

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Abteilung Medizinische Zellbiologie  
Direktor: Prof. Dr. Ralf Kinscherf  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Immunhistochemische und molekularbiologische Analysen  
metastasierter Lymphknoten beim Prostata-Karzinom**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Maren Brenning aus Bonn

Marburg, 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
02.11.2022

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. R. Kinscherf

1. Korreferent: Prof. Dr. A. Hegele



Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Prostatakarzinom	1
1.1.1 Beurteilung des PCa	4
1.1.2 Therapie des PCa	5
1.1.3 Metastasierung von Krebszellen	7
1.1.4 Sentinel-Lymphknoten	9
1.2 Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ Superfamilie	10
1.2.1 Wachstums-Differenzierungs-Faktor-15 (GDF-15)	11
1.2.2 Genetik und Struktur von GDF-15	11
1.2.3 Expression und Funktion von GDF-15	13
1.2.4 GDF-15 in Tumoren	15
1.2.5 GDF-15 beim PCa und seine Rolle bei Metastasierung	20
1.3 Tumormunologie	22
1.3.1 PD-1	23
1.3.2 PD-L1	24
1.3.2.1 PD-L1 auf Tumoren	24
1.4. Makrophagen (M $\Phi$ )	26
1.5. B-Lymphozyten	28
1.6 Innervation beim PCa und die Rolle bei Metastasierung	30
1.7 Zielsetzung der Arbeit	32
2. Materialien	33
2.1 Humane Gewebeproben	33
2.1.1 Lymphknoten-Präparate	33
2.2 Chemikalien	33
2.3 Puffer und Lösungen	35
2.4 Kits	36
2.5 Antikörper	37
2.5.1 Primärantikörper	37

2.5.2 Sekundärantikörper	37
2.6 Primer	37
2.6.1 Reverse Transkription (cDNA-Synthese Primer)	37
2.6.2 Quantitative RT-PCR Primer	38
2.7 Verbrauchsmaterialien	38
2.8 Geräte	39
2.9 Software	40
3. Methoden	41
3.1 Anfertigung der Schnittpräparate	41
3.1.1 Anfertigung der Schnittpräparate mittels Rotationsmikrotom	41
3.1.2 Anfertigung der Schnittpräparate mittels Schlittenmikrotom	41
3.2 (Immun)Histochemische Färbungen	41
3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	41
3.2.2 Prinzip der immunhistochemischen Färbung	43
3.2.3 Einzelfärbungen	48
3.2.3.1 CD68 Färbung	49
3.2.3.2 GDF-15 Färbung	50
3.2.3.3 CD19 Färbung	51
3.2.3.4 PGP 9.5 Färbung	52
3.2.3.5 PD-L1 Färbung	54
3.3 Auswertung der histologischen Untersuchungen und Datenerhebung	56
3.3.1 Aufnahme der Gewebeschnitte	56
3.3.2 Messung der CD19 <sup>+</sup> -Fläche	57
3.3.3 Messung der CD68 <sup>+</sup> -Fläche	59
3.3.4 Messung der positiven PD-L1 Fläche	60
3.3.5 Statistische Erhebung: IHC	62
3.4 Molekularbiologische Expressionsanalyse	62
3.4.1 Prinzip der molekularbiologischen Expressionsanalyse	62
3.4.2 RNA-Isolation	65
3.4.3 cDNA-Synthese	66
3.4.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion	66

3.5 Auswertung der Molekularbiologische Expressionsanalyse	68
3.5.1 Statistische Erhebung: Molekularbiologische Expressionsanalyse	70
4. Ergebnisse	71
4.1 H.E.-Färbungen	71
4.2 GDF-15 IHC	71
4.2.1 Gegenüberstellung der Positiv- und Negativkontrolle unter Verwendung von Prostata-Gewebe	71
4.2.2 Gegenüberstellung der GDF-15 gefärbten Lymphknoten und Negativkontrolle	72
4.3 PD-L1-IHC	73
4.3.1 Gegenüberstellung der Positiv- und Negativkontrolle unter Verwendung von Plazenta-, Prostata- und Lymphknoten-Gewebe	73
4.3.2 Lokalisation PD-L1 immunreaktiver Zellen im Lymphknoten	75
4.3.3 Flächenanteil von PD-L1	76
4.4 CD68 IHC	79
4.4.1 Lokalisation und Morphologie der CD68 <sup>+</sup> -MΦ	79
4.4.2 Flächenanteil der CD68 <sup>+</sup> -Makrophagen	79
4.5 B-Lymphozyten (CD19) IHC	82
4.5.1 Lokalisation und Morphologie der B-Lymphozyten (CD19)	82
4.5.2 Flächenanteil der B-Lymphozyten	82
4.6 IHC-Färbung: PGP 9.5	85
4.6.1 Gegenüberstellung von Positiv- und Negativkontrolle	85
4.6.2 PGP 9.5 im Lymphknoten	86
4.7 Expressionsanalysen: RT-qPCR	86
4.7.1 GDF-15 Expression	86
4.7.2 PD-L1 Expression	88
4.7.3 Expression von PGP9.5	90
5. Diskussion	92
5.1 Diskussion des Materials und der Methodik	92
5.2 HE-Färbungen	93
5.3 GDF-15	93
5.4 PD-L1	95

5.5 CD68+ (M1-)Makrophagen	96
5.6. B-Lymphozyten	97
5.7 Innervation - PGP9.5	98
5.8. Ausblick	98
5.9. Zusammenfassung	100
5.10. Summary	102
6. Literaturverzeichnis	104
7. Anhang	141
7.1 Ergänzende Abbildungen, Tabellen und Diagramme	141
7.1.1 TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms	141
7.1.2 Risikoklassen des Prostatakarzinoms	142
7.1.3 Partin-Tabellen	142
7.1.4 Briganti-Nomogram	145
7.1.5 Lymphknoten-Präparate	145
7.1.6 Positiv- und Negativkontrollen	146
7.1.7 Bestimmung der RNA-Konzentration, -Qualität und -Quantität	146
7.1.8 Gelelektrophorese-Agarosegele der GAPDH RT-qPCR Produkte	147
7.1.9 Gelelektrophorese-Agarosegele der GDF-15 RT-qPCR Produkte	148
7.1.10 Gelelektrophorese-Agarosegele der PD-L1 RT-qPCR Produkte	149
7.1.11 Gelelektrophorese-Agarosegele der PGP 9.5 RT-qPCR Produkte	150
7.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen	151
7.3 Danksagung	152

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lymphdrainage der Prostata	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Gleason-Muster mit tabellarisch aufgelisteten Beurteilungskriterien	5
Abbildung 3: Überblick über die Metastasierungskaskade	8
Abbildung 4: Model der Metastasierungskaskade nach Pantel und Brakenhoff	9
Abbildung 5: schematische Darstellung des Genaufbaus (a) und der Proteinstruktur (b) von GDF-15	12
Abbildung 6: schematische Darstellung der GDF-15 Signalwege auf zellulärer Ebene und die Auswirkungen auf die Krebszelle	17
Abbildung 7: Zusammenfassung der in vitro-, in vivo- und Serum Studien zu der Rolle von GDF-15 in Metastasen	20
Abbildung 8: T-Zell Aktivierung im Tumormikromilieu	23
Abbildung 9: Schematische Darstellung der M1- und M2-M $\Phi$ Aktivierung	27
Abbildung 10: Schema eines IgG-Moleküls	43
Abbildung 11: Direkte und indirekte Immunhistochemie (IHC)	45
Abbildung 12: Schema der ABC-Technik	46
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Signalverstärkung mit biotinyliertem Tyramin	48
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Visualisierung durch DAB	48
Abbildung 15: Beispiel für die Bestimmung der CD19 <sup>+</sup> -positiven Fläche	58
Abbildung 16: Beispiel für die Bestimmung der Nicht-lymphatischen Fläche	59
Abbildung 17: Beispiel für die Bestimmung der CD68 <sup>+</sup> -positiven Fläche	60
Abbildung 18: Beispiel für die Bestimmung der PD-L1-positiven Fläche	61
Abbildung 19: Beispiel für die Bestimmung der Nicht-lymphatischen Fläche der PD-L1 Färbung	62
Abbildung 20: Schema der DNA- und RNA-Analyse von Gewebeproben	63
Abbildung 21: beispielhafter Verlauf einer Fluoreszenzkurve von Standards	64
Abbildung 22: beispielhafte Darstellung einer Schmelzkurve	65
Abbildung 23: Exemplarische Darstellung der Auswertung der RT-qPCR	69
Abbildung 24: Aufnahmen des 2,5%igen Agarosegels der GAPDH PCR Produkte (Amplikon) zur beispielhaften Überprüfung	70

Abbildung 25: Exemplarische Darstellung von Gewebeschnitten der Lymphknoten (HE-Färbung)	71
Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der GDF-15 IHC einer PCa Biopsie	72
Abbildung 27: Exemplarische Darstellung der GDF-15 IHC im Aufnahmen des Lymphknoten	73
Abbildung 28: Exemplarische Darstellung der GDF-15 IHC in Lymphknoten.	73
Abbildung 29: Exemplarische Darstellung der IHC in der Plazenta (Präparat 1331)	74
Abbildung 30: Exemplarische Darstellung der PD-L1 IHC in der Prostata	75
Abbildung 31: Exemplarische Darstellung der PD-L1 IHC im Lymphknoten	75
Abbildung 32: Exemplarische Darstellung der PD-L1 IHC in Lymphknoten	76
Abbildung 33: PD-L1 Flächenanteil (in %) in Lymphknoten unterschiedlicher GS	77
Abbildung 34: PD-L1 Flächenanteil (in %) in Lymphknoten, gruppiert nach zugehörigen GS	78
Abbildung 35: Exemplarische Darstellung der CD68 IHC in Lymphknoten	79
Abbildung 36: CD68 <sup>+</sup> -Flächenanteil (in %) in Lymphknoten unterschiedlicher GS	80
Abbildung 37: CD68 <sup>+</sup> -Flächenanteil (in %) in Lymphknoten, gruppiert nach zugehörigen GS	81
Abbildung 38: Exemplarische Darstellung der CD19 IHC in Lymphknoten	82
Abbildung 39: CD19-Flächenanteil (in %) in Lymphknoten unterschiedlicher GS	83
Abbildung 40: CD19 <sup>+</sup> -Flächenanteil (in %) in Lymphknoten, gruppiert nach zugehörigen GS	84
Abbildung 41: Exemplarische Darstellung der PGP 9.5 IHC in der Prostata	85
Abbildung 42: Exemplarische Darstellung der PGP 9.5 IHC in Lymphknoten	86
Abbildung 43: relative GDF-15 Expression	87
Abbildung 44: GDF-15 Expression	88
Abbildung 45: PD-L1 Expression	89
Abbildung 46: PD-L1 Expression	90
Abbildung 47: PGP 9.5 Expression	91
Abbildung 48: PGP 9.5 Expression	91
Abbildung 49: Briganti-Nomogramm	145
Abbildung 50: Aufnahmen des 2,5%igen Agarosegels der GAPDH PCR Produkte	147
Abbildung 51: Aufnahmen der 2,5%igen Agarosegele der GDF-15 PCR Produkte	148
Abbildung 52: Aufnahme des 2,5%igen Agarosegels der PD-L1 PCR Produkte	149
Abbildung 53: Aufnahmen der 2,5%igen Agarosegele der PGP 9.5 PCR Produkte	150

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die TGF- $\beta$ -Untergruppen	11
Tabelle 2: Chemikalien	33
Tabelle 3: Puffer und Lösungen	35
Tabelle 4: Kits	36
Tabelle 5: Primärantikörper	37
Tabelle 6: Sekundärantikörper	37
Tabelle 7: cDNA-Synthese Primer	37
Tabelle 8: Quantitative RT-PCR Primer	38
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien	38
Tabelle 10: Geräte	39
Tabelle 11: Software	40
Tabelle 12: Übersicht Färbemethoden und Signalverstärkungen	47
Tabelle 13: Durchführung und Inkubationszeiten zur Entparaffinierung:	49
Tabelle 14: Durchführung und Inkubationszeiten der CD68 Färbung	49
Tabelle 15: Durchführung und Inkubationszeiten der GDF-15 Färbung	50
Tabelle 16: Durchführung und Inkubationszeiten der CD19 Färbung	51
Tabelle 17: Durchführung und Inkubationszeiten der PGP 9.5 Färbung	52
Tabelle 18: Durchführung und Inkubationszeiten der PD-L1 Färbung	54
Tabelle 19: Tabellarische Darstellung und Übersicht über das RT-qPCR-Programm mit Temperaturen, Dauer und Anzahl der Zyklen	67
Tabelle 20: TNM-Klassifikation des PCa	141
Tabelle 21: Partin-Tabelle für PSA-Werte zwischen 0 und 2,5 $\mu\text{g/ml}$	142
Tabelle 22: Partin-Tabelle für PSA-Werte zwischen 2,6 und 4,0 $\mu\text{g/ml}$	143
Tabelle 23: Partin-Tabelle für PSA-Werte zwischen 4,1 und 6,0 $\mu\text{g/ml}$	144
Tabelle 24: Lymphknoten-Präparate mit zugehöriger Präparats-Nummer und zugehörigen Prostata-Präparat	145
Tabelle 25: Gewebe und Präparatnummern der Positiv- und Negativkontrollen, welche zur Etablierung der Antikörper verwendet wurden	146
Tabelle 26: Übersicht über die RNA-Eluate, RNA-Konzentration, und Extinktionswerte der jeweiligen Probe	146



## Abkürzungsverzeichnis

ADRB2	adrenerge Rezeptor $\beta$ 2	FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
ADRB3	adrenerge Rezeptor $\beta$ 3		
AK	Antikörper		Wachstums-
Analyse- H <sub>2</sub> O	Analyse-Wasser	GDF-15	Differenzierungs- Faktor-15
AP	Alkalische Phosphatase	GDFs	Growth Differentiation Factors
BCR	B-Zell-Rezeptor		
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins	GDNF	glial cell-derived neurotrophic factor
BPH	benigne Prostatahyperplasie	GDNFs	glial cell line-derived neurotropic factors
bspw	beispielsweise		glial cell- derived
ca	circa	GFRAL	neurotrophic factor family receptor $\alpha$ -like
cDNA	komplementäre DNA	Gy	Gray
CRC	Kolorektales Karzinom	HCl	Chlorwasserstoff
CT	Computer Tomographie	HE-	Hämalaun-Eosin-
CTC	zirkulierende Tumorzellen	Färbung	Färbung
DMSO	Dimethylsulfoxid	HKG	Housekeeping Gene
DNA	Desoxyribonucleinsäure	HRP	horseradish peroxidase
dNTPs	Desoxyribonukleosidtrip hosphate	IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	IGFR1	insulin-like growth factor receptor 1
DRU	digital rektale Untersuchung	IHC	Immunhistochemie
DTC	disseminierte Tumorzellen	iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid- Synthase
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition	KCl	Kaliumchlorid
ERK	extracellular-signal regulated kinases	LPS	Lipopolysaccharid
et al	(lat.) et alii	LTBP	latent TGF- $\beta$ binding protein
etc.	et cetera	MAP3K1	Mitogen aktivierte Proteinkinase 11
EZM	extrazelluläre Matrix	MAPK	mitogen-activated protein Kinase

mCRPC	metastasierendes kastrationsresistentes Prostatakarzinom	RT-qPCR	quantitative Reverse Transkriptase Echtzeit- Polymerase Kettenreaktion
MHC	major histocompatibility complex	sek	Sekunden
MIC-1	macrophage inhibitory cytokine- 1	SLNE	Sentinel- Lymphonodektomie
Min	Minuten	SN-LK	Sentinel-Lymphknoten
miRNA	microRNA	TAMs	tumor-associated macrophages
MIS	Müllerian inhibiting substance	TBE	Tris-Borsäure-EDTA
MΦ	Makrophagen	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
NaCl	Natriumchlorid	TGF-β	Transformation Growth Factor beta
NaOH	Natriumhydroxid	TLR	toll-like Rezeptoren
OT	Objektträger	TNF-α	Tumornekrosefaktor α
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	Tris	Tris(hydroxymethyl-)amin omethan
PCa	Prostatakarzinom	VEGF	vascular endothelial growth factor
PCR	Polymerase Kettenreaktion	YAP	Yes-associated protein
PD-1	programmed cell death-1	μ	mikro
PD-L1	programmed death- ligand 1		
PET	Positron Emission Tomographie		
PIN	prostatistische intraepitheliale Neoplasie		
PSA	Prostata spezifisches Antigen		
PSMA	Prostata-spezifisches- Membran Antigen		
r.E.	relative Expression		
RNA	Ribonucleinsäure		
RPE	radikale Prostatektomie		
RT	Raumtemperatur		



# 1. Einleitung

## 1.1. Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom (PCa) zählt zu der zweithäufigsten Tumor-Entität der Welt bei Männern und zu der vierthäufigsten weltweiten Tumor-Entität beider Geschlechter (Ferlay et al., 2015). In Deutschland war das PCa 2016 mit 22,7% die häufigste Tumorerkrankung des Mannes (ausgenommen nicht-melanomischer Hautkrebs) und war in 11,6% der durch Krebs verursachten Todesfälle für diesen verantwortlich. Damit steht er auf Platz zwei der tödlich verlaufenden Tumorerkrankungen von Männern (Robert Koch-Institut, 2019). Tendenziell besteht in Deutschland und in den meisten westlichen Industriestaaten eine deutlich steigende Inzidenz, wohingegen die Sterberate leicht sinkt. Neben verbesserten Therapiemöglichkeiten werden vor allem flächendeckend eingesetzte Maßnahmen der Früherkennung, insbesondere der Prostata-spezifisches Antigen (PSA)-Test, hierfür als Erklärung herangezogen (Hermann et al., 2019).

Das mittlere Erkrankungsalter lag 2016 bei 72 Jahren, was verdeutlicht, dass die Erkrankung hauptsächlich bei älteren Männern auftritt. So liegt das Risiko einer in den nächsten 10 Jahren auftretenden Erkrankung für einen 35-jährigen Mann bei unter 0,1%, für einen 75-Jährigen hingegen bei ca. 5% (Robert Koch-Institut, 2019). Aufgrund der zunehmend alternden Bevölkerung wird angenommen, dass der Anteil der über 60-Jährigen bis 2050 auf 37% der Gesamtbevölkerung ansteigen wird, sodass sowohl Prävalenz und Inzidenz des PCa ansteigen werden (Federmann, 2019).

Die Ätiologie der Erkrankung ist bislang unbekannt. Der Hauptrisikofaktor stellt das fortgeschrittene Alter dar. Des Weiteren spielt eine positive Familienanamnese sowohl in erster Generation als auch in zweiter Generation eine Rolle und trägt zu einer zwei- bis dreifach erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit bei (Hautmann und Gschwend, 2014; Zeegers et al., 2003; Johns und Houlston, 2003). Außerdem werden exogene Faktoren wie u.a. Umweltfaktoren, insbesondere die Luftverschmutzung oder Ernährungsgewohnheiten diskutiert (Hautmann und Gschwend, 2014). Es resultiert ein Ost-West Gefälle der Inzidenz des PCa zugunsten des asiatischen Raums, wohingegen innerhalb Europas eine geringere Inzidenz in südeuropäischen Ländern vorliegt (Federmann, 2019). Dem zu Grunde liegend ist, dass in Soja enthaltene Phytoöstrogene, sowie Lycopenen, welche in Tomaten enthalten sind, eine protektive Wirkung auf das PCa nachgesagt werden (Ozasa et al., 2004; Wertz et al., 2004).

