* 2006; 24: 2703-2713

Petersen I, Wick W, Schmutzler RK, Wolfarth B, Lenartz D, Bierhoff E, Hümmerich J, Müller DJ, Stangl AP, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A. Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to a metastatic stage in breast cancer. *Oncogene.* 1996; 12: 973-978

Petitsclerc E, Stromblad S, von Schalscha TL, Mitjans F, Piulats J, Montgomery AM, Cheresh DA and Brooks PC. Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res.* 1999; 59: 2724-2730

Picon A, Gold LI, Wang J, Cohen A, Friedman E. A subset of metastatic human colon cancers expresses elevated levels of transforming growth factor beta1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 7: 497-504

Posner JB. Management of brain metastases. *Rev Neurol.* 1992; 148: 477-487

Preusser M, Capper D, Ilhan-Mutlu A, Berghoff AS, Birner P, Bartsch R, Marosi C, Zielinski C, Mehta MP, Winkler F, Wick W, von Deimling A. Brain metastases: pathobiology and emerging targeted therapies. *Acta Neuropathol.* 2012; 123: 205-222

Proctor JM, Zang K, Wang D, Wang R, Reichardt LF. Vascular development of the brain requires beta8 integrin expression in the neuroepithelium. *J Neurosci.* 2005; 25: 9940-9948

Prudkin L, Liu D, Ozburn NC, Sun M, Behrens C, Tang X, Brown KC, Bekele BN, Moran C, Wistuba II. Epithelial-to-mesenchymal transition in the development and progression of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol.* 2009; 20: 668-678

Ranasinghe MG, Sheehan JM. Surgical management of brain metastases. *Neurosurg Focus.* 2007; 22: E2

Rasmussen BB, Rose C, Thorpe SM, Andersen KW, Hou-jensen K. Argyrophilic cells in 202 human mucinous breast carcinomas. Relation to histopathologic and clinical factors. *Am J Clin Pathol.* 1985; 84: 737-740

Reardon DA, Nabors LB, Stupp R, Mikkelsen T. Cilengitide. An integrin-targeted arginine-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008; 17: 1225-1235

Rice J, Courter DL, Giachelli CM, Scatena M. Molecular mediators of alpha(v)beta3-induced endothelial cell survival. *J Vasc Res.* 2006; 43: 422-436

Sandock DS, Seftel AD, Resnick MI. A new protocol for the followup of renal cell carcinoma based on pathological stage. *J Urol.* 1995; 154: 28-31

Sapino A, Righi L, Cassoni P, Papotti M, Pietribasi F, Bussolati G. Expression of the neuroendocrine phenotype in carcinomas of the breast. *Semin Diagn Pathol* 2000; 17: 127-137



Scarborough R.M., Kleiman N.S. and Philipps D.R. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists: What are the relevant issues concerning their pharmacology and clinical use? *Circulation*. 1999; 100: 437-444

Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM. NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol*. 1998; 141: 1083-1093

Schittenhelm J, Trautmann K, Tabatabai G, Hermann C, Meyermann R, Beschoner R. Comparative analysis of annexin-1 in neuroepithelial tumors shows altered expression with the grade of malignancy but is not associated with survival. *Mod Pathol*. 2009; 22: 1600-1611

Schwab E. Immunhistochemische Expressionsanalyse von Hirntumorgewebe mit Integrin alpha-v-beta spezifischen Antikörpern und ihren Liganden. Hochschuldissertationsschrift, eingereicht 2012

Serizawa T, Ono J, Ichi T, Matsuda S, Sato M, Odaki M, Hirai S, Osato K, Saeki N, Yamaura A. Gamma knife radiosurgery for metastatic brain tumors from lung cancer: a comparison between small cell and non-small cell carcinoma. *J Neurosurg*. 2002; 97: 484-488

Seute T, Leffers P, ten Velde GPM, Twijnstra A. Neurologic disorders in 432 consecutive patients with small cell lung carcinoma. *Cancer*. 2004; 100: 801-806

Sheehan JP, Sun MH, Kondziolka D, et al. Radiosurgery in patients with renal cell carcinoma metastasis to the brain: long-term outcomes and prognostic factors influencing survival and local tumor control. *J Neurosurg*. 2003; 98: 342-349

Shmueli E, Wigler N, Inbar M. Central nervous system progression among patients with metastatic breast cancer responding to trastuzumab treatment. *Eur J Cancer*. 2004; 91: 639-643

Sipos B, Hahn D, Carceller A, Piulats J, Hedderich J, Kalthoff H. Immunohistochemical screening for  $\beta$ 6-Integrin subunit expression in adenocarcinomas using a novel monoclonal antibody reveals strong up-regulation in pancreatic ductal adenocarcinomas in vivo and in vitro. *Histopathology*. 2004; 45: 226-236

Sloan EK, Pouliot N, Stanley KL, Chia J, Moseley JM, Hards DK, Anderson RL. Tumor-specific expression of alphavbeta3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Res*. 2006; 8: R20

Stromblad S, Becker JC, Yebra m, Brooks PC and Cheresh DA. Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular integrin alpha(v)beta3 during angiogenesis. *J Clin Invest*. 1996; 98: 426-433

Stupack DG. Review : The biology of integrins. *Oncology* (Williston Park). 2007; 21: 6-12

Stupack DG, Puente XS, Butsaboualoy S, Storgard CM, Cheresh DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol.* 2001; 155: 459-470

Stupp R, Rugg C. Integrin inhibitors reaching the clinic. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 1651-1657

Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, Yeh N, Crowl Bancroft C, Sausville E, Adams J, Elliott p, Van Waes C: Novel proteasome inhibitors PS-341 inhibits activation of nuclear factor kappaB, cell survival, tumor growth and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin cancer Res.* 2001; 7: 1419-1428

Swenson S, Cosa F, Minea R et al Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3: 499-511

Taherian A, Li X, Liu Y, Haas TA. Differences in integrin expression and signalling within human breast cancer cells. *Cancer.* 2011; 11: 293

Takayama S, Ishii S, Ikeda T, Masamura S, Doi M, Kitajima M. The relationship between bone metastasis from human breast cancer and integrin alpha(v)beta3 expression. *Anticancer Res.* 2005 ; 25: 79-83

Tantivejkul K, Kalikin LM, Pienta KJ. Dynamic process of prostate cancer metastasis to bone. *J Cell Biochem.* 2004; 91: 706-717

Tchaicha JH, Reyes SB, Shin J, Hossain MG, Lang FF, McCarty JH. Glioblastoma angiogenesis and tumor cell invasiveness are differentially regulated by beta8 integrin. *Cancer Res.* 2011; 71: 6371-6381

Tchaicha JH, Mobley AK, Mohammad GH, Kenneth DA, McCarty JH. A mosaic mouse model of astrocytoma identifies avβ8 integrin as an essential regulator of tumor-induced angiogenesis. *Oncogene.* 2010; 29: 4460-4472

Tian QF, Wang XY, Lü WG, Ye F, Xie X. Analysis of the relationship between clinicopathological features and pelvic lymph node metastasis in patients with early stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2008; 43: 760-763

Thoenes W., Störckle S., Rumplet H.L. Histopathology and Classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histological elements and their use for diagnostics. *Pathol Res Pract.* 1986; 181: 125-143

Thomas G.J., Lewis M.P., Hart I.R. et al AlphaVbeta6 integrin promotes invasion of squamous carcinoma cells through up-regulation of matrix metalloproteinase 9. *Int J Cancer*. 2000; 92: 641-650

Toikkanen SD, Pylkkanen L, Joensuu H . Invasive lobular carcinoma of the breast has better short- and long-term survival than invasive ductal carcinoma. *Br J Cancer*. 1997; 76: 1234-1240

Townson JL, Naumov GN, Chambers AF. The role of apoptosis in tumor progression and metastasis. *Curr Mol Med*. 2003; 3: 631-642

Weaver VM, Petersen OW, Wang F, et al Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol*. 1997; 137: 231-245

Wechsel HW, Petri E, Feil G, Nelde HJ, Bichler KH, Loeser W. Renal cell carcinoma: immunohistological investigation of expression of the integrin alpha v beta 3. *Anticancer Res*. 1999; 19: 1529-1532

Wick W, Petersen I, Schmutzler RK et al Evidence for a novel tumour suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to a metastatic stage in breast cancer. *Oncogene*. 1996; 12: 973-978

Winchester DJ, Chang HR, Graves TA, Menck HR, Bland KI, Winchester DP. A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes. *J Am Coll Surg*. 1998; 186: 416-422

Yagi Y, Gilbertson JR. Digital imaging in pathology: The case for standardization. *J Telemed Telecare*. 2005; 11: 109-116

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA: Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumour metastasis. *Cell*. 2004; 117: 927-939

Yoshikazu Takada, Xiaojing Ye and Scott Simon. Protein family review: The integrins. *Genome Biology*. 2007; 8: 215

Zhang CY, Hu P, Fu D, Wu W, Jia CY, Zhu XC, Wu XZ. 3'-Sulfo-Le(x) is important for regulation of integrin subunit alphaV. *Biochemistry*. 2010; 49: 7811-7820

Zhang P, Ozdemir T, Chung CY, Robertson GP, Dong C. Sequential binding of avb3 and ICAM-1 determines fibrin-mediated melanoma capture and stable adhesion to CD11b/CD18 on neutrophils. *J Immunol*. 2011; 186: 242-254

Zheng Y, Ritzenthaler JD, Roman J, Han S: Nicotine stimulates human lung cancer cell growth by inducing fibronectin expression. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2007; 37: 681-690

Zhou Q, Nakada MT, Arnold C et al Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits angiogenesis. *Angiogenesis*. 1999; 3: 259-269

Zimm S., Wampler GL, Stablein D et al Intracerebral metastases in solid-tumour patients. Natural history and results of treatment. *Cancer* 1981; 48: 384-394

## Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich vielen Menschen einen herzlichen Dank:

Mein Dank gilt dabei...

... Herrn Prof. Dr. med. R. Meyermann für die Überlassung des Themas, die guten Arbeitsbedingungen und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Institut für Hirnforschung,

... meinem Betreuer PD Dr. med. Jens Schittenhelm für die exzellente Betreuung, seine Geduld, seine wertvollen Ratschläge und seine freundliche und hilfsbereite Unterstützung!,

... allen Mitarbeitern des Instituts für Hirnforschung, darunter besonders Katrin Trautmann, Ines Kienzler, Thai Dung Nguyen, Natalia Karpekin und Gudrun Albrecht,

... Jan Sperveslage aus dem Institut für allgemeine Pathologie für die ausgezeichnete Einführung in die Software „Definiens tissue studio 2.0“,

... meinem Ehemann für seine große Hilfsbereitschaft und seine wertvollen Ratschläge,

... meinen Eltern, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wäre.