Eine weitere Komponente für die Entstehung des PCa spielen die Geschlechtshormone, insb. die Androgene. Es ist bekannt, dass Eunuchen nicht am PCa erkranken können. Außerdem konnte im Tierversuch durch eine chronische Östrogen- und Androgengabe eine PCa-Erkrankung induziert werden (Hautmann und

Gschwend, 2014). Ob diese Erkenntnisse übertragbar auf den Menschen sind, konnte bislang noch nicht bestätigt werden (Hautmann und Gschwend, 2014).

90% der PCa entstehen in der zum Rektum gelegenen, peripheren Zone der Prostata. Seltener erfolgt die Entstehung in der zentralen Zone, welche sich angrenzend an die Ductus ejaculatorii befindet. Aus der sich um die proximale Harnröhre windende, sog. Übergangszone der Prostata, entstehen benigne Prostatahyperplasien, welche sich in 10% der Fälle zu einem PCa weiterentwickeln können (Hautmann und Gschwend, 2014). Histopathologisch tritt das PCa in 98% der Fälle als Adenokarzinom, ausgehend vom Drüsenepithel, in Erscheinung. Hierbei imponiert es meist durch ein multifokales Auftreten, welches das Vorkommen mehrerer Differenzierungsgrade in einem PCa wahrscheinlicher macht (Hautmann und Gschwend, 2014). Die Tumorausbreitung erfolgt im anfänglichen Stadium lokal, bevorzugt in Richtung Apex der Prostata. Nach Fortschreiten zeigt das PCa ein perineurales Wachstum auf und benutzt die Perineuralspalten der Nervendurchtrittsstellen zum Organkapseldurchbruch (Hautmann und Gschwend, 2014). Daraufhin kann eine Infiltration der Samenblase durch deren muskuläre Wand erfolgen, welches ein Zeichen für ein bereits lokal fortgeschrittenes Wachstum ist (Hautmann und Gschwend, 2014; Schmelz et al., 2014).

Es liegt eine deutliche Korrelation zwischen Volumen des Primärtumors und Aggressivität des PCa vor. Bei Tumorumfängen von unter  $0,5 \text{ cm}^3$ , kommt es nur äußerst selten zu einer extraprostatatischen Ausbreitung oder zu Lymphknotenmetastasen (Schmelz et al., 2014). Ab einer Größe von über  $4 \text{ cm}^3$  liegt meist ein lokal fortgeschrittenes Wachstum mit Lymphknotenbefall vor, bei Tumoren mit einem Volumen über  $12 \text{ cm}^3$ , ist dies fast immer vorhanden (Hautmann und Gschwend, 2014; Schmelz et al., 2014).

Bei Metastasierung des PCa sind die obturatorischen und die internen iliaken Lymphknotenstationen primär betroffen. Die weitere lymphogene Streuung erfolgt, wie in Abbildung 1 dargestellt, entlang der Gefäßversorgung der Prostata in der Fossa obturatoria (s. Abbildung 1) (Hautmann und Gschwend, 2014; Thüroff, 2016).

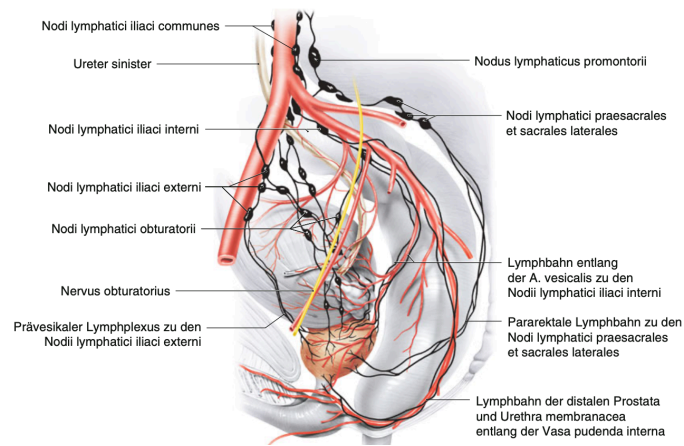


Abbildung 1: Lymphdrainage der Prostata

Der lymphatische Abfluss der Prostata erfolgt entlang der Gefäßversorgung. Die erste Station der Lymphe ist die Gruppe der obturatorischen Lymphknoten und die internen iliaken Lymphknoten. Über die Lymphknoten der Vasa iliaca communis und den präsakralen Lymphknoten erfolgt der lymphatische Abfluss nach parakaval, interaortokaval und paraaortal. Von dort gelangt sie über die Lymphbahnen am Apex prostata zu den Lymphknoten der Iliaca-externa Gruppe (Thüroff, 2016, verändert).

Nach dem Befall der paraaortalen Lymphknoten erfolgt die Fernmetastasierung in die mediastinalen und supraklavikulären Lymphknoten (Hautmann und Gschwend, 2014). Die hämatogene Metastasierung erfolgt bei 85% der letal verlaufenden PCa in das Skelettsystem. Hierbei sind besonders die Lendenwirbelkörper, der proximale Femur, das Becken, die thorakalen Wirbelkörper, die Rippen, das Sternum, der Schädel und der Humerus Ziel der osteoblastischen Metastasen (Hautmann und Gschwend, 2014). Das PCa kann, bedingt durch sein langsames Wachstum, lange Zeit ohne klinische Symptomatik bestehen.

So stellen 90% der PCa, die bei der Autopsie gefunden werden, ein latentes PCa dar, welches mit einem Volumen unter  $0,5 \text{ cm}^3$  für den Patienten symptomlos bleibt und zu Lebzeiten nicht diagnostiziert wurde (Hautmann und Gschwend, 2014; Schmelz et al., 2014). Bei fortgeschrittenem Wachstum des PCa treten primär Obstruktionssymptome der angrenzenden Urethra wie eine obstruktive Miktionslage oder eine Harnstauungsniere in den Vordergrund. Kommt es zu Knochenmetastasen, kann das unspezifische Symptom der Rückenschmerzen auftreten, welches häufig bei Patienten mit fortgeschrittenem Alter als degenerativ missinterpretiert wird (Hautmann und Gschwend, 2014).

Fehlende klinische Symptomatik unterstreicht die Bedeutung der Früherkennungsmaßnahmen. Hierzu zählen die neben der digital rektalen Untersuchung (DRU) auch das Abtasten der Lymphknoten der Leistenregion, welche ab dem 45. Lebensjahr standardmäßig, bei Risikogruppen ab dem 40. Lebensjahr, in Vorsorgeuntersuchungen durchgeführt werden (Hautmann und Gschwend, 2014).

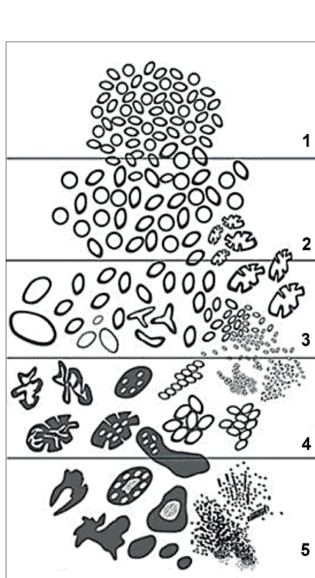
Weitere, zur Früherkennung eingesetzte Maßnahmen, sind u.a. der PSA-Test, bei dem die Konzentration des prostataspezifischen Antigens (PSA) ermittelt wird. Da der alleinige Einsatz der Maßnahmen jedoch ein unspezifisches Ergebnis liefert, wird eine Kombination aus DRU und PSA-Test empfohlen (Federmann, 2019; Candas et al., 2000).

### **1.1.1 Beurteilung des PCa**

Zur histopathologischen Beurteilung des PCa werden die im Jahre 1966 vom Pathologen D.F. Gleason etablierten und seitdem stetig modifizierten Gleason-Scores (GS) herangezogen (Gleason, 1966). Das weltweit etablierte Grading bezieht sich auf die morphologischen Veränderungen des Adenokarzinoms, verglichen mit dem Ausgangszustand des Drüsengewebes und wird von einem Pathologen beurteilt.

Hierbei sind für die Beurteilung ausschließlich die Morphologie und Anordnung der Prostatadrüsen entscheidend. Etwaige zytologische Atypien der Tumorzellen werden nicht beurteilt (Schlomm und Sauter, 2016). Anhand der Differenzierungsgrade werden fünf Muster (Grad I: gut differenziert, Grad V: wenig differenziert) unterschieden (Schmelz et al., 2014; Humphrey, 2017). Zusammengesetzt wird der GS durch Addition des primären und des sekundären Musters, wobei ersteres das im Tumor am häufigste vorkommende Muster darstellt (Schlomm und Sauter, 2016). Die Definition des sekundären Musters unterscheidet sich je nach vorliegender Probenart. Handelt es sich um eine Stanzbiopsie, wird das schlimmste Gleason Muster herangezogen, solange dieses nicht schlimmer ist als das primäre Muster. Bei einer Prostatektomie oder einem transurethralen Resektat definiert das zweithäufigste Muster das sekundäre Muster (Schlomm und Sauter, 2016).

Die neuste Modifizierung des GSs wurde 2014 von der internationalen Gesellschaft der pathologischen Urologie (International Society of Urological Pathology (ISUP)) vorgenommen (Epstein et al., 2016). Demnach sollen die Umbenennungen in Grad-Gruppen („Grade Groups“) für eine besserer Verständlichkeit der Patienten sorgen. Folgende Umbenennungen werden postuliert: Gleason 3+3=6 zu Prognostic Grade Group I, Gleason 3+4=7 zu Prognostic Grade Group II, Gleason 4+3=7 zu Prognostic Grade Group III, Gleason 8 zu Prognostic Grade Group IV und Gleason 9–10 zu Prognostic Grade Group V (Schlomm und Sauter, 2016; Epstein et al., 2016). Außerdem sollen die Gleason-Muster 1 und 2 wegen mangelnden klinischen Vorkommens nicht mehr verteilt werden (Schlomm und Sauter, 2016).



Gleason Grad	Drüsenform	Drüsengröße	Stromainvasion
1	Einzel, rund	Mittel und dicht gepackt	Keine
2	Gerundet, variabler als 1	Variabel, mittel oder groß	Gering
3	Einzel, unregelmäßig	Variabel, mittel oder groß	Mild bis mäßig
4	Verschmolzene, glanduläre Herde	Klein, verschmolzen	Ausgeprägt
5	Winzige Drüsen oder kleine Lumina in soliden Epithelkonglomeraten	Anaplastisch, rundliche Stränge oder Herde	Sehr ausgeprägt

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Gleason-Muster mit tabellarisch aufgelisteten Beurteilungskriterien

Zur Beurteilung der Gleason Muster werden die architektonischen Kriterien der Drüsenform, der Drüsengröße und die Stromainvasion herangezogen und anhand dessen in fünf Muster unterteilt (Epstein et al., 2016; Schmelz et al., 2014, verändert).

### 1.1.2 Therapie des PCa

Die Therapie des PCa ist je nach klinischer Symptomatik und Fortschritt des Tumorwachstums stark variabel. Neben lokal kurativen Verfahren stehen dem Behandler systemische Therapien oder ein abwartendes Management zur Verfügung (Schmelz et al., 2014). Entscheidend ist, ob man, je nach Ausmaß der Erkrankung, eine kurative oder palliative Therapie anstrebt. Eine Einstufung der Erkrankung bietet hierfür neben den GS, die TNM-Klassifikation (s. Anhang 7.1.1) und die Risikobewertung nach D'Amico (s. Anhang 7.1.2) (Brierley et al., 2017; D'Amico et al., 2006). Weitere Faktoren, die bei der Wahl der Therapieform berücksichtigt werden sollten, sind außerdem die Patientenpräferenz, die Lebenserwartung des Patienten durch Alter oder Komorbiditäten und das Progressionsrisiko der Erkrankung (Federmann, 2019).

Zur Behandlung lymphknotenpositiver PCa, gibt es keine eindeutige Datenlage.

Eine sichere Aussage zum Status der Lymphknoten ist allein nach histologischer Untersuchung operativ entfernter Lymphknoten möglich. Zur prä- und intraoperativen Einschätzung werden Nomogramme wie bspw. die Partin-Tabelle oder das Briganti-Nomogramm herangezogen (s. Anhang 7.1.4). Diese beruhen auf dem PSA-Wert, dem DRU-Status, dem GS in der Biopsie sowie bildgebenden Verfahren (Schmelz et al., 2014).

Im Stadium des lokal fortgeschrittenen PCa ist das Risiko für Lymphknotenmetastasen höher als beim lokal begrenzten PCa. Dennoch besteht



weiterhin keine ausreichende Evidenz sowohl die Lymphadenektomie oder eine Bestrahlung der pelvinen Lymphabflusswege beim lokal begrenzten PCa mit hohem Risikoprofil oder beim lokal fortgeschrittenen PCa durchzuführen (Partin et al., 1997; Federmann, 2019).

Da jedoch ein positiver Lymphknotenstatus eine deutlich schlechtere Prognose für den Patienten darstellt, sollte im Rahmen einer kurativen Behandlung immer zwischen Risiko und Nutzen einer Lymphadenektomie abgewogen werden (Federmann, 2019). So zeigen diverse Studien einerseits, dass mit steigender Anzahl von entnommenen Lymphknoten auch die Wahrscheinlichkeit von positiven Lymphknotenbefunden steigt, (Briganti et al., 2006; Joslyn und Konety, 2006; Touijer Karim et al., 2007) jedoch wird auch postuliert, dass die positiven Befunde nicht nur an den „Standard-Lokalisationen“ auffindbar waren (Weckermann et al., 2007). Darüber hinaus gilt zu beachten, dass die Lymphadenektomie mit höheren postoperativen Nebenwirkungen (Lymphozelen, Thrombosen, Lymphödeme) einhergeht und für den Patienten ein größerer Nutzen erzielt werden sollte (Federmann, 2019). Es hat sich gezeigt, dass dieser bei einer Mindestanzahl von 10 entnommenen Lymphknoten erreicht werden kann (Briganti et al., 2006; Joslyn und Konety, 2006; Federmann, 2019).

Bei positiven Lymphknotenbefall, welcher nach Sentinel-Lymphonodektomie (SLNE) bestätigt wurde, besteht die Empfehlung sofort oder verzögert mit einer hormonablativen Therapie zu beginnen (Federmann, 2019). Die Metastasierung in Lymphknoten stellt jedoch, unabhängig vom Ausmaß des Karzinoms (Ca), immer eine systemische Erkrankung mit hohem Progressionsrisiko dar und bedarf einer systemischen Therapie (Schmelz et al., 2014). Sind mehr als zwei Lymphknoten befallen, ist das tumorspezifische Überleben signifikant schlechter als bei Patienten mit weniger befallenen Lymphknoten (Briganti et al., 2009). Generell besteht eine negative Korrelation zwischen Anzahl befallener Lymphknoten und Prognose im Hinblick auf krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben (Federmann, 2019).

Kontrovers diskutiert bleibt die Wahl der Therapieform. In Schweden wird beim Nachweis von Lymphknotenmetastasen, basierend auf den Ergebnissen der Studie von Aus et al. auf eine lokale Therapie verzichtet, jedoch primär endokrin behandelt (Aus et al., 2003). Die Literaturübersicht von Swanson et. al hingegen empfiehlt eine Kombinationstherapie aus lokaler und hormoneller Therapie (Swanson et al., 2006). Beim Vorliegen von ossären Metastasen wird darüber hinaus eine osteoprotektive Therapie mit Bisphosphonaten (Zoledronsäure oder Denosumab) empfohlen (Hautmann und Gschwend, 2014). Neben bereits aufgezählten Therapiemaßnahmen, besteht als palliativer Ansatz, bei bereits stark kompromittierten Patienten, die Möglichkeit der Analgetikatherapie (Hautmann und Gschwend, 2014).

### **1.1.3 Metastasierung von Krebszellen**

Die Metastasierung von Krebszellen stellt u.a. wegen nicht erfolgreicher Therapieformen, den Hauptgrund eines letalen Verlaufs in über 90 % der Krebserkrankung für den Patienten dar (Steeg, 2006). Obwohl sie im Zentrum zahlreicher Forschungsarbeiten steht, bleibt ihr genauer molekularer Mechanismus bis heute nicht genau verstanden (Fares et al., 2020). Seit einigen Jahren ist allerdings bekannt, dass es anders als früher angenommen, nicht erst in fortgeschrittenen Tumorstadien mit großem Primärtumor, sondern bereits in frühen Tumorstadien zur Metastasierung kommen kann (Hüseemann et al., 2008; Pantel et al., 2008). Prinzipiell kann die Metastasierung direkt über das Blutgefäßsystem (hämatogen) oder über einen dem Primärtumor naheliegenden Lymphknoten (lymphogen), welcher auch als Wächterlymphknoten oder Sentinel-Lymphknoten (SN-LK, Wächterlymphknoten) bezeichnet wird, erfolgen (Lee et al., 2019).

Zur Ausbildung einer hämatogenen Metastase bedarf es, dass Krebszellen ihren Ursprungsort verlassen, daraufhin im Blutstrom zirkulieren, wobei sie den Druckverhältnissen im Blutgefäß und neuen zellulären Umständen standhalten müssen und anschließend an ihrem Zielorgan zu invadieren. Hier angekommen müssen sie der Überwachung des körpereigenen Immunsystems entfliehen und zu einem sekundären Tumor proliferieren (Massagué und Obenauf, 2016).

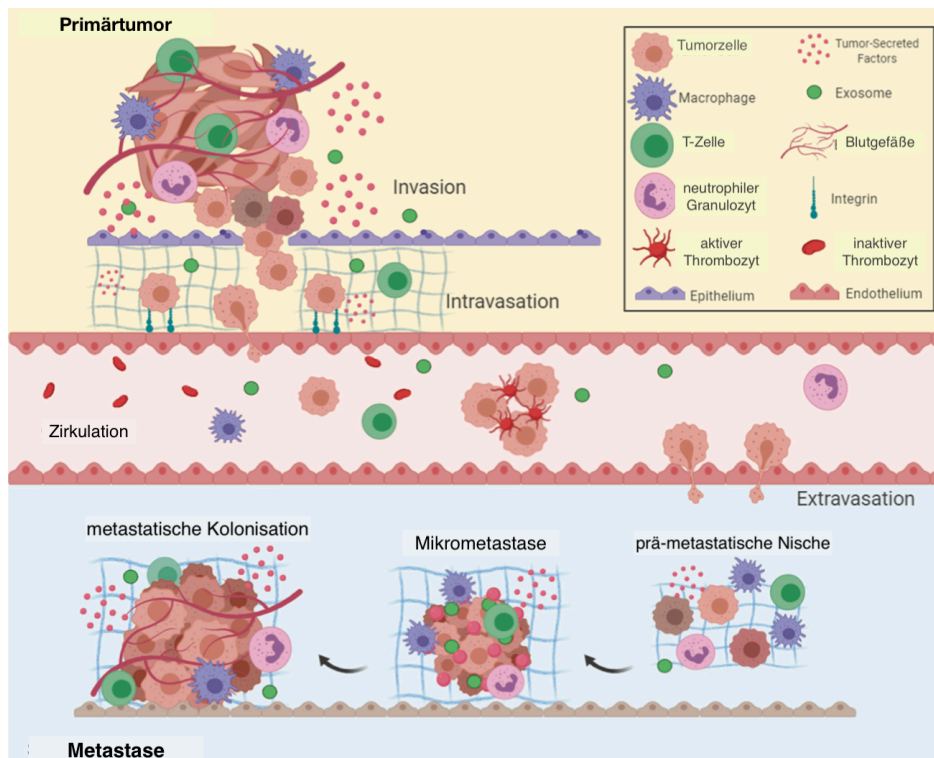


Abbildung 3: Überblick über die Metastasierungskaskade

Die Metastasierungskaskade kann in 5 Schritten beschrieben werden: Invasion, Intravasation, Zirkulation, Extravasation und Kolonisation. Bei der Invasion treten Krebszellen in das lokale Gewebe über, während es bei der Intravasation zur Einwanderung in Blutgefäße kommt. Nach dem Überleben der Krebszellen im Gefäßsystem (Zirkulation), erfolgt der Übertritt der malignen Zellen in den Zielort (Extravasation) und die metastatische Kolonisation, woraufhin folglich eine Metastase ausgebildet werden kann (Fares et al., 2020, verändert).

Von besonderer Bedeutung bei der Metastasierung ist die Ausbreitung der Tumorzellen. Hierbei unterscheidet man definitionsgemäß zwischen den disseminierten Tumorzellen (DTC), welche sich in Lymphknoten und im Knochenmark befinden und den im Blutstrom zirkulierenden Tumorzellen (CTC) (Pantel und Brakenhoff, 2004). Während CTC entweder ruhend bleiben, sterben, oder sekundäre Organe durch den Blutstrom erreichen können, befinden sich DTC im Knochenmark und in den Lymphknoten (Pantel und Brakenhoff, 2004). Die im Knochenmark befindlichen DTC, bilden ein Reservoir an Tumorzellen und können von hier aus rezirkulieren und ein Organ mit eventuell besseren Wachstumsbedingungen zur Ausbildung einer Metastase erreichen (Pantel et al., 2008). Darüber hinaus erreichen DTC ebenso Lymphknoten, wobei sie über das Lymphgefäß eintreten (Sleeman und Thiele, 2009). Nach Proliferation der DTC, kommt es hier zu Ausbildung einer soliden Metastase, welche darüber hinaus zu einem späteren Zeitpunkt, ähnlich wie das Rückenmark, als Reservoir für DTC gilt. Folglich können sowohl die Abhängigkeit von Fernmetastasen von einem positiven Lymphknotenstatus als auch im Falle einer reinen hämatogenen Disseminierung ein negativer Lymphknotenstatus erklärt werden (Pantel und Brakenhoff, 2004).

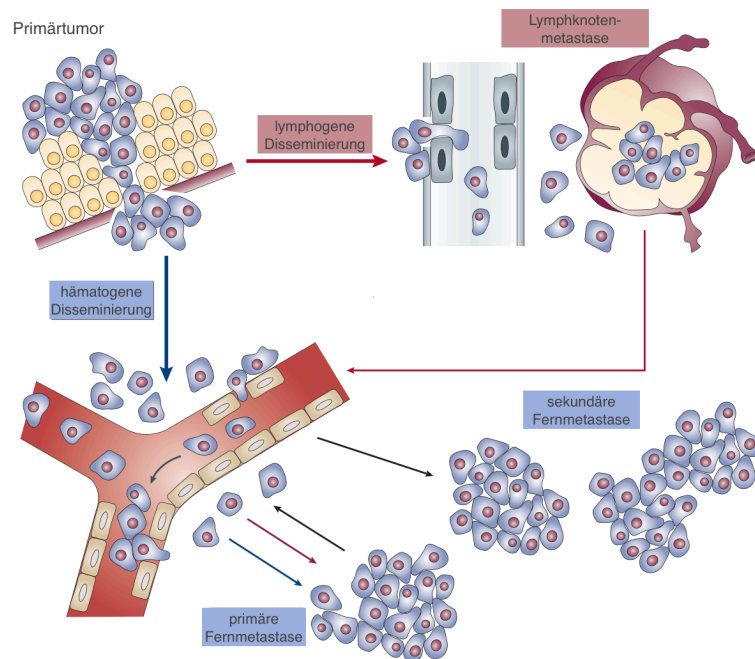


Abbildung 4: Model der Metastasierungskaskade nach Pantel und Brakenhoff

Tumorzellen können entweder auf dem lymphatischen (rote Pfeile) oder auf dem hämatogenen Weg (blaue Pfeile) metastasieren. Darüber hinaus kann eine sekundäre Disseminierung der Krebszellen über den hämatogenen Weg erfolgen (schwarze Pfeile), wodurch sekundäre Fernmetastasen entstehen können (Pantel und Brakenhoff, 2004; verändert).

#### 1.1.4 Sentinel-Lymphknoten

SN-LK, welche den lymphatischen Abfluss eines Primärtumors in erster Station filtrieren, sind häufig als erstes Organ von der Metastasierung betroffen (Sleeman and Thiele, 2009). Physiologisch übernehmen die 1mm großen Lymphknoten, von denen insgesamt ca. 600-700 im menschlichen Körper verteilt sind, wichtige Aufgaben bei der adaptiven Immunantwort. Durch Antigenpräsentation aus der Lymphflüssigkeit, besteht permanenter Reiz zur Antikörperproduktion (Schulte et al., 2018). Kommt es durch Veränderungen im Drainagegebiet des LK (z.B. durch Infektionen, Tumoren) zur Anschwellung, können oberflächlich gelegene LK tastbar und schmerzhaft werden. Im Rahmen von Tumorerkrankungen wird insbesondere der SN-LK auf das Vorhandensein von metastasierten Krebszellen untersucht.

Allerdings gehört die Detektion von DTC in LK nicht zur routinierten klinischen Staginguntersuchung, wobei das Vorhandensein von entscheidender Bedeutung für die Auswahl der bestmöglichen Therapie ist (Balic et al., 2011). Insbesondere, da sich gezeigt hat, dass Lymphknoten, welche nach zuvor routinemäßiger Histopathologie untersucht und als negativ eingestuft wurden, nach erneuter intensiver Untersuchung (Analyse von Serienschnitten, Verwendung von immunhistochemischen oder molekularen Verfahren) Mikrometastasen ausweisen (Balic et al., 2011). Umso

wichtiger erscheint die Etablierung eines sensitiven Verfahren zur Detektion von (Mikro-)Metastasen in SN-LK beim PCa. Hierfür sind in den letzten Jahren neue Methoden, wie bspw. die  $^{68}\text{Gallium}$ -Prostata-spezifisches-Membran Antigen (PSMA;  $^{68}\text{Gallium}$ -Prostate Specific Membrane Antigen) Positron Emission Tomographie (PET) bzw. Computer Tomographie (CT) oder die Magnetresonanztomographie getestet worden (Winter et al., 2017). Es hat sich gezeigt, dass diese Methoden zwar zur (Mikro-)Metastasendetektion geeignet sind, allerdings konnten sie sich aufgrund zu niedriger Sensivität (49%–66%) nicht gegen den etablierten Goldstandard der Beckenlymphknotendissektion (pelvic LN dissection (PLND)) durchsetzen (Maurer et al., 2016).

Die EAU Richtlinien empfehlen die erweiterte PLND (ePLND) für Patienten mit mittlerem oder hohem Risiko, sobald das Risiko eines positiven LK-Status 5%, gemessen am Briganti-Nomogramm (s. Anhang 7.1.4), überschreitet (Mottet et al., 2017). Dennoch ist der therapeutische Nutzen für den Patienten aufgrund höherer intra- und postoperativer Komplikationen, insb. infizierten Lymphozelen und Lymphödemen, umstritten. Bis zum Vorliegen von qualitativ hochwertigen Ergebnissen aus randomisiert-kontrollierten Studien, wird eine individuelle Risikostratifizierung zur Durchführung der ePLND postuliert (Fujimoto et al., 2019). Hinsenveld et al. konnten allerdings zeigen, dass der Einsatz der Kombination aus PSMA PET/CT und SN Biopsie von zuvor durch PSMA PET/CT negativ bewerteten SN, eine 100%ige Sensivität bei der Detektion von (Mikro-)Metastasen während der ePLND bewirkt (Hinsenveld et al., 2020).

## **1.2 Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ Superfamilie**

Die TGF- $\beta$  Superfamilie setzt sich aus mehr als 30 Polypeptiden zusammen, welche als Zytokine diverse unterschiedliche Funktionen ausüben (David und Massagué, 2018; Nolte und Margadant, 2020). Als Signalproteine sind sie an fast allen physiologischen Prozessen beteiligt und übernehmen eine wichtige Rolle innerhalb der Zellkommunikation. Sie können sowohl in embryonalen als auch in adulten Zellen die Zellproliferation, -differenzierung, -adhäsion, -bewegung, -metabolisierung und die Apoptose beeinflussen (Massagué, 2000). Außerdem sind sie an der Regulierung des Immunsystems, der Angiogenese und der Wundheilung beteiligt, wobei ihre genaue Wirkungsweise zellspezifisch und abhängig vom Entwicklungsgrad der jeweiligen Zelle ist (Massagué, 2000; Blobel et al., 2000; Dijke et al., 2002). Ihre Fehlfunktion resultiert in entwicklungsbedingten, immunologischen oder fibrotischen Krankheiten (David und Massagué, 2018). Darüber hinaus spielt die TGF- $\beta$  Superfamilie sowohl bei der Tumorsuppression als auch bei der -promotion eine zentrale Rolle (Kubiczkova et al., 2012).

Die TGF- $\beta$  Superfamilie umfasst eine große Anzahl an Proteinen, welche in Untergruppen eingeteilt werden (s. Tabelle 1). Zu diesen Untergruppen gehören: Activin/Inhibin-Familie, „Bone Morphogenetic Proteins“ (BMPs), „Growth Differentiation Factors“ (GDFs), TGF- $\beta$  Subfamilie („TGF- $\beta$  subfamily“), „Glial cell line-derived neurotropic factors“ (GDNFs), „Müllerian inhibiting substance“ (MIS), Nodal und Dorsalin (Massagué, 1998; Kubiczkova et al., 2012).

Tabelle 1: Übersicht über die TGF- $\beta$ -Untergruppen (Massagué, 1998; Dombrowski, 2010, verändert).

TGF- $\beta$	BMP	GDF	Activin/Inhibin
TGF- $\beta$ 1,2,3,4,5	BMP 2,4,5,6,10 BMP3/Osteogenin BMP3b/GDF10 BMP7/OP-1 BMP8a/OP-2 BMP8b/OP-3 BMP16/Nodal	GDF-1, -3, -9 GDF-11/BMP1 GDF-7/BMP12 GDF-6/BMP13 GDF-5/BMP14 GDF-9b/BMP15 GDF-8/Myostatin GDF-15/MIC-1	Activin-A, -B, -AB, -C, -E Inhibin-A, -B, -C

### 1.2.1 Wachstums-Differenzierungs-Faktor-15 (GDF-15)

Der Wachstums-Differenzierungs-Faktor-15 („Growth Differentiation Factor 15“; GDF-15) wurde 1997 von Bootcov et al. erstmals als „macrophage inhibitory cytokine-1“ (MIC-1) beschrieben und gilt seitdem als neues Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie. Schon vor ca. 25 Jahren konnte gezeigt werden, dass Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) und M-CSF die GDF-15 Expression induzierte, die mit einer Hemmung der Makrophagen (M $\Phi$ )-Aktivierung einherging (Bootcov et al., 1997). Das Zytokin wurde in den darauffolgenden Jahren von weiteren Gruppen mit anderen Namen untersucht und z.T. als GDF-15 (Böttner et al., 1999a), PDF („prostate differentiation factor“) (Paralkar et al., 1998), PLAB („placental bone morphogenetic protein“) (Hromas et al., 1997), PTGF- $\beta$  („placental TGF- $\beta$ “) (Lawton et al., 1997), NAG-1 („non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1“) (Baek et al., 2002) und PL74 tituiert (Li et al., 2005). Wegen seinen unterschiedlichen Funktionen und Beteiligung an diversen Prozessen im menschlichen Körper ist eine Einteilung in eine der bestehenden Untergruppen der TGF- $\beta$ -Superfamilie nicht möglich. Es wird deshalb als ein divergentes Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie angesehen (Bootcov et al., 1997; Böttner et al., 1999b; Fairlie et al., 1999).

### 1.2.2 Genetik und Struktur von GDF-15

Die genetische Grundlage für GDF-15 befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 19. Das aus 2746 bp bestehende Gen besitzt zwei Exons und ein Intron

(s. Abbildung 5) (Böttner et al., 1999b). Die Synthese von GDF-15 findet, wie bei allen Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Superfamilie, zunächst als inaktives Vorläuferprotein statt. Dieses hat nach Synthese eine Masse von 62 kDa und enthält neben dem Signalpeptid (16 AS), eine Pro-Region (167 AS), eine RXXR-Sequenz (Restriktionsschnittstelle) und das reife Protein („mature protein“; 112 AS) (Unsicker et al., 2013). Die reife Peptidform entsteht erst, nachdem im rauen endoplasmatischen Retikulum das Propeptid (40 kDa) nach Abspaltung der RXXR-Sequenz dimerisiert, in den Golgi-Apparat weitergeleitet wird und dort Furin-ähnliche Proteasen das Propeptid vom reifen Peptid abspalten. Das reife GDF-15 (25 kDa) wird als Homodimer in die EZM freigesetzt (Bootcov et al., 1997; Fairlie et al., 1999; Bauskin et al., 2000). Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Superfamilie benötigt GDF-15 das Propeptid jedoch weder für eine korrekte Faltung in das aktive Protein noch für die Sezernierung (Fairlie et al., 2001). Neue Studien zeigen allerdings, dass GDF-15 nicht nur in der EZM, sondern ebenso im Nukleus gefunden werden kann. Es wird postuliert, dass GDF-15 die Bildung des SMAD-Komplexes behindert und somit eine Inhibierung des SMAD-Signalweges vornehmen kann (Min et al., 2016).

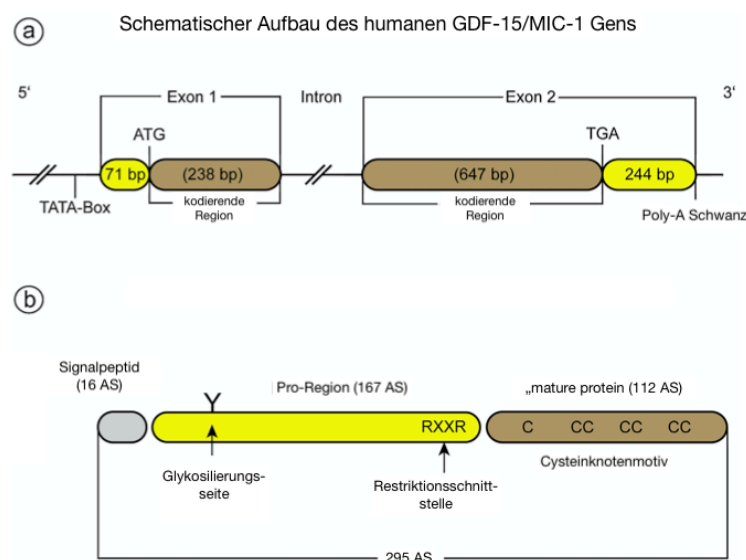


Abbildung 5: schematische Darstellung des Genaufbaus (a) und der Proteinstruktur (b) von GDF-15 (Unsicker et al., 2013, verändert).

Brown et al. konnten ferner einen Polymorphismus auf dem zweiten Exon des GDF-15 Gens nachweisen. Durch den Basenaustausch von Guanin gegen ein Cytosin in der Gensequenz, erfolgt die Einlagerung einer Aspartat- anstelle einer Histidinseitenkette an Position 6 des reifen GDF-15-Proteins (Brown et al., 2002). Dieser H6D-Polymorphismus kann eine Funktionsänderung des reifen Proteins zur Folge haben, welche ebenso von klinischer Bedeutung ist. So konnte bspw. beim Colon-Ca ein erhöhtes Metastasierungsrisiko nachgewiesen werden (Brown et al., 2003a), während

der HD6-Polymorphismus beim PCa mit einem geringeren Risiko für die Entstehung, jedoch mit einer erhöhten Aggressivität beim Wachstum assoziiert ist (Lindmark et al., 2004; Hayes et al., 2006). Ursächlich hierfür, könnte eine in 2015 entdeckte, Primaten-spezifische, p53-regulierende microRNA (miRNA)-Sequenz sein, welche auf der Intron-Sequenz des GDF-Gens lokalisiert ist. Der miRNA „miR-3189“ konnten tumorsuppressive Eigenschaften und eine regulierende Funktion des Zelltods nachgewiesen werden (Jones et al., 2015).

Außerdem war lange kein GDF-15-spezifischer Rezeptor bekannt. Bis 2017 als der „aus der Glia-Zelllinie isolierte neurotrophe Faktor („glial cell- derived neurotrophic factor“ (GDNF))  $\alpha$ -Rezeptor ((glial cell- derived neurotrophic factor family receptor  $\alpha$ -like (GFRAL)) entdeckt wurde (Emmerson et al., 2017; Mullican et al., 2017)). GFLAR konnte im Hirnstamm identifiziert werden, wo er eine zentrale Rolle in der GDF-15-assoziierten Anorexie einnehmen soll (Hsu et al., 2017; Mullican und Rangwala, 2018). GDF-15 ist jedoch an weitaus mehr Prozessen im menschlichen Körper beteiligt, bei denen keine GFLAR-Expression nachgewiesen werden konnte, sodass von einer Existenz weiterer, bislang unbekannter GDF-15-Rezeptoren ausgegangen wird (Wischhusen et al., 2020).

### **1.2.3 Expression und Funktion von GDF-15**

GDF-15 wird in nahezu allen Organen und Geweben des Körpers, jedoch zu unterschiedlichen Konzentrationen, physiologisch exprimiert (Unsicker et al., 2013; Ago und Sadoshima, 2006). Die mit Abstand höchste Konzentration von GDF-15, liegt in der Plazenta, mit einer konstitutiv hohen Expression und im Serum von Schwangeren (Corre et al., 2013), gefolgt von der Prostata vor. In der Prostata wird GDF-15 mäßig exprimiert, wobei gezeigt werden konnte, dass Androgene und Calcitriol regulativen Einfluss nehmen können (Nazarova et al., 2004). In den Organen Blase, Niere, Darm, Magen, Leber, Gallenblase, Pankreas und im Endometrium wurden hingegen nur niedrige Konzentrationen gemessen (Wischhusen et al., 2020). Das Vorhandensein in einer Vielzahl von Geweben, suggeriert eine Beteiligung an diversen allgemeinen und grundlegenden, zellulären Vorgängen (Unsicker et al., 2013). So kann bei Gewebsschädigung, Sauerstoffmangel und oxidativen Stress in diversen Zellen wie bspw. von Kardiomyozyten, Adipozyten, M $\Phi$  und Gefäßmuskelzellen eine erhöhte Expression des stressinduzierten Zytokins GDF-15 beobachtet werden (Tsai et al., 2018). Dies kann auch durch proinflammatorische Zytokine (z.B. IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , mCSF) induziert werden (Modi et al., 2019).

Die pleiotrope Funktion von GDF-15 spiegelt sich klinisch wider, sobald die GDF-15 Expression abnormal erhöht ist. Bislang wurde bei diversen Erkrankungen, wie bspw. Atherosklerose, Herzversagen, idiopathische pulmonale Hypertonie, Nierenversagen, rheumatischer Arthritis, Diabetes, Blutanämie sowie diversen Krebsformen erhöhte Konzentrationen beobachtet. (Breit et al., 2011; Corre et al., 2013). Die exakte



Funktion von GDF-15 konnte allerdings bis dato noch nicht abschließend geklärt werden, was auch durch seine weite Verbreitung in verschiedenen Geweben, mit teilweise paradoxen Wirkungsweisen bedingt ist.

Im Rahmen von Entzündungsprozessen konnte schon 1997 von Bootcov et al. ein anti-inflammatorischer Effekt von GDF-15 gezeigt werden. Nachdem GDF-15 von M $\Phi$  sezerniert wird, reguliert es autokrin durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus die M $\Phi$ -aktivierung (Bootcov et al., 1997). Folglich wird auch die hohe GDF-15 Konzentration in der Plazenta als immunprotektiv erklärt. Sie leistet einen entscheidenden Beitrag zur feto-maternalen Immuntoleranz (Hromas et al., 1997), wohingegen niedrige plazentäre GDF-15 Konzentrationen bei Früh- und Fehlgeburten beobachtet werden können (Tong et al., 2004; Kaitu'u-Lino et al., 2013; Desmedt et al., 2019).

Im Zusammenhang mit seiner anti-inflammatorischen Wirkung, wurden GDF-15 kardioprotektive Eigenschaften suggeriert. Im Mausmodell konnten Xu Jian et al. zeigen, dass GDF-15 vom Myokard sezerniert wird und dadurch protektiv und antihypertroph wirkt (Xu Jian et al., 2006). Darüber hinaus, konnte in GDF-15 defizienten Mäusen, nach einer Ischämie ein größerer Infarktbereich und mehr apoptotische Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Kempf et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass GDF-15 eine Rekrutierung von polymorphkernigen Leukozyten verhindert, was eine Ausheilung des Infarktes ohne kardiale Ruptur ermöglicht (Kempf et al., 2011). Mittlerweile gilt GDF-15 als Biomarker für kardiovaskulären Stress und wird mit Herzinsuffizienz und kardialem Remodelling assoziiert (Andersson et al., 2016; Meijers et al., 2016).

Im Rahmen der Arterioskleroseforschung zeigt GDF-15 ebenso divergente Wirkungen. Einerseits wurde bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen, welche einer fettreichen Ernährung ausgesetzt waren, gezeigt, dass GDF-15 nach Hochregulierung der Expression eine protektive Wirkung entfaltet und die Größe der arteriosklerotischen Läsionen limitiert (Johnen et al., 2012). Andererseits wurde bei GDF-15-defizienten ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt, dass GDF-15 die IL-6 vermittelte Entzündungsantwort auf Gefäßschädigungen reguliert (Bonaterra et al., 2012).

Auch bei Autoimmunerkrankungen wurde der Einfluss von GDF-15 bestätigt.

So wurde eine Korrelation zwischen erhöhten GDF-15-Serumkonzentrationen und Symptomen der rheumatischen Arthritis, wie bspw. einer erhöhten Erythrozytensedimentationsrate, Morgensteifigkeit und druckschmerzempfindlichen Gelenken gefunden (Tanrikulu et al., 2017). Bei Diabetes Typ 1 wurden ebenfalls erhöhte GDF-15-Serumkonzentrationen in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas nachgewiesen (Xu et al., 2018), weshalb GDF-15 auch hier als Biomarker für die Erkrankung angesehen wird (Adela und Banerjee, 2015).

GDF-15 werden außerdem regulatorische Funktionen im Stoffwechsel zugeschrieben, da es von Adipozyten und weißem Fettgewebe freigesetzt wird und dort als Adipokin wirkt (Ding et al., 2009). Eine hohe Konzentration an GDF-15 reduziert neben Nahrungsaufnahme und Körpergewicht auch die Fettleibigkeit und verbessert die Glucosetoleranz (Macia et al., 2012). Den Einfluss von GDF-15 auf den Stoffwechsel, sowie Anorexie und Kachexie, konnte durch die Entdeckung von GFLAR im Hirnstamm nochmal genauer beschrieben werden (Emmerson et al., 2017; Mullican et al., 2017; Hsu et al., 2017; Yang et al., 2017). So wurde im Mausmodell gezeigt, dass die GDF-15 induzierte Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase 11 (MAP3K11, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11) der Schlüsselfaktor der Tumorkachexie ist (Lerner et al., 2016). Coll et al. demonstrierten, dass die stoffwechselregulierenden Effekte des Diabetes 2 Medikamentes Metformin GDF-15 abhängig sind, indem sie GDF-15 Expression erhöhen (Coll et al., 2020) und dadurch auch erklären, warum GDF-15 transgene Mäuse resistenter gegen Fettleibigkeit sind (Chrysovergis et al., 2014). GDF-15 und GFLAR stellen somit Ansatzpunkte für einen pharmakologischen Wirkstoff dar, der neben der Adipositas-therapie, auch in der Behandlung kachektischer Tumorpatienten eingesetzt werden könnte (Wischhusen et al., 2020).

Außerdem ist GDF-15 ein wichtiger regulatorischer Faktor des Eisenmetabolismus (Ramirez et al., 2009; Tanno et al., 2010), der osteoblastischen Differenzierung (Hinoi et al., 2012; Vaňhara et al., 2009) und wird sogar wegen negativer Korrelation von Serumspiegel und Überlebenszeit als Sterblichkeitsindikator angesehen (Wiklund et al., 2010).

#### **1.2.4 GDF-15 in Tumoren**

In einer Vielzahl von Tumorentitäten existiert eine Überexpression von GDF-15. Durch den Anstieg der Konzentration unter pathologischen Bedingungen, wird GDF-15 als potentieller Biomarker für Krebserkrankungen (Khaled et al., 2012; Lerner et al., 2016; Liu et al., 2019), sowie eines potentiellen Rückfalls (Kluger et al., 2011) postuliert. Jedoch können abhängig vom zellulären Zusammenhang, Stadium der Krankheit und Tumormikromilieu, unterschiedliche Wirkungen des Zytokins, einerseits als Tumorsuppressor und andererseits als Tumorpromotor beobachtet werden (Breit et al., 2011; Corre et al., 2013; Bootcov et al., 1997; Ünal et al., 2015; Unsicker et al., 2013). Es wird angenommen, dass GDF-15 in frühen Krebsstadien als Tumorsuppressor die Karzinogenese inhibiert, sobald jedoch der Tumor progredient ist, GDF-15 die Tumorpromotion fördert (Emmerson et al., 2018).

Die Eignung von GDF-15 als Biomarker, sowie die genaue Wirkungsweise und die Rolle bei Metastasierung in verschiedenen Krebsarten war zuletzt Gegenstand vieler Forschungen. So wurden Korrelationen zwischen GDF-15 und der Progression des Kolorektalen Ca (CRC) (Mehta et al., 2014; Mehta et al., 2015), Magenkrebs (Baek et al., 2006; Baek et al., 2009; Blanco-Calvo et al., 2014; Ishige et al., 2016), Hepatozellulären Ca (Liu et al., 2015), Nicht-kleinzelliges BronchialCa (Liu et al., 2016); Urothel- und NierenzellCa (Traeger et al., 2019), OvarialCa (Zhao et al., 2018), Melanomen (Weide et al., 2016), Brustkrebs (Welsh et al., 2003; Windrichova et al., 2017), Multiplen Myeloms (Tanno et al., 2014; Westhrin et al., 2015) sowie des Mundhöhlen-Ca (Schiegnitz et al., 2012) gezeigt.

Hierbei wurde für GDF-15 eine Beteiligung an mehreren Krebszellen-regulierenden Mechanismen, wie der Angiogenese, Apoptose, Proliferation, Pluripotenz, Medikamentenresistenz, Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und Metastasierung nachgewiesen (Modi et al., 2019). Neben dem Smad 2/3 Signalweg, steuert GDF-15 zahlreiche weitere Wege der Signalübertragung wie bspw. IGFRI, PI3K, Akt, ERK1/2 („extracellular-signal regulated kinases 1/2“),  $\beta$ -catenin, p38, MAP-Kinase (mitogen-activated protein Kinase, MAPK), Smad 1/5/8, NF- $\kappa$ B, reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species), mTOR, FAK-RhoA, EGFR, ErbB2 und c-myc in Krebszellen an. Unklar ist jedoch, welcher Signalweg in welcher Situation bzw. welche Zellart zur Signaltransduktion verwendet wird (Wischhusen et al., 2020).

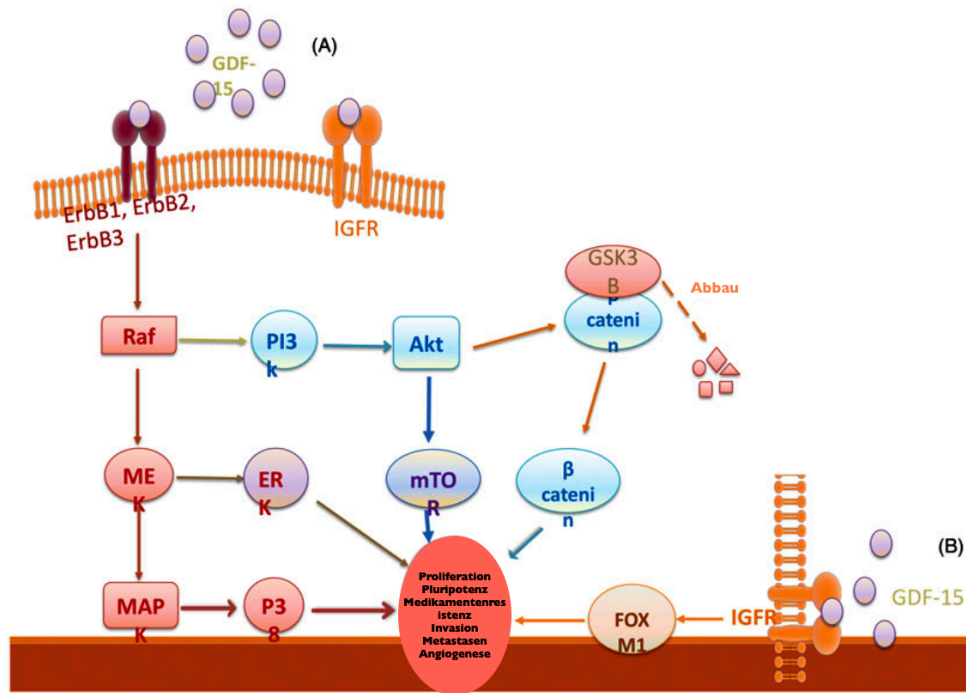


Abbildung 6: schematische Darstellung der GDF-15 Signalwege auf zellulärer Ebene und die Auswirkungen auf die Krebszelle

(A) Nach Freisetzung kann GDF-15 u.a. über die EGF-Rezeptorenfamilie die PI3K/AKT/ $\beta$ -catenin, MEK, ERK und MAPK/p38 Signalwege ansteuern und induziert dadurch verschiedene zelluläre Mechanismen wie bspw. Proliferation, Pluripotenz, Medikamentenresistenz, Invasion, Metastasen und Angiogenese in der Krebszelle. (B) Über den IGF-Rezeptor wird das FOXM1 Gen induziert, welches Proliferation und EMT auslöst (Modi et al., 2019, verändert).

Das breite Spektrum in welchem GDF-15 agiert, macht es schwierig die genaue Funktionsweise zu identifizieren. Bezüglich der Rolle als diagnostischer und prognostischer Marker konnten Wang et al. mit GDF-15 allerdings spezifischere Ergebnisse zur Identifizierung von CRC im frühen Stadium erzielen, als mit dem Tumormarker Carcinoembryonalen Antigen (CEA) (Wang et al., 2017b). Eine Kombination aus beiden Markern würde eine signifikant höhere Sensivität von 72,7% und Spezifität von 89,9% in diagnostischen Rahmen liefern (Wang et al., 2017b). Gleichmaßen fanden Liu et al. beim HepatozellulärenCa, Kaur et al. beim PankreasCa und Zaho et al. beim OvarialCa heraus, dass eine Kombination bereits bestehender Tumormarker mit GDF-15 die diagnostische Sensivität steigern würde (Liu et al., 2015; Kaur et al., 2013; Zhao et al., 2018).

Ferner ergab eine Meta-Analyse von acht unterschiedlichen Studien, dass hohe GDF-15 Spiegel beim CRC mit einer schlechteren Gesamtüberlebensrate (HR: 2,09) assoziiert sind (Li et al., 2015). Gleiches zeigt sich bei diversen Tumorentitäten. So werden hohe GDF-15 Serum Konzentrationen beim Lungen-, Ösophagus-, Endometrium- und OvarialCa, Melanomen, Glioblastomen, Osteosarkomen und

uterinem Sarkom mit einer geringeren Gesamtüberlebensrate assoziiert (Liu et al., 2016; Urakawa et al., 2015; Staff et al., 2011; Zhang et al., 2016; Weide et al., 2016; Shnaper et al., 2009; Chen et al., 2019; Codó et al., 2016; Trovik et al., 2014). Beim Lungenkrebs wurde im Zusammenhang mit hohen GDF-15 Konzentrationen zusätzlich eine geringere 3-Jahresüberlebensrate, sowie eine höhere T-Klassifizierung (Liu et al., 2016), beim Ovarial-, Ösophagus- und EndometriumCa ein geringeres progressionsfreies Überleben (Zhang et al., 2016; Urakawa et al., 2015; Staff et al., 2011) festgestellt. Beim MundhöhlenCa konnten bei niedriger GDF-15-Expression höhere Gesamtüberlebensraten sowie längere Zeiten ohne Tumorregression nachgewiesen werden (Schiegnitz et al., 2012; Yang et al., 2014). Auch beim ÖsophagusCa wurde eine signifikante positive Korrelation zwischen hohen GDF-15 Serum Konzentrationen und eine Klassifizierung des Stadiums T3 bzw. T4 festgestellt (Wang et al., 2014).

Ursächlich für die geringere Gesamtüberlebensrate bei hohen GDF-15 Konzentrationen, kann die positive Korrelation zwischen hohen GDF-15 Konzentrationen und dem Auftreten von Metastasen sein. Ein Zusammenhang zwischen jenem konnten sowohl Peake et al. und Gretski et al. beim Brustkrebs (Peake et al., 2017; Gkretsi et al., 2019), Wang et al. beim Hepatozellulären Ca (Wang et al., 2017a), Zhang et al. und Li et al. beim CRC (Zhang et al., 2018; Li et al., 2015), Suesskind et al. bei Uvealmelanomen (Suesskind et al., 2012), Baek et al. und Ishige et al. beim MagenCa (Baek et al., 2009; Ishige et al., 2016), Wang et al. und Xu et al. beim Hepatozellulären Ca (Wang et al., 2017a; Xu et al., 2017), Griner et al. beim OvarialCa (Griner et al., 2013), Yang et al. beim MundhöhlenCa (Yang et al., 2014), Urakawa et al. beim PlattenepithelCa des Ösophagus (Urakawa et al., 2015), Staff et al. und Engerud et al. beim Ca des Endometriums (Staff et al., 2011; Engerud et al., 2019) und Chen et al. beim Osteosarkom (Chen et al., 2019) feststellen. Des Weiteren liegen bei Lungen-, Brust-, Prostatakrebs- und CRC-Patienten mit Knochenmetastasen höhere GDF-15 Konzentrationen vor, als bei Patienten ohne Metastasen (Windrichova et al., 2017).

Der Zusammenhang zwischen vermehrt auftretender Metastasierung bei einer erhöhten GDF-15-Expression, konnte u.a. durch den zellulären Effekt der epithelial-mesenchymale Transition gezeigt werden. Beim CRC bindet GDF-15 an den TGF- $\beta$ -Rezeptor und induziert dadurch den Smad2 und Smad 3 Signalweg (Li et al., 2015). N-Cadherin, Vimentin, MMP9 und Twist1 werden hochreguliert, wohingegen die E-Cadherin Expression unterdrückt wird, sich der Zellverband löst und eine Zellinvasion und -migration erfolgt (Zhang et al., 2018). Beim Hepatozellulären Ca hingegen wird bei einer vermehrten GDF-15 Expression E-Cadherin hochreguliert und dies resultiert ebenso in einer gesteigerten Zellbeweglichkeit, -invasion, -migration sowie Angiogenese (Wang et al., 2017a). Beim Brustkrebs wird die EMT durch das

Ansteuern des GDF-15-IGF-1R-FoxM1 Signalwegs, mit Hilfe der Matrix-Metalloproteasen-2 und -9 (MMP-2 und MMP-9) sowie der EMT-spezifischen Transkriptionsfaktoren „snail“ und „slug“ induziert (Peake et al., 2017).

Darüber hinaus fand man weitere Mechanismen anhand derer gezeigt werden konnte, inwiefern GDF-15 an der Zellinvasion und -migration beteiligt ist. So transaktiviert GDF-15 in ErbB2-hochregulierten Magenkrebszellen den EGFR-Tyrosinkinase-Rezeptor, wodurch Akt und ERK-1/2 phosphoryliert werden (Kim et al., 2008b). Außerdem hebt es den Metastasen-unterdrückenden Effekt des Ras Suppressor-1 (RSU-1) durch eine Aktivierung der Aktin-Zytoskelett regulierende Gene alpha parvin (PARVA), RhoA, Rho-assoziierte Proteinkinase1 (Rho-associated protein kinase-1, ROCK-1), und Fac-sin-1 in Brustkrebszellen auf (Gkretsi et al., 2019) Ebenso wird der AKT-Signalweg von GDF-15 beim Hepatozellulären Ca (Xu et al., 2017), sowie nach mechanischer Stressinduzierung in pankreatischen Krebszellen (Kalli et al., 2019) zur Metastasierung initiiert.

Paradoxerweise werden GDF-15 auch anti-karzinogene Eigenschaften zugeschrieben, was seine pleiotropen Effekte als Zytokin unterstreicht. Sowohl beim Magenkrebs (Han et al., 2017), Lungenkrebs (Kim et al., 2008a; Cekanova et al., 2009), CRC (Yamaguchi et al., 2004), Hepatozellulären Ca (Shin et al., 2008; Auyeung und Ko, 2009; Zhang et al., 2017), als auch beim MundhöhlenCa (Kang et al., 2012) konnten GDF-15 anti-proliferative, inhibierende und pro-apoptotische Eigenschaften zugeschrieben werden. Im Einklang dazu, reduzierte eine vermehrte GDF-15 Expression, hervorgerufen durch das Lentivirus im Lungenadenokarzinom, in vivo die Anzahl und Stellen der Lungen- und Knochenmetastasen (Duan et al., 2019). Inhibiert durch GDF-15 werden hierbei der p38-MAPK (Cekanova et al., 2009), sowie der PI3K-Akt-PKB und ERK1/2 Signalweg (Kim et al., 2008), wodurch im Lungenkarzinom die apoptotische Wirkung von GDF-15 demonstriert wurde. Eine inhibierende, anti-proliferative Funktion löst GDF-15 ebenso durch die Aktivierung des p53-Tumorsuppressors aus (Yang et al., 2003; Cheng et al., 2011).

In widersprüchlicher Weise fungiert GDF-15 auch in mehreren Brustkrebszelllinien. Dort agiert das Onkogen YAP (Yes-associated protein) als transkriptioneller Repressor von GDF-15 und steigert die Metastasierung, besonders bei niedrigen GDF-15-Konzentrationen (Wang et al., 2018). Während ein knock-down von YAP die Metastasierung reduziert, nimmt die Metastasierung bei einem knock-down von GDF-15 zu (Wang et al., 2018).

Andererseits bewirkt GDF-15 im Rahmen der Krebstherapie eine Resistenz gegenüber Therapiemaßnahmen: Bei der medikamentösen Brustkrebstherapie mit Trastuzumab, löst GDF-15 eine Phosphorylierung einerseits der HER2-Akt-ERK1/2 Achse (Joshi et

al., 2011), andererseits von p38 aus (Donnelly et al., 2014), wodurch die eigentliche Wirkung von Trastuzumab, die Inhibierung des HER2-Rezeptors, aufgehoben wird. Weitere Untersuchungen zeigen, dass GDF-15 bei Brustkrebs- und MundhöhlenCa-zellen, die Effekte der Strahlentherapie hemmt (Schilling-Tóth et al., 2014; Schiegnitz et al., 2016). Hierbei steht die Aktivierung des Smad-Signalwegs und die damit verbundene Reduzierung von intrazellulär vorhandenen reaktiven Sauerstoffspezies von GDF-15 unter Verdacht, die Resistenz gegenüber der Strahlentherapie beim MundhöhlenCa auszulösen (Li et al., 2017).

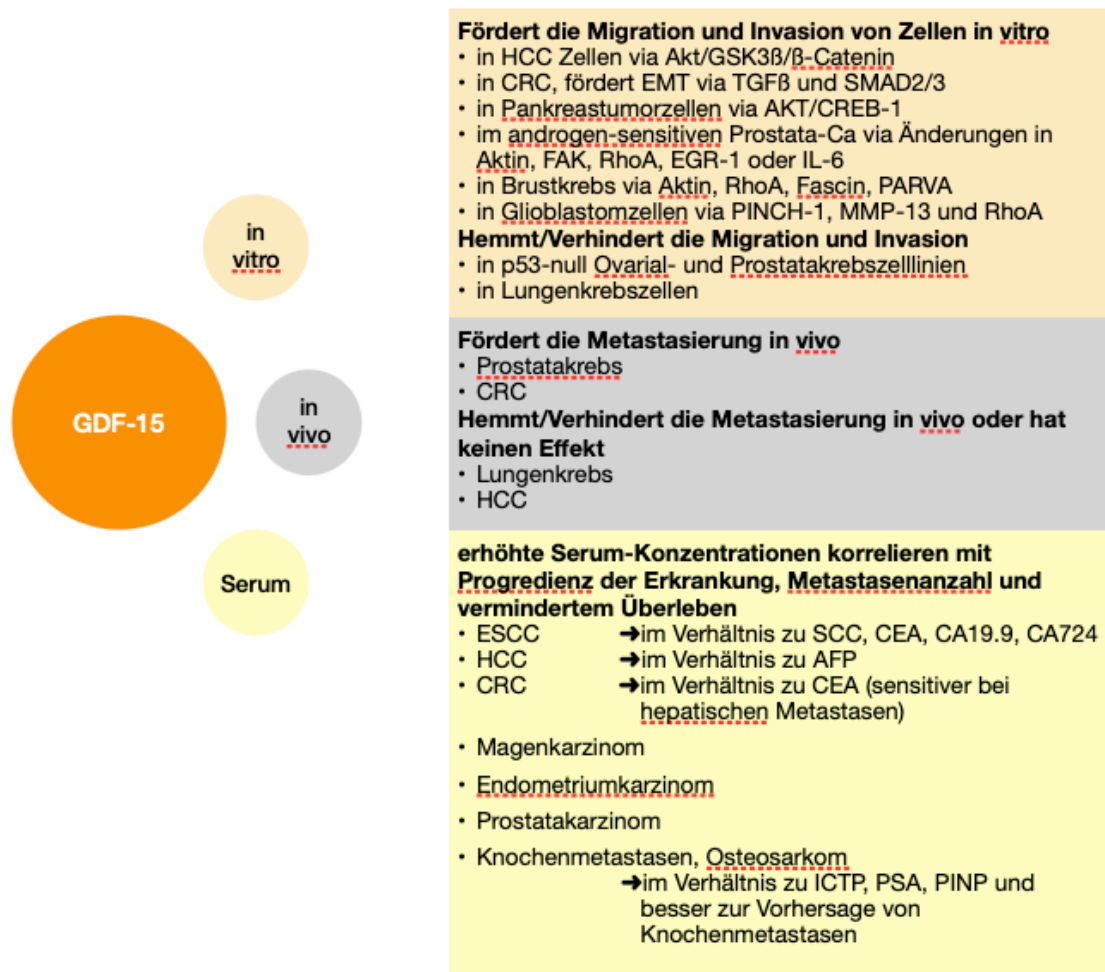


Abbildung 7: Zusammenfassung der in vitro-, in vivo- und Serum Studien zu der Rolle von GDF-15 in Metastasen

HCC: Hepatozelluläres Ca; ESCC: PlattenepithelCa des Ösophagus, (esophageal squamous cell carcinoma) , SCC: PlattenepithelCa-Antigen (squamous cell carcinoma antigen) ; AFP: alpha fetoprotein; ICTP: C-Terminales Telopeptid des Typ I Kollagens (cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen); PINP: Gesamt Prokollagen Typ I N-Propeptid (amino-terminal propeptide of type I procollagen). (Spanopoulou and Gkretsi, 2020, verändert).

### 1.2.5 GDF-15 beim PCa und seine Rolle bei Metastasierung

Beim PCa konnte sich GDF-15 ebenso wie bei anderen Krebsentitäten als nützlicher und zuverlässiger Biomarker etablieren. Insbesondere weil der bisher verwendete

Biomarker PSA oft schon bei einer benignen Prostatahyperplasie erhöht ist und somit als zu unspezifisch gilt. Häufig erfolgt bei alleiniger Verwendung von PSA eine Überdiagnose mit folgender Übertherapie (Brown et al., 2006; Li et al., 2015). Die alleinige GDF-15-Serummessung verbessert besonders die Diagnose bereits progredienter PCa ( $\geq$  GS7) (Brown et al., 2006). Weiterhin kann die Spezifität und Sensivität der Diagnose des PCas mit einer Kombination aus dem etablierten Biomarker PSA und GDF-15 gesteigert werden (AUROC GDF-15/PSA: 0.81 mit 83.3% Sensivität und 60.7% Spezifität, verglichen mit PSA allein: AUROC 0.68 mit 54.8% Sensivität und 57.1% Spezifität) (Li et al., 2015).

Gleichermaßen, wie bei anderen Tumorentitäten, wird das Vorhandensein von GDF-15 als prognostisch ungünstig angesehen. Beim Vergleich der Sterberaten von Patienten mit hohen GDF-15 Serumkonzentrationen mit denen von Patienten mit niedrigen GDF-15 Konzentrationen, kann bei hohen Konzentrationen eine fast dreifach höhere Sterberate vermerkt werden. Liegt bereits vor der Behandlung des PCas eine hohe GDF-15 Konzentration vor, wird die Sterberate der Patienten mit hohen GDF-15 Konzentrationen um den Faktor 8 gesteigert (Brown et al., 2009). Neuste Ergebnisse von Sadasivan et al. bestätigen eine höhere GDF-15 Expression im Gewebe vom PCa im Vergleich zu angrenzenden normalen Geweben. Bei umgekehrten GDF-15 Expressionsniveaus konnte allerdings ein höheres Risiko für ein biochemisches Rezidiv des PCa festgestellt werden (Sadasivan et al., 2020). Mehrere Untersuchungen zeigen, dass hohe GDF-15 Konzentrationen beim PCa positiv mit der Tumorzellproliferation, der Tumorprogression, dem verankerungsunabhängigen Wachstum des Tumors und dem Auftreten von Knochenmetastasen korrelieren (Chen et al., 2007; Tsui et al., 2012; Bruzzese et al., 2014; Selander et al., 2007; Windrichova et al., 2017). Auf zellulärer Ebene konnte dies mittels der Beobachtung der Aktivierung des FAK-RhoA Signalwegs und darauffolgender Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, sowie vermehrter Zellbeweglichkeit, -invasion und -metastasierung beobachtet werden (Senapati et al., 2010). Tsui et al., konnten außerdem demonstrieren, dass eine Fehlregulierung von Maspin und Matriptase, sowie eine IL-6 bedingte Überexpression von GDF-15 eine erhöhte Karzinogenese und Invasivität von Prostatakrebszellen auslöst (Tsui et al., 2012). Ein inverse Korrelation zwischen GDF-15 und Immunzellen in humanen PCa-Zellen weist ebenso auf pro-kanzerogene Eigenschaften von GDF-15 hin (Lambert et al., 2015). Ferner wurde nachgewiesen, dass sich GDF-15 nicht nur in den Krebszellen selbst, sondern auch in tumorassoziierten Fibroblasten und somit in dem Tumor umgebenden Bindegewebe lokalisiert ist (Bruzzese et al., 2014). Lee et al. konnten diesbezüglich feststellen, dass GDF-15 und andere Zytokine der TGF- $\beta$ -Familie eine auto- und parakrine Funktion sowohl auf Tumor- als auch Stromazellen wie Endothelzellen und Osteoblasten innerhalb der Tumormikroumgebung ausüben, wodurch die Entstehung von Knochenmetastasen gefördert werden (Lee et al., 2014). Außerdem konnte mit der



Tatsache, dass Prostatakrebszellen, die GDF-15 Produktion in Osteozyten anregen und somit die Zellproliferation, -migration und -invasion dieser fördern, die Häufigkeit der Knochenmetastasen beim PCa erklärt werden (Wang et al., 2019).

Als weiteren negativen Einflussfaktor auf das Outcome des PCa Patienten stellt sich die direkte Korrelation zwischen erhöhten GDF-15-Serumkonzentrationen und dem tumor-assoziierten Gewichtsverlust (Tumorkachexie) dar (Johnen et al., 2007). Des Weiteren trägt GDF-15 bei der Therapie des hormonrefraktären PCa zu einer Resistenz gegenüber dem Krebsmedikament Docetaxel bei, wodurch potentiell schlechtere Therapieergebnisse erzielt werden können (Huang et al., 2007; Zhao et al., 2009; Magadoux et al., 2014). Dennoch zeigt GDF-15 auch beim PCa widersprüchliche Wirkungen. Neben einer p53 bedingten Überexpression von GDF-15, welche die Zellinvasion und -migration *in vivo* inhibiert (Cheng et al., 2011), konnten Husaini et al. zeigen, dass im transgenen Adenokarzinom Modell der Maus (TRAMP, Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate) durch eine erhöhte GDF-15 Expression, das Wachstum des Primärtumors reduziert wird (Husaini et al., 2012). Zwar überlebten die TRAMP-Mäuse durchschnittlich 7,4 Wochen länger und hatten ein niedrigeres histopathologisches Grading, dennoch konnte eine höhere Anzahl an Fernmetastasen beobachtet werden (Husaini et al., 2012). Somit wird die These unterstützt, dass GDF-15 in frühen Tumorstadien die Karzinogenese inhibiert, bei progredienten Tumoren allerdings lokal invasive und metastasierende Mechanismen fördert (Husaini et al., 2012; Modi et al., 2019).

### **1.3 Tumormimmunologie**

Unter physiologischen Bedingungen kann das Immunsystem „fremde“ Zellen, wie bspw. Tumorzellen oder -metastasen erkennen und diese durch die Rekrutierung zytotoxischer T-Lymphozyten eliminieren (Boon et al., 1994). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass Krebszellen dieser Überwachung entfliehen können, indem sie negative Signale durch Oberflächenmoleküle hochregulieren und somit die T-Zell Aktivierung inhibieren, Apoptose induzieren, sowie die Progression und Metastasierung von Tumorzellen fördern (Zou, 2005). Die Entstehung einer solchen Immuntoleranz wird maßgeblich vom vorherrschenden Tumormikromilieu beeinflusst. Dieses wird v.a. durch regulatorische Immunzellen, Zytokine, Chemokine und die Herunterregulierung von Immunfunktionen durch Immun Checkpoint Signalwege hervorgerufen und aufrechterhalten (Topalian et al., 2016). Hierbei ist zuletzt der Signalweg des programmierten Zelltods (programmed cell death-1, PD-1) und seines Liganden programmierter Zelltod Ligand-1 (programmed death ligand-1, PD-L1) in den Fokus der Forschungen gerückt (He et al., 2015). PD-1 fungiert mit seinen Liganden als co-inhibitorischer T-Zell Rezeptor und trägt maßgeblich zur Immunevasion von Tumorzellen bei (Baas et al., 2017). Die Blockade des PD-1/PD-L1 Signalwegs ist als vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Immunotherapie gegen Tumore

Gegenstand zahlreicher Forschungen (Brahmer et al., 2012; He et al., 2015; Teng et al., 2018).

### 1.3.1 PD-1

PD-1 (CD279) ist ein Typ-I Transmembranprotein, zugehörig zur CD28- und Ig-Superfamilie (Ishida et al., 1992; Zhang et al., 2004). Erstmals wurde das PD-1 Gen 1992 von Ishida et al. in einer T-Zelllinie beschrieben, in welcher es für den anschließenden programmierten Zelltod verantwortlich gemacht wurde und folglich als programmierter Zelltod 1 betitelt wurde (Ishida et al., 1992). PD-1 kann sowohl während der Entwicklung des Thymus auf der Oberfläche von T-Zellen als auch nach T-Zell-Rezeptor Signalen oder peripherer Zytokinstimulation auf der Oberfläche von verschiedenen hämatopoetischen Zellen beobachtet werden (Ohaegbulam et al., 2015). Die Expression des 55 kDa großen Proteins wurde bislang auf CD4<sup>-</sup> und CD8<sup>-</sup> Thymozyten, peripheren CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, B-Zellen, aktivierten Monozyten, natürlichen Killer-T-Zellen, erschöpften T-Zellen und dendritischen Zellen beschrieben und kann auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten hochreguliert werden (Ishida et al., 1992; Agata et al., 1996; Keir et al., 2008; Ceeraz et al., 2013). Der PD-1 Rezeptor interagiert mit den beiden Liganden PD-L1 (B7-H1, CD274) (Dong et al., 1999; Freeman et al., 2000 und PD-L2 (B7-DC, CD273) (Latchman et al., 2001; Tseng et al., 2001), wobei PD-L1 eine bedeutendere Rolle zugeschrieben wird (Ohaegbulam et al., 2015).

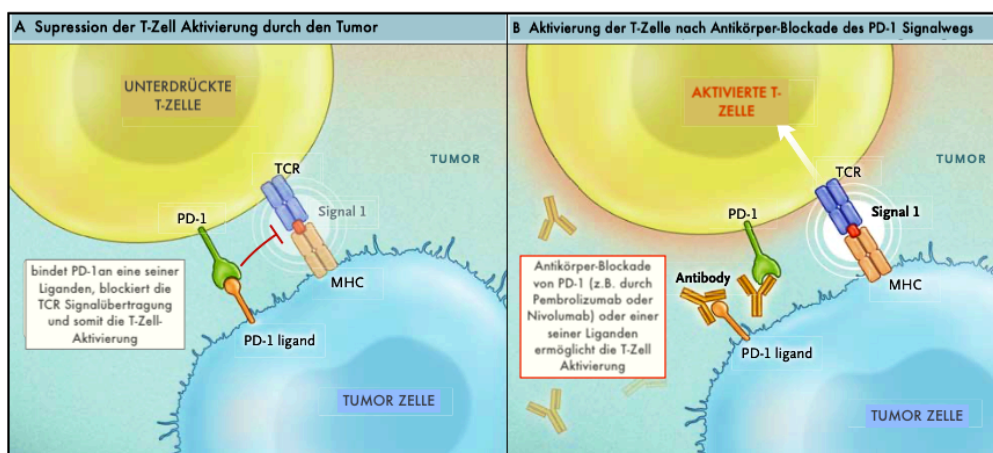


Abbildung 8: T-Zell Aktivierung im Tumormikromilieu

Im vorherrschenden Mikromilieu des Tumors wird PD-1 auf T-Zellen exprimiert.

A: Hemmung des TCR-Signals durch die PD-1/PD-L1 Interaktion. B: Eine medikamentöse Blockierung von PD-1 oder seiner Liganden ermöglicht die Aufhebung der PD-1/PD-L1 induzierten Blockade des TCR-Signals und führt somit zur Aktivierung von T-Zellen. (Ribas, 2015, verändert).

### 1.3.2 PD-L1

Der Ligand PD-L1, welcher auch unter dem Synonym CD 274 bekannt ist, gehört der B7-Supergenfamilie an und stellt ein Typ-I-Transmembranprotein dar (Dong et al., 1999; Freeman et al., 2000). PD-L1 wird konstitutionell in den meisten Geweben nicht exprimiert (Dong et al., 2002), kann jedoch nach zell-spezifischer Stimulation sowohl auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen gefunden werden (Ohaegbulam et al., 2015). So konnte es sowohl auf Lymphozyten im Blut als auch auf Lungen-, Endothel-, nicht parenchymalen Leber-, mesenchymalen Stamm- und neuronalen Zellen, Astro- und Keratinozyten nachgewiesen werden (Keir et al., 2008; Yamazaki et al., 2002; Zhong et al., 2007). Interessanterweise liegt es in den meisten gesunden Geweben nur in einer geringen Konzentration vor (Baas et al., 2017), wobei Plazenta, Thymus und Tonsillen mit hohen physiologischen PD-L1 Konzentrationen eine Ausnahme bilden (Brown et al., 2003b). Eine vermehrte Expression von PD-L1 wird durch die Sekretion mehrerer proinflammatorischer Zytokine wie u.a. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , LPS, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, Granulozyten-M $\Phi$ -Kolonie-stimulierende Faktor). VEGF sowie IL-10 und IL-1 hervorgerufen, wobei IFN- $\gamma$  als besonders induzierend gilt (Sznol und Chen, 2013; Kondo et al., 2010). Veranlasst wird die vermehrte PD-L1 Expression als Antwort auf Inflammation zum Schutz des umliegenden Gewebes vor Kollateralschäden der Immunantwort (Taube et al., 2012).

#### 1.3.2.1 PD-L1 auf Tumoren

PD-L1 konnte auf einer Vielzahl von Tumorentitäten, insbesondere dem nicht-kleinzelligem BronchialCa (Velcheti et al., 2014; Boland et al., 2013), aber auch u.a. auf Melanomen, Nierenzell-, Magen-, Leber- und HautCa sowie bei verschiedenen Formen der Leukämie beobachtet werden (Spranger et al., 2013; Thompson et al., 2005). Der Nachweis gelang allerdings nicht bei jeder Krebsart (Dong et al., 2002) und wenn, dann wurde es im Zytoplasma und in der Plasmamembran von Krebszellen aufgefunden (Dong et al., 2002; Taube et al., 2012).

Unter physiologischen Bedingungen trägt ein ausgeglichenes Verhältnis von Immuncheckpoint Molekülen zur Aufrechterhaltung der hämöostatischen Immunantwort bei (He et al., 2015). Im Tumormikromileu bewirkt die Interaktion von PD-1 und PD-L1 eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege, wodurch die Aktivierung von Immunzellen, insbesondere T-Zellen und deren Sekretion von Antikörpern und Zytokinen gehemmt wird (Jiang et al., 2019). Folglich unterbleibt die physiologische Immunantwort, bei welcher zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen rekrutiert werden, um den Tumor zu infiltrieren und Tumorzellen zu eliminieren (He et al., 2015). Als negativer-Feedback Mechanismus induzieren Zytokine und Exosome im Tumormikromileu darüber hinaus die Expression von PD-L1, wodurch die Immunevasion des Tumors nochmal gesteigert werden kann (Topalian et al., 2016; Jiang et al., 2019).

Das Vorhandensein einer PD-L1 Expression auf Tumorzellen wird dennoch kontrovers diskutiert. So verspricht die PD-L1 Expression einerseits ein Ansprechen auf eine PD-1/PD-L1-Antikörper-Therapie (Topalian et al., 2016; Pardoll, 2012; Bardhan et al., 2016), andererseits scheint die PD-L1 Expression aber ein unabhängiger Prädiktor für ein schlechteres Gesamtüberleben zu sein (Thompson et al., 2004; Ohigashi et al., 2005; Hino et al., 2010). Aufgrund schlechter klinischer Ergebnisse der Immuntherapie insbesondere beim metastasierenden kastrationsresistenten PCa (mCRPC, metastatic castrate-resistant prostate cancer) (Frenel et al., 2017; Fay und Antonarakis, 2019), wurde zunächst angenommen, dass es im PCa keine bzw. nur eine geringe PD-L1 Expression vorhanden ist (Martin et al., 2015; Baas et al., 2017). Gevensleben et al. konnten allerdings sowohl eine hohe PD-L1 Expression als auch einen Zusammenhang zwischen PD-L1 und dem biochemischen Rezidiv eines erhöhten PSA-Wertes feststellen (Gevensleben et al., 2016). Weitere Untersuchungen zur PD-L1 Expression im PCa deuten darauf hin, dass PD-L1 als dynamischer Biomarker fungiert (Velho und Antonarakis, 2018). So konnte gezeigt werden, dass Patienten, die trotz anti-androgener Therapie mit Enzalutamide, an einem progredienten mCRPC leiden, eine höhere PD-L1/PD-L2 Expression aufwiesen, als auf die Therapie ansprechende Patienten (Bishop et al., 2014). Es wird suggeriert, dass eine Steigerung der PD-L1 Expression die Immunevasion und somit die Resistenz gegenüber der Therapie fördert (Velho und Antonarakis, 2018). Eine weitere Erklärung für die erfolglose Anti-PD-1/PD-L1 Therapie beim PCa, könnte extrazellulär, von Exosomen sekretiertes PD-L1 sein, welches seine inhibierende Wirkung auf T-Zellen extrazellulär und somit nicht durch eine Zell-zu-Zell vermittelte Interaktion ausübt (Poggio et al., 2019; Liu et al., 2020). Ob die Wirksamkeit der Anti-PD-1/PD-L1 Therapie beim PCa gesteigert werden kann, bedarf der weiteren Forschung.

Gleiches gilt für die PD-1/PD-L1 Expression im metastasierten Lymphknoten. Hier ist bekannt, dass beim Brustkrebs die PD-L1 Expression im metastasierten axillären Lymphknoten mit klinischen Parametern und schlechteren prognostischen Eigenschaften einhergehen (Yuan et al., 2019). Kamiya et al. konnten beim Morbus Bowen darüber hinaus feststellen, dass die Intensität der PD-L1 Expression mit der Metastasierung korreliert (Kamiya et al., 2020). Ergebnisse anderer Forschungen zeigen diesbezgl. allerdings widersprüchliche Ergebnisse. Während beim nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom eine geringe Korrelation zwischen der PD-L1 Expression und den Lymphknotenmetastasen festgestellt werden konnte, ist diese beim AdenoCa der Lunge hoch (Xu et al., 2019). Demnach kann bislang über die PD-L1 Expression im Lymphknoten kein Rückschluss über die Prognose bzw. das Ansprechen der anti PD-1/PD-L1 Therapie geschlossen werden und es bedarf weiterhin eine Evaluation der Primärläsion (Xu et al., 2019).

## 1.4. Makrophagen (MΦ)

MΦ stellen mit ihrer Hauptaufgabe der Phagozytose eine wichtige Komponente der angeborenen, unspezifischen Immunantwort dar (Lüllmann-Rauch, 2019). Sie sind in der Lage größere Partikel, antikörperbedeckte Bakterien sowie Zellen oder Zellfragmente aufzunehmen (Welsch et al., 2018). Zusammen mit den neutrophilen Granulozyten bilden sie die wichtigsten Fresszellen des menschlichen Körpers. Im Interstitium aller Organe und in allen serösen Höhlen vorkommend, sind sie an der Organisation der Immunabwehr, der Aufrechterhaltung der Gewebemöiostase sowie Auf- und Umbauvorgängen des Gewebes wie bspw. der Wundheilung beteiligt (Lüllmann-Rauch, 2019). Histologisch imponieren MΦ durch einen meist unregelmäßig aufgebauten Zellkern, vergleichbar großen Durchmessers (ca. 20µm), bewegliche Zellfortsätze wie Filo- und Pseudopodien, welche die Bewegung im Gewebe ermöglichen, sowie ein lysosomenreiches Zytoplasma (Lüllmann-Rauch, 2019; Welsch et al., 2018). Oftmals sind auch phagozytierte Reste wie bspw. Zellkerne oder -fragmente lichtmikroskopisch erkennbar (Welsch et al., 2018).

MΦ können sich einerseits bei Entzündungen aus Monozyten differenzieren, die ihrerseits zeitlebens aus dem Knochenmark in die Blutbahn gelangen oder stammen andererseits aus Vorläuferzellen im Dottersack, die während der Embryonalentwicklung in die jeweiligen Gewebe bzw. Organe gelangen. Dort entwickeln sie sich teilweise zu organ-spezifischen MΦ (z.B. AlveolarMΦ in der Lunge, Kupffer-Zellen in der Leber, Mikrogliazellen im ZNS) weiter (Lüllmann-Rauch, 2019; Welsch et al., 2018). Abhängig vom Mikromilieu, welches unterschiedliche Stimulationen auslöst, können sich MΦ zu Subtypen differenzieren, wobei man zwischen einer „klassischen“ und einem „alternativen“ Subtyp unterscheidet (Hao et al., 2012; Welsch et al., 2018). Auf dem klassischen Aktivierungsweg führen das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) bei Bakterieninfektionen, sowie die Zytokine IFN-γ, welches von den Th1-Zellen sezerniert wird und TNF-α zur Differenzierung von M1-MΦ (Hao et al., 2012). M1-MΦ produzieren vornehmlich pro-inflammatorisch wirkende Zytokine wie bspw. IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23 und TNF-α (Edin et al., 2012). Die Zytokine bewirken unter anderem eine Interaktion mit weiteren Entzündungszellen, sodass über einen positiven Feedback-Mechanismus weitere MΦ, aber auch Th1-Zellen rekrutiert werden können (Hao et al., 2012). Ihre pro-inflammatorische Wirkung erzielen sie neben der Zytokinsekretion durch eine Steigerung der vorliegenden Konzentration von Hyperoxiden sowie Sauerstoff- und Stickstoffradikalen (Fairweather und Cihakova, 2009; Sindrilaru et al., 2011). Zur Aktivierung der komplement-vermittelten Phagozytose sezernieren sie außerdem die körpereigenen Antigene I und II des Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC I und II) und Komplementfaktoren (Mantovani et al., 2004). Ebenso wird induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (inducible nitric oxide synthase, iNOS) ausgeschüttet,

welche Arginin in aggressives NO und Citrullin metabolisiert (Modolell et al., 1995; Welsch et al., 2018).

M2-MΦ, welche auf den „alternative“ Aktivierungsweg stimuliert werden, lassen sich weiter in die Phänotypen M2a, M2b und M2c unterteilen (Hao et al., 2012). Während M2a-MΦ durch die Zytokine der Th2-Zellen IL-4 und IL-13 aktiviert werden, erfolgt die Differenzierung der M2b-MΦ durch Immunkomplexe, LPS, Toll-like-Rezeptoren (TLR) oder dem Antagonisten des IL-1 Rezeptors IL-1ra. M2c MΦ werden hingegen durch IL-10, TGF-β oder Glucocorticoide aktiviert (Martinez et al., 2009). M2-MΦ bewirken eine Reduktion der IL-12 and IL-23 Expression, das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wird hingegen vermehrt exprimiert (Solinas et al., 2009), was unter anderem zur Unterdrückung und verminderter Antwort des Immunsystems führt (Edin et al., 2012). Darüber hinaus werden Faktoren z.B. EGF (epidermal growth factor), FGF1 (fibroblast growth factor 1), TGF-b1 (transforming growth factor beta 1), VEGF A (vascular endothelial growth factor A) Fibrin und Matrixmetalloproteasen (MMPs), produziert, die sowohl das Tumorstadium als auch die Angiogenese und den Umbau bzw. die Fibrose des Gewebes fördern (Edin et al., 2012).

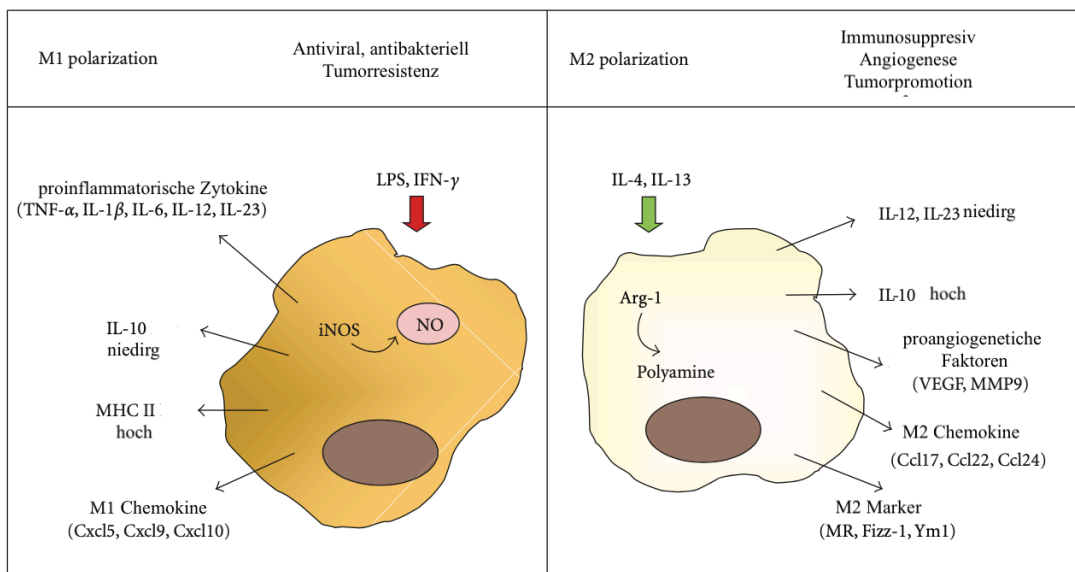


Abbildung 9: Schematische Darstellung der M1- und M2-MΦ Aktivierung

M1-MΦ werden von LPS oder IFN-γ induziert und exprimieren klassisch proinflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12 oder IL-23, Chemokine (bspw., Cxcl9, Cxcl10, and Cxcl5) und erhöhen die NO- und MHC- Konzentration. Die Stimulation von IL-4 bzw. IL-13 bewirkt die M2-MΦ Differenzierung, wodurch die IL-12 und IL-23 Expression herunter reguliert wird und zu einer Freisetzung von Chemokinen, proangiogenetischen Faktoren, IL-10 sowie MR, Fizz-1 und Ym1 kommt (Través et al., 2012, verändert).

Da das Mikromilieu eines Tumors geprägt von Entzündungszellen ist, spielen hierbei auch MΦ, eine wichtige Rolle, wobei das Vorhandensein der zwei Phänotypen, die Kanzerogenese wesentlich regulieren kann. Das pro-inflammatorische Zytokinmilieu der M1-MΦ fördert die Tumorentstehung während M2-MΦ zur Progression des

Tumors beitragen, sodass während der frühen Tumorentstehung sich vermehrt M1-Phänotypen der M $\Phi$  im Tumormikomilieu aufhalten, in späteren Phasen allerdings M2-Phänotypen rekrutiert werden (Salmaninejad et al., 2019). Eine Differenzierung zwischen den beiden Phänotypen lässt sich dabei anhand ihrer Oberflächenmarker vollziehen, welche immunhistochemisch nachgewiesen werden können. M1-M $\Phi$  exprimieren i.d.R. CD68, M2-M $\Phi$  tragen hingegen das CD163 oder CD204-Glykoprotein an ihrer Oberfläche (Heusinkveld und van der Burg, 2011).

Tumor infiltrierende M $\Phi$  werden auch als Tumor-assoziierte M $\Phi$  (tumor-associated macrophages (TAMs)) bezeichnet und sind in den letzten Jahren in den Fokus vieler Forschungen, besonders mit therapeutischem Ansatz, in der Krebstherapie gerückt (Komohara et al., 2016). Neueste Untersuchungen an verschiedenen Krebsentitäten haben gezeigt, dass das Vorhandensein von TAMs, insbesondere CD163 als prognostisch negativer Faktor zu werten ist (Jeremiasen et al., 2020; Qing et al., 2012; Troiano et al., 2019). Im PCa konnte allerdings auch ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Vorkommen von CD68- bzw. M1-M $\Phi$  und einer gesteigerten Tumorangiogenese sowie schlechtes Ansprechen auf die antiandrogene Therapie beobachtet werden (Yuri et al., 2020). Außerdem zeigt sich ein vermehrtes Vorkommen von M1-M $\Phi$ , aufgrund einer Korrelation mit erhöhtem GS, PSA und Metastasen als prognostisch ungünstiger Faktor (Yuri et al., 2020). Aikian et al. konnten darüber hinaus in einer Studie zum Mammakarzinom in metastasierenden Lymphknoten ein vermehrtes Auftreten von M1-M $\Phi$  zeigen und postulieren eine Beteiligung dieser an der Metastasierung (Aikian et al., 2019). Interessanterweise konnten Lambert et al. eine inverse Beziehung zwischen M1-M $\Phi$  und GDF-15 in luminalen Epithelzellen des PCa vorweisen. Inwiefern ein Zusammenhang zwischen GDF-15 und M1-M $\Phi$  im metastasierten Lymphknoten von PCa Patienten vorliegt, sowie die Existenz einer etwaigen Beteiligung von M1-M $\Phi$  an der Metastasierung, soll in der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

## **1.5. B-Lymphozyten**

B-Lymphozyten sind Hauptbestandteil des spezifischen, erworbenen Immunsystems. Unreif entwickeln sie sich, unabhängig von Antigenkontakten, im primär lymphatischen Knochenmark (Welsch et al., 2018). Nach dortiger Ausreifung tragen sie Immunglobulinmoleküle an ihrer Oberfläche, die als Antigenrezeptoren, auch B-Zell-Rezeptor (BCR) genannt, fungieren. Nach Einwanderung der naiven B-Zellen in die sekundär lymphatischen Organe, werden dem BCR meist mit Hilfe von Stimulationen durch T<sub>H2</sub>-Helferzellen oder dendritischer Zellen Antigene präsentiert (Welsch et al., 2018). Hierauf erfolgt die Ausdifferenzierung der B-Zellen zur Plasmazelle, welche folglich die Hauptaufgabe der humoralen Immunantwort, nämlich die Antikörperproduktion und -sekretion übernimmt (Welsch et al., 2018). Während naive B-Lymphozyten nur 6-8 $\mu$ m kleine Zellen mit heterochromatinreichen, rundlichen Kern

sind, wachsen sie durch Antigenkontakt zu größeren Zellen mit heller Kernstruktur (Welsch et al., 2018). Ihre Weiterentwicklung zu Plasmazellen zeigt sich morphologisch in einer ovalen Zellstruktur mit einem charakteristischen exzentrischen Zellkern, mit typischen Chromatinmuster und zentralem Nukleolus (Welsch et al., 2018). Immunhistochemisch gelingt der Nachweis von B-Zellen durch das ubiquitär, auf allen Stadien der B-Zellen vorkommende Oberflächenprotein CD19 und CD20 (Scheuermann und Racila, 1995; Wang et al., 2012; Kläsener et al., 2021).

Im Rahmen der zunehmend auf das Immunsystem fokussierenden Tumorforschung konnte festgestellt werden, dass B-Zellen die zweithäufigsten Lymphozyten innerhalb des Tumorgewebes darstellen, wodurch eine zentrale Rolle bei der Modulation der Antitumor-Antwort angenommen wird (Yuen et al., 2016). Von B-Lymphozyten produzierte tumorreaktive Antikörper können durch Aktivierung des humoralen Immunsystems die (Weiter-)Entwicklung des Tumors verhindern. Die produzierten Antikörper werden von dendritischen Zellen präsentiert und aktivieren sowohl das Komplementsystem, natürliche Killerzellen, MΦ sowie die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> -T-Zellen (Yuen et al., 2016). Obwohl Antikörper gegen Tumorantigene zahlreich im Serum von Krebspatienten nachgewiesen werden konnten (Reuschenbach et al., 2009), bleibt unklar, ob dieses eine ausreichende B-Zell-Antwort gegen den Tumor bedeuten (Yuen et al., 2016; Largeot et al., 2019). Dennoch konnten Carni et al. im allogenen Tumorabstoß-Mausmodell demonstrieren, dass von B-Zellen produzierte Antikörper im frühen Tumorstadium dendritische Zellen aktivieren, welche daraufhin eine zytotoxische T-Zellen Antwort generieren und somit das Tumorstadium inhibieren (Carni et al., 2015). Andererseits induzieren von B-Zellen produzierte Antigene, welche sich zu einem zirkulierendem Immunkomplex formieren, chronische Inflammation und begünstigen somit das Tumorstadium (Visser et al., 2005; Andreu et al., 2010). Darüberhinaus ist neben der Antikörperproduktion eine Lymphotoxin-Produktion von reifen B2-Zellen beschrieben, welche verantwortlich für die Entstehung eines kastrationsresistenten PCas sein soll (Ammirante et al., 2010).

Die paradoxe Wirkung von B-Zellen auf Tumorgewebe, zeigt sich auch in der Expression von PD-1 auf B-Lymphozyten. Neben T-Zellen werden auch sie durch den Immuncheckpoint-Inhibitor inaktiviert und tragen somit zur Immunevasion des Tumors bei (Thibault et al., 2013; Okazaki et al., 2001). Weitere pro-kanzerogene Aktivitäten werden insbesondere den regulatorischen B-Zellen (Bregs) zugeschrieben, deren Hauptfunktion die Produktion der suppressiven Zytokine IL-10, IL-35 and TGF-β darstellt (Sarvaria et al., 2017; Tao et al., 2015; Schwartz et al., 2016). Linder et al. beschrieben, dass einige Bregs (u.a. CD19<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD1d<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>, CD147<sup>+</sup>) in mehreren Tumorgeweben, darunter auch im PCa, durch die IL-10 und TGF-β Sekretion, nicht nur die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen Proliferation unterdrücken, sondern auch die FoxP3 Expression in Tregs induzieren (Lindner et al., 2013). Im HCC-Mausmodell konnte hierfür eine Interaktion zwischen PD-L1 auf Bregs und PD-1 auf T-Zellen



gezeigt werden (Shalapour et al., 2017). Ob dieses auch auf das PCa übertragbar ist, wurde bislang nicht beschrieben. Allerdings konnten in intra-tumoralen Regionen von Prostatektomie-Präparaten eine höhere Dichte von B-Lymphozyten nachgewiesen werden als in extra-tumoralen Bereichen (Woo et al., 2014). Neueste Daten von Roya et al. zeigen ein vermehrtes Auftreten von IL-10 und CD19<sup>+</sup> B Zellen in PCa im Vergleich zur BPH und suggerieren somit eine Korrelation zwischen der Dichte der B-Zellen und der Progression des PCas (Roya et al., 2020). Die paradoxe Wirkung von B-Zellen bedarf jedoch weiteren Untersuchungen, um eine fundierte Aussage über ihre Wirkung im PCa treffen zu können.

## **1.6 Innervation beim PCa und die Rolle bei Metastasierung**

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass sich der Einfluss von Nerven auf die perineurale Wachstumsform von Karzinomen, bei welcher Krebszellen Nervstrukturen umgeben und folglich infiltrieren, beschränkt (Liebig et al., 2009). Magnon et al. zeigten jedoch, dass Nerven nicht nur als Leitstruktur der Krebszellen dienen, sondern darüber hinaus die (Neo-)Innervation wesentlichen Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung des Tumors haben (Magnon et al., 2013). Dieses trifft nicht nur auf das von Magnon et al. untersuchte PCa zu, sondern konnte auch beim Magen- (Zhao et al., 2014; Hayakawa et al., 2017), Pankreas- (Saloman et al., 2016; Renz et al., 2018), und nicht-melanotischen HautCa beobachtet werden (Peterson et al., 2015). Bei der von Magnon et al. durchgeführten Studie, in welcher Mäusen humane PCa-Zellen (PC-3) implantiert wurden, konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation mit Noradrenalin, ausgehend von sympathischen Nervenfasern, die adrenergen Rezeptoren  $\beta_2$  (ADRB2) und  $\beta_3$  (ADRB3) aktiviert werden und diese eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung eines AdenoCa aus der prämaligen PIN einnehmen (Magnon et al., 2013). Bei Durchführung einer chemischen oder chirurgischen Sympathektomie bzw. eine Deletion der ADRB2 und ADRB3 Gene, nahm die Tumorentwicklung ab. Gegenätzlich initiieren cholinerge, parasymphatische Fasern, welche den stromalen, cholinerg-muskarinergen Rezeptor 1 (CHRM1) mittels Acetylcholin stimulieren, die Invasion und Migration von Tumorzellen und fördern Fernmetastasen (Magnon et al., 2013). Die medikamentöse Injektion des non-selektiven cholinergen Agonisten Carbachol induzierte die Proliferation der Krebszellen sowie Lymphknotenmetastasen, während die Antagonisierung durch einen CHRM1-Knockdown bzw. durch den selektiven CHRM1-Antagonisten Pirenzepine die proliferative Wirkung wiederum inhibierte (Magnon et al., 2013). Außerdem zeigte die Analyse der Prostatektomien der Mäuse ein klares Verteilungsmuster der parasymphatischen Nervenfasern innerhalb des Tumors, wohingegen die sympathischen Nervenfasern ausschließlich in extratumoralen Bereichen lokalisiert waren. Hierbei wurde darüber hinaus eine Korrelation zwischen der Nervendichte und

der Tumorprogression, insbesondere bei mittel- und höhergradigen Tumoren ( $GS \geq 7$ ) festgestellt (Magnon et al., 2013).

Neuere Untersuchungen suggerieren die Verwendung der sympathischen Nervendichte als unabhängigen Biomarker für das Wiederauftreten eines biochemisches Rezidives nach Prostatektomie zu verwenden, welches die Bedeutung der Innervation für die Progression des PCa unterstreicht (Reeves et al., 2019). Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch adrenerge Signalübertragung von sympathischen Nervenfasern innerhalb des Knochenmarks, ruhende metastasierte Prostatakrebszellen reaktiviert werden (Decker et al., 2017). Erfolgt eine Stimulation des ADRB2 durch cholinerge, sympathische Nervenfasern wird demnach nicht nur die Entwicklung und das Wachstum des primären PCa, sondern auch von Knochenmetastasen beeinflusst (March et al., 2020).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das PCa zählt zu den häufigsten malignen Tumoren und ist in Deutschland als zweithäufigste Krebsentität für einen letalen Krankheitsverlauf verantwortlich. Insbesondere die Metastasierung der Krebszellen resultiert in einer schlechteren Prognose, wodurch die Erforschung ihrer zellulären Grundlagen von zentralem wissenschaftlichem und gesellschaftlichem Interesse ist. In der Grundlagenerforschung des PCa ist in den letzten Jahren das Zytokin GDF-15/MIC-1, welches der TGF- $\beta$  Superfamilie angehört, in den Fokus vieler Forschungen gerückt. Während für das PCa eine Überexpression von GDF-15 gezeigt werden konnte, ist die zelluläre Rolle des Zytokins bei der Metastasierung weiterhin nicht eindeutig. Sowohl die Beteiligung an der Inhibierung der Karzinogenese in frühen Tumorstadien als auch an der Progression des Tumors und der Entwicklung von Metastasen in fortgeschrittenen Stadien wurde beschrieben.

Der Sentinel-Lymphknoten (Wächterlymphknoten) ist der erste Lymphknoten, der im Abflussgebiet eines Tumors liegt und über eine eigene Lymphbahn verfügt.

In diesem Zusammenhang werden in dieser Arbeit die Lymphknoten von PCa-Patienten mit GS6, GS7, GS9 auf das Vorkommen von GDF-15 untersucht. Sollte ein Vorkommen von GDF-15 im Lymphknoten von PCa-Patienten bestätigt werden, würde die Bedeutung von GDF-15 als prognostischer Biomarker zunehmen, welcher die Bösartigkeit des PCa und die damit verbundene Metastasierungs-kapazität des Tumors vorhersagen kann.

Des Weiteren spielt bei der Entstehung von Karzinomen und deren Metastasierung das Immunsystem eine entscheidende Rolle. In dieser Arbeit werden wichtige Vertreter des angeborenen Immunsystems, M1-M $\Phi$  und des erworbenen Immunsystems, B-Lymphozyten, genauso wie das Immuncheckpoint Molekül PD-L1 in Abhängigkeit der GS analysiert.

Während bereits aus Forschungen der letzten Jahre bekannt ist, dass die (Neo-)Innervation eines Tumors dessen Wachstum fördert, wurde erst kürzlich bekannt, dass ebenso die Metastasierung initiiert werden kann. Inwieweit demnach eine (Neo-)Innervation in den Lymphknoten der PCa-Patienten vorliegt, welche zur Progression des Tumors beiträgt, wird in dieser Arbeit durch die Identifizierung von Nervenfasern in Abhängigkeit der GS vorgenommen.

## 2. Materialien

### 2.1 Humane Gewebeproben

Die verwendeten Lymphknoten wurden dem Institut der Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg von der Urologie des Universitätsklinikum Gießen und Marburg zur Verfügung gestellt. Die Lymphknoten wurden im therapeutischen Rahmen einer Lymphadenektomie beim PCa entnommen, formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Die Verwendung des Prostata- und Lymphknotengewebes wurde von der zuständigen Ethik-Kommission geprüft und genehmigt. (Az: Studie 95/15)

#### 2.1.1 Lymphknoten-Präparate

Insgesamt wurden 7 Lymphknoten verwendet. Ihnen wurden Präparats-Nummern zugeordnet. Anhand dieser können sie zu dem jeweiligen Prostata-Präparat zugeordnet werden (s. Anhang 7.1.5). Die Einteilung der entsprechenden PCa-Proben nach TNM-Klassifikation und nach der histopathologischen Klassifikation gemäß Gleason-Scores wurde von Herrn Dr. Rexin, Facharzt für Pathologie am Universitätsklinikum Giessen und Marburg durchgeführt (Epstein et al., 2016; Epstein et al., 2017).

Zur Etablierung von immunhistochemischen Färbeprotokollen, sowie als Positiv- und Negativkontrolle wurden PCa- und Plazentapräparate verwendet, welche dem Institut der Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg zur Verfügung standen (s. Anhang 7.1.6).

### 2.2 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase	Agilent Technologies, Santa Clara, USA.
AffinityScript RT 10x Buffer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA.
Agarose	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland.
Ammonium-Nickel(II)-sulfat Hexahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland.
Chlorwasserstoff (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Citronensäure-Monhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Dithiothreitol (DTT); 100 mM	Agilent Technologies, Santa Clara, USA.
dNTP-Mix; 100 mM	Agilent Technologies, Santa Clara, USA.
Eosin-G-Lösung 0,5 % wässrig	Merck, Darmstadt, Deutschland.
Ethanol 99,9%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
GelRed Nucleic Acid Stain 10000X Water	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Human RNA-Standard-Pool (QPCR Reference Total RNA); 1 µg/µl	Agilent Technologies, Santa Clara, USA.
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Kaiser's Glycerol Gelantine	Merck, Darmstadt, Deutschland.
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland.
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland.
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
O'GeneRuler Low Range DNA Ladder (Gel-Standard-Leiter)	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland.
Orange DNA Loading Dye (6x) (Gelproben-Färbelösung)	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland.
ProstataCA Standard RNA Pool	Institut für Anatomie und Zellbiologie, Marburg, Deutschland
RNase-Inhibitor (RiboLock); 40 U/µl	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland.
Roti-Block	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Trypsin (Pankreasperoxidase)	Merck, Darmstadt, Deutschland.
Tween-20	Serva, Heidelberg, Deutschland.
Wasserstoffperoxid (30%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.

## 2.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Herstellung
0,02M Tris-NaCl-Puffer; pH 8,2	19,8mM Tris + 154mM NaCl in 1000ml Analyse-H <sub>2</sub> O, pH: 8,2 eingestellt mit HCl
0,05M Tris-HCl-Puffer; pH 7,8	0,05M Tris + 0,15M NaCl + 9mM CaCl <sub>2</sub> in 1000ml Analyse-H <sub>2</sub> O pH: 7,8 eingestellt mit HCl
2M Tris-HCl-Lösung	2M Tris in Analyse-H <sub>2</sub> O pH: 7,5 mit HCl eingestellt
5M NaCl-Lösung	5M NaCl in Analyse-H <sub>2</sub> O
Blockierungslösung: 5-, 1-, 0,5 % [w/v] bovine serum albumin (BSA)- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	BSA in PBS-Puffer
Blockierungslösung: 5-, 1-, 0,5 % [w/v] bovine serum albumin (BSA)-Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	BSA in TBS-Puffer
Ethanol 98-, 70-, 50% [v/v]	98-, 70-, 50% Ethanol in Analyse-H <sub>2</sub> O
Natriumcitrat-Lösung	0,01 M Natriumcitrat - Dihydrat in Analyse- H <sub>2</sub> O
Natriumcitratpuffer: pH 6,0	1,8 % [v/v] Zitronensäure - Lösung + 8,2 % [v/v] Natriumcitrat - Lösung in Analyse-H <sub>2</sub> O. pH 6,0 eingestellt mit Natronlauge
Natronlauge (NaOH)	1 M Natronhydroxid in Analyse-H <sub>2</sub> O
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)-Puffer, pH 7,45	149mM NaCl + 4mM KCl +7,87mM di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat + 1,5mM Kaliumdihydrogenphosphat in 1000ml Analyse-H <sub>2</sub> O, pH 7,45 eingestellt mit Natronlauge
Roti-Block 50% [v/v]	50% Roti-Block in PBS

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herstellung</b>
Salzsäure 37 % [v/v]	37 % Chlorwasserstoff (HCL) in Analyse-H <sub>2</sub> O
Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer): TBE-Stammlösung (5-fach)	0,45M Tris +0,45M Borsäure + 20ml EDTA-Lösung (0,5M, pH 8,0) in 1000ml Analyse-H <sub>2</sub> O
TBS/0,1% Tween-20 (TBS-T)	0,1% Tween-20 in TBS
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	20mM Tris + 137mM NaCl in 1000ml Analyse-H <sub>2</sub> O pH: 7,6 eingestellt mit HCl
Tris/HCl-NaClPuffer (TN-Puffer)	0,03% [v/v] 5M NaCl + 0,05% [v/v] 2M Tris-HCl in Analyse-H <sub>2</sub> O
Trypsin-Lösung, 0,15% [w/v]	0,15% Trypsin in 0,05M Tris-HCl-Puffer
Zitronensäure-Lösung	0,1 M Zitronensäure - Monohydrat in Analyse-H <sub>2</sub> O

## 2.4 Kits

Tabelle 4: Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Substrate Kit mit stabilem Peroxid-Substratpuffer	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland.
Avidin-Biotin-Blocking-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA.
SIGMAFAST Fast Red TR/Naphtol AS-Mix; (Fast Red)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
SignalStain Antibody Diluent	Cell Signaling Technology, Danvers, USA.
SignalStain EDTA Unmasking Solution (10x)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA.
totalRNA FFPE XS-Kit (NucleoSpin)	Machery-Nagel, Düren, Deutschland.
Trypsin-EDTA (0.05 %) in DPBS (1x)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland
TSA Biotin Stand Alone Tyramide Kit	PerkinElmer Inc., Waltham, USA.
VECTASTAIN <sup>®</sup> ABC-Alkaline Phosphatase Kit Series	Vector Laboratories, Burlingame, USA.
VECTASTAIN <sup>®</sup> Elite ABC-Peroxidase Kit Series	Vector Laboratories, Burlingame, USA.

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Primärantikörper

Tabelle 5: Primärantikörper

Beschreibung	Bezeichnung	Verdünnung	Katalog-Nr., Hersteller
Monoklonaler AK - Maus anti human CD19 (Klon: LE-CD19)	ms-anti-hu_CD19	1:50	MCA2454T, AbD Serotec / Bio-Rad, Hercules, USA
Monoklonaler AK - Maus anti human CD68 (Klon PG-M1)	Ms-anti-hu_CD68	1:100	M0876, Dako, Glostrup, Denmark
Monoklonaler AK - Ratte anti human GDF-15	rat-anti-hu_GDF-15	1:50	ab189358, Abcam, Cambridge, UK
Polyklonaler AK - Kanninchen anti human PGP 9.5	rb-a-hu_PGP 9.5	1:100	CL7755AP, Cedarlane, Burlington, Canada
Monoklonaler AK - Kanninchen anti human PD-L1	rb-a-hu_PD-L1	1:200	#13684, Cell Signaling Technology, Danvers, USA

### 2.5.2 Sekundärantikörper

Tabelle 6: Sekundärantikörper

Beschreibung	Bezeichnung	Verdünnung	Katalog-Nr., Hersteller
Polyklonaler Esel anti-Ratte (IgG H+L) AK, Biotin-SP-konjugiert	do-a-rat_biot.	1:100	712-065-153, Jackson, West Grove, USA
Polyklonaler Esel anti-Kanninchen (IgG H+L) AK, Biotin-SP-konjugiert	do-a-rb_biot.	1:500 (PGP9.5) 1:400 (PD-L1)	711-065-152, Jackson, West Grove, USA
Polyklonaler Kaninchen anti-Maus (IgG H&L) AK, alkalische Phosphatase konjugiert	rb-anti-ms_AP	1:100	ab7077 Abcam, Cambridge, UK.

## 2.6 Primer

### 2.6.1 Reverse Transkription (cDNA-Synthese Primer)

Tabelle 7: cDNA-Synthese Primer

Bezeichnung	Hersteller
Oligo-(dT) <sub>12-18</sub> Primer; 0,5 µg/µl	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland.



Bezeichnung	Hersteller
Random Primer; 0,5µg/µl	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland.

## 2.6.2 Quantitative RT-PCR Primer

Tabelle 8: Quantitative RT-PCR Primer

Beschreibung	Bezeichnung	Amplikonlänge	GeneGlobe ID
CD274 Molecule (Programmed Death Ligand 1)	PD-L1 (CD274)	72 bp	QT00082775
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	GAPDH	119 bp	QT01192646
Growth Differentiation Factor 15	GDF-15	114 bp	QT00082558
Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	HRPT1	130 bp	QT00059066
Keratin 20	KRT20	114bp	QT00014784
TATA-box-binding Protein	TBP	132 bp	QT00000721
Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1	PGP9.5 (UHCL1)	110 bp	QT00092666

Hersteller von allen verwendeten RT-PCR Primern war die Firma Qiagen, Venlo, Niederlande.

## 2.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Analyse-H <sub>2</sub> O	Leitungswasser gefiltert mit Aufbereitungssystem Barnstead GenPure xCad; Thermo Scientific, Waltham, USA.
Deckgläser (24 x 32mm)	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Eindeckmedium: Roti-Histokitt II (für hydrophobe Präparate) Kaisers Glyceringelantine (Glyceringelantine) (für wasserhaltige Präparate) Eukitt Quick-hardening mounting medium (für hydrophobe Präparate)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Objektträger Super Frost Plus™ Adhäsionsobjektträger	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pipettenspitzen	Brand, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Sarsted, Nümbrecht, Deutschland.
Zellkulturplatte, 96 Well	Sarsted, Nümbrecht, Deutschland.

## 2.8 Geräte

Tabelle 10: Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
E-Box-System (Gel-Dokumentationssystem)	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland.
IKAMAG Typ RCT Magnetrührer mit Heizplatte	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
Inkubator	WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland
Magnetrührer Heidolph MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland.
Mikroskop-Kamera Axio Cam HRc	Carl Zeiss, Jena, Deutschland.
Mikroskope: Axio Imager: M2 Mikroskop (Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskop)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Standard-Lichtmikroskop Olympus CX21	Carl Zeiss, Jena, Deutschland Olympus, Shinjuku, Japan
Mikrotome: Microm HM325 (Rotationsmikrotom) Microm HM400R (Schlittenmikrotom)	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland. Microm, Heidelberg, Deutschland.
NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
pH-Meter	Knick, Berlin, Deutschland Mettler Toledo, Columbus, USA
QPCR-Thermocycler Stratagene Mx3005P	Agilent Technologies, Santa Clara, USA.
Saugpumpe	KNF Neuberger, Reiden, Schweiz
Thermo-shaker PHMT	Grant Instruments, Cambridge, UK.
Thermocycler MJ Research PTC-200	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland.
Vortexer	Cenco, Chicago, USA IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
Waage	Ohaus, Naenikon, Schweiz
Wärmeplatte	STÖRK-TRONIC, Störk GmbH & Co. KG, Stuttgart, Deutschland

## 2.9 Software

Tabelle 11: Software

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Axio Vision (Rel4.8) (Mikroskop-Kamera-Software)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland.
Fiji-Image J	National Health Institute (NIH), USA. ( <a href="https://imagej.net/Fiji/Downloads">https://imagej.net/Fiji/Downloads</a> )
Gimp 2.10 (GNU Image Manipulation Program)	The GIMP Development Team
LibreOffice (Vers. 6.4.2.2) (Tabellenkalkulationsprogramm)	The Document Foundation, Berlin, Deutschland.
QPCR-Software MXPro	Agilent Technologies, Santa Clara, USA.
Zotero (Literaturverwaltungsprogramm)	Roy Rosenzweig Center for History and New Media der George Mason University, USA.

## **3. Methoden**

### **3.1 Anfertigung der Schnittpräparate**

#### **3.1.1 Anfertigung der Schnittpräparate mittels Rotationsmikrotom**

Die Paraffinblöcke der Lymphknoten-Präparate wurden mit einem Schlittenmikrotom der Firma Microm (HM400R) in Serie geschnitten. Hierbei wurden 25 Serienschnitte (je 5-7µm) angefertigt, die dann in zwei Wasserbäder mit Analyse-H<sub>2</sub>O überführt (Raumtemperatur bzw. 30-40°C), um eine Streckung der Schnitte zu erwirken. Danach erfolgte die Überführung auf durchnummerierte SuperFrost Plus Objektträger. Diese wurden gewählt, um eine permanente Haftung der Schnitte am Objektträger zu gewährleisten. Die OT inkl. Schnitte wurden dann in einem Inkubator (zuerst für 2h bei 37°C und danach bei 50°C über Nacht) getrocknet.

#### **3.1.2 Anfertigung der Schnittpräparate mittels Schlittenmikrotom**

Zur Positiv- und Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung, zur Etablierung der Methoden und zur molekularbiologischen Expressionsanalyse wurden Prostata- und Plazentapräparate herangezogen. Die Schnitte (5µm) wurden mit einem Schlittenmikrotom angefertigt. Die Streckung der Schnitte erfolgte im Auffangbecken (45°C, entgastes Analyse-H<sub>2</sub>O), woraufhin sie auf SuperFrost Plus Objektträger gezogen werden konnten. Das Trocknen erfolgte auf einer Wärmeplatte (40°C) sowie im Inkubator (60°C, über Nacht).

## **3.2 (Immun)Histochemische Färbungen**

### **3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) stellt die wichtigste Färbemethode der Übersichtsfärbungen in der Histologie dar. Sie ist nicht nur schnell und einfach anzuwenden, sondern liefert ebenfalls gute und aussagekräftige Übersichtsbilder des Gewebes.

Ziel dieser Färbemethode ist die Unterscheidung der wichtigsten Strukturen eines Gewebes, welches durch die unterschiedlichen Affinitäten der Farbstoffe zu den Gewebsbestandteilen möglich wird. Diesem Prinzip liegt zugrunde, dass negativ geladene Zellbestandteile basische Farbstoffe wie Hämatoxylin aufnehmen, wohingegen positiv geladene Zellbestandteile, wie das Cytoplasma, saure Farbstoffe absorbieren. (Lüllmann-Rauch, 2019).

Bei der HE-Färbung stellt Hämatoxylin (auch: Hämalan) den positiv geladenen Kernfarbstoff dar, während Eosin als negativ geladener Farbstoff fungiert, der das Cytoplasma anfärbt. Hämatoxylin ist jedoch eine Farbvorstufe. Zur Färbung des Zellkernes bedarf es zunächst einer Oxidation von Hämatoxylin zum färbenden Hämatein. Dieses erreicht man entweder durch stehen lassen an Luft (natürliche Reifung) oder durch Zugabe von Oxidationsmitteln (künstliche Reifung), wie es im

sauren Hämalaun nach Mayer der Fall ist. Hier wird zwecks Oxidation Natriumiodat hinzugefügt. Dadurch entsteht Hametein. Dieses bildet mit Aluminiumionen einen jetzt positiv geladenen, basischen Farbstoff, das Hämalaun. Da die Phosphatgruppen der Nucleinsäuren im Zellkern negativ geladen sind, lagert sich das Hämalaun an diese an und bildet schwer lösliche Verbindungen. Für eine selektive Anfärbung der Kerne sorgt Zitronensäure. Diese bedingt, dass Hämalaun in saurer Lösung vorliegt und sättigt die negativ geladenen Carboxylgruppen des Cytoplasmas ab, sodass diese nicht mehr angefärbt werden können. Das Hämalaun bewirkt eine typisch blau-violette Färbung der Zellkerne.

Die meisten Proteine im Cytoplasma sind negativ geladen. Jedoch liegt Eosin in leicht saurer Lösung vor und kann daher dem Cytoplasma positiv geladene H<sup>+</sup>-Ionen abgeben. Somit kann sich das negative Eosin gut an die positiv geladenen Proteine des Cytoplasmas und an extracytoplasmatische Strukturen, wie z.B. Kollagen anlagern und färbt diese rötlich. (Mulisch et al., 2015)

In der vorliegenden Arbeit wurde die HE-Färbung eingesetzt, um einen Überblick über die Gewebsstrukturen der Lymphknoten zu bekommen. Hierfür wurde jeder 10. Serienschnitt angefärbt (Ebenen 1, 10, 20).

Um dem Farbstoff den Kontakt mit dem Gewebe zu ermöglichen, müssen die Schnitte zunächst entparaffiniert werden. Dieses geschieht durch dreimaliges Waschen der Schnitte im Lösungsmittel Xylol für 5 Minuten (Min). Damit die Schnitte an die Bedingungen, der bei der Darstellungstechnik verwendeten wässrigen oder alkoholischen Lösungen, angepasst werden, müssen diesen schrittweise Alkohol entzogen und Wasser hinzugeführt werden (Mulisch et al., 2015). Hierzu werden die Objektträger dreimal für 5 Min in absolutem Isopropanol inkubiert. Danach folgt eine Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe (96%-, 70%-, und 50%-iges Äthanol). Die Inkubationszeit beträgt jeweils 5 Min. Dann werden die Schnitte für 5 Min in Analyse-H<sub>2</sub>O überführt. Anschließend folgt die Färbung der Zellkerne mit Hämalaun nach Mayer (5 Min). Danach erfolgt das Bläuen in 20-25°C kaltem Leitungswasser (mindestens 15 Min). Dieses bezweckt einen Anstieg des pH-Werts, welches die Färbung des Zellkerns von braun-rot auf violett-blau umschlagen lässt.

Hiernach erfolgt die Eosin-Färbung des Cytoplasmas, wofür die Schnitte 1 Min im Eosin lagerten. Damit dieses in saurer Lösung vorliegt, werden zuvor 4 Tropfen (ca. 0,5ml) Essigsäure auf 200ml Eosin hinzugefügt. Es folgt eine kurze Waschung (10 sek) in Analyse-H<sub>2</sub>O. Damit das Eosin wieder entzogen wird, werden die Objektträger nun in 96%-igem Äthanol gelagert. Zwecks Dehydrierung schließt sich eine dreimalige Lagerung in absolutem Isopropanol für je 5 Min an. Um den Alkohol wieder zu entfernen, werden die Schnitte daraufhin dreimal je 5 Min in Xylol gelagert. Abschließend erfolgt eine Eindeckung mit einem Eindeckmedium auf Xylolbasis. Hierfür wurde das Roti-Histokitt gewählt. Zum Trocknen der Schnitte und

Konservierung der Färbung wurden die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

### 3.2.2 Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Mit einer immunhistochemischen Färbung ist der spezifische Nachweis und die genaue Lokalisation von Makromolekülen (Proteine, Polysaccharide, Lipide, Nucleinsäuren, etc.) in einer Zelle möglich (Mulisch et al., 2015). Grundlage hierfür ist das Antigen-Antikörper-Prinzip.

Antikörper sind Teil der Proteinfamilie der Immunglobuline, welche man je nach Größe, Molekulargewicht, Struktur und Funktion in fünf Klassen unterteilt: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Zur Immunmarkierung werden hauptsächlich Antikörper der IgG- und IgM-Klasse verwendet, wobei ein IgM-Molekül aus 5 IgG-ähnlichen Molekülen aufgebaut ist, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Das Antigen im Gewebe wird von der Antigenbindungsstelle des Antikörpers erkannt. Gebildet wird diese durch die variablen Regionen der schweren und leichten Kette. Für die Bindung ist oftmals nur eine Sequenz aus wenigen Aminosäuren, die sog. hypervariable Region verantwortlich. (Mulisch et al., 2015)

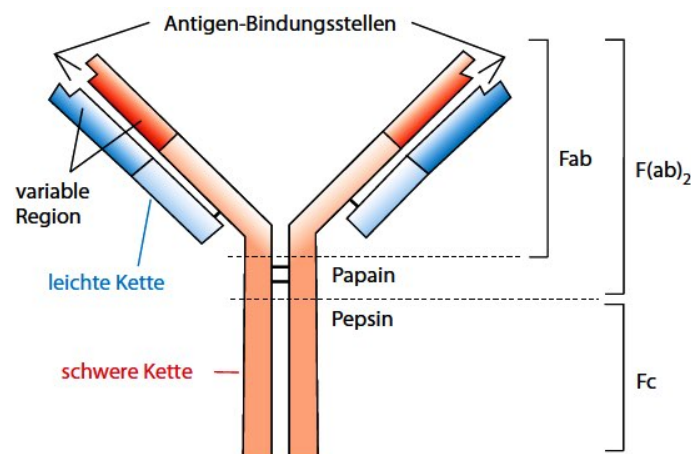


Abbildung 10: Schema eines IgG-Moleküls

Ein IgG-Molekül hat einen Y-förmigen Aufbau, bestehend aus mehreren Fragmenten. Durch die Proteasen Papain und Pepsin kann das Molekül in seine Einzelteile zerlegt werden: Die Fc-Fraktion (crystalline fraction oder constant fraction) wird durch den langen Arm der schweren Kette gebildet, die F(ab)<sub>2</sub>-Fraktion besteht aus zwei zusammenhängenden kurzen Armen und die Fab (Fab: antibody binding fraction) aus einzelnen kurzen Armen. Die Antigenbindungsstelle wird aus den variablen Regionen des Fab-Teils gebildet. (Mulisch et al., 2015).

Das Gewebe, in dem das Epitop, auch antigene Determinante genannt, nachgewiesen werden soll, wird mit einer Lösung inkubiert, in der ein spezifischer Antikörper gegen das Antigen enthalten ist. Der Antikörper kann dort, wo das Antigen

vorkommt, sprich in der Zelle oder im extrazellulären Raum, an dieses binden. Nach einer weiteren Kopplung mit einem Enzym-markierten-Antikörper, kann diese Reaktion visualisiert und das Antigen nachgewiesen, werden (Welsch et al., 2018).

Hierbei können monoklonale oder polyklonale Antikörper verwendet werden. Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen B-Zellklonen eines immunisierten Tieres produziert und reagieren spezifisch mit verschiedenen Epitopen eines Antigens. Dahingegen sind monoklonale Antikörper nur gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet und erkennen dieses auch spezifisch. (Mulisch et al., 2015) In der vorliegenden Arbeit werden beide Varianten eingesetzt.

Bevor der Antikörper jedoch an sein Antigen binden kann, muss sein Epitop frei zugänglich gemacht werden. Das Epitop des Antigens kann durch die Fixierung, Dehydrierung und Paraffineinbettung stark verändert worden sein, was dazu führen kann, dass der Antikörper das Epitop nicht erkennt und es zu schwachen oder keinen Signalen kommt. Zunächst muss das Gewebe dafür entparaffiniert und rehydriert werden (vgl. 3.2.1. Hämalaun-Eosin Färbung). Außerdem wurden verschiedene Demaskierungsmethoden entwickelt, die das Antigen oder die Bindungsstellen der Antikörper (sog. Epitope) von anhaftenden Proteinen oder anderen demaskierenden Substanzen befreien oder die dreidimensionale Struktur des Antigens verändern und dadurch Epitope aus dem Inneren des Moleküls an die Oberfläche bringen, sodass der Antikörper diese wieder erkennen kann (Mulisch et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurden enzymatische Demaskierungen mit Trypsin und Antigenemaskierungen durch Erhitzen in Citrat (pH 6,0-6,5) - oder EDTA-Puffer (pH 8,5-9,0) durchgeführt.

Nachdem die Epitope freigelegt wurden, soll eine Proteinblockierung unspezifische Bindungen, die zu einer unerwünschten Hintergrundmarkierung führen, verhindern. Eine unspezifische Bindung ist auf Objektträgern, auf Schnitten und im Gewebe durch Adsorption an Oberflächen, Anlagerungen an hydrophobe oder geladene Bereiche im Gewebe, Bindung an Fc-Rezeptoren und unspezifische Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und Proteinen im Gewebe möglich (Mulisch et al., 2015). Zur Verhinderung der unspezifischen Bindung, wurden in dieser Arbeit die Proteinblockierungs-Lösungen Roti-Block und Rinderserumalbumin (bovines serum albumin, BSA) eingesetzt.

Nach der Demaskierung und Proteinblockierung kann der Antikörper spezifisch an das Antigen im Gewebe binden. Bei der Immunmarkierung unterscheidet man zwei Techniken: die direkte Immunmarkierung und die indirekte Immunmarkierung. Bei der indirekten Methode kommt ein weiterer Sekundärantikörper zum Einsatz, wobei dieser mit einer Substanz bzw. Marker gekoppelt ist. Der Sekundärantikörper stammt aus einer anderen Tierart, welches IgG gegen das Wirtspezies des Primärantikörpers herstellt. Er bindet an die Fc-Region des Primärantikörpers. Ein wesentlicher Vorteil der indirekten Immunmarkierung besteht in der Möglichkeit der Signalverstärkung, da

mehrere Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden können. (Mulisch et al., 2015)

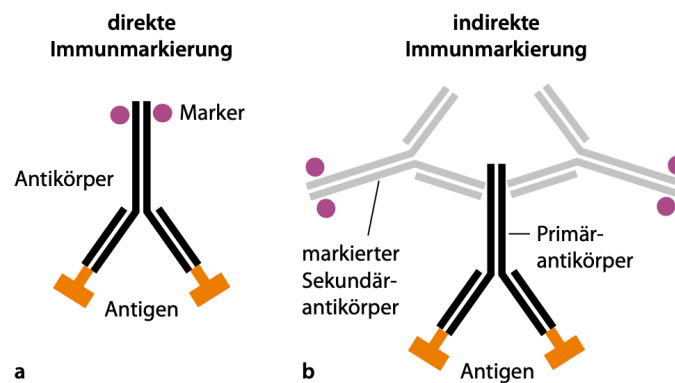


Abbildung 11: Direkte und indirekte Immunhistochemie (IHC)

a: ein enzymmarkierter Primärantikörper reagiert direkt mit dem Antigen im Gewebe. b: ein enzymmarkierter Sekundärantikörper bindet spezifisch an einen Primärantikörper, der mit einem Antigen im Gewebe reagiert (Mulisch et al., 2015).

Bei der Auswahl der Antikörper ist zu beachten, dass der Primärantikörper nicht aus der gleichen Tierart stammt, wie das zu markierende Gewebe. Dies würde einen starken, unspezifischen Hintergrund verursachen, da der Sekundärantikörper, der gegen die Spezies gerichtet sein muss, in dem der Primärantikörper produziert wurde, an die endogene IgG des Präparates binden würde. (Mulisch et al., 2015)

Da jedoch nicht jede Immunmarkierung zu ausreichend starken Signalen führt, bedarf es der Signalamplifikation durch Signalverstärkungsmethoden. In der vorliegenden Arbeit kam es zum Einsatz der (Strept-)Avidin-Biotin-(ABC-)Technik, sowie der Tyraminkatalysierten Signalverstärkung.

Die (Strept-)Avidin-Biotin-(ABC-)Technik beruht hierbei auf einer Komplexbildung von Avidin und Biotin. Avidin hat eine hohe Affinität zu Biotin, da das Avidinmolekül vier Bindungsstellen für Biotin besitzt und bildet nach Mischung der beiden Komponenten einen Komplex. Außerdem wird bei dieser Methode ein biotinylierter Sekundärantikörper (bei direkter Immunmarkierung ein biotinylierter Primärantikörper) eingesetzt. Nachdem der Sekundärantikörper an den Primärantikörper gebunden hat, wird der ABC-Komplex hinzugefügt, woraus resultiert, dass der Avidin-Biotin-Komplex an den biotinylierten Sekundärantikörper binden und diesen markieren kann. Durch diese sensitive Methode kann das Antigensignal um ein Vielfaches verstärkt werden und die Antikörperkonzentration herabgesetzt werden. (Mulisch et al., 2015)



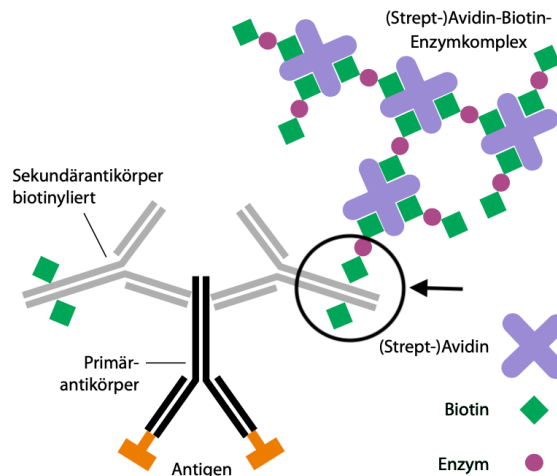


Abbildung 12: Schema der ABC-Technik

Der Pfeil (schwarz) zeigt auf den gebildeten (Strept-)Avidin-Biotin-Enzymkomplex. An der umkreisten Stelle bindet der Komplex an den biotinylierten Sekundärantikörper. (Mulisch et al., 2015, verändert)

Vor Bindung des biotinylierten Antikörpers, muss jedoch auch bei der (Strept-)Avidin-Biotin-Methode das endogene Biotin, welches als Vitamin in mehreren Geweben (z.B. Leber, Niere und Hirn) vorkommt, blockiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür das Avidin-Biotin-Blocking-Kit verwendet.

Um die markierten Makromoleküle, welche man nachweisen möchte, sichtbar zu machen bzw. zu detektieren, verwendet man Markersubstanzen. Mögliche Marker der Immunhistochemie (IHC) sind Fluorochrome, Goldpartikel oder Enzyme. Letztere wurden in dieser Arbeit eingesetzt, wobei sie in einem weiteren Schritt durch ein geeignetes Substrat umgesetzt werden müssen, damit sie an der Antikörper-Bindungsstelle ein farbiges, unlösliches Endprodukt bilden. Beim Verwenden von enzymgekoppelten Antikörpern ist das Einhalten von optimalen Inkubationsbedingungen, wie der pH-Wert, essenziell, da die enzymatische Aktivität des Enzyms sehr sensibel reagiert. Außerdem bedarf es einer Blockierung der im Gewebe natürlich vorkommenden Enzyme, da diese sonst falsch-positiv mit dem Substrat des Enzyms reagieren würden.

Die häufigsten verwendeten und auch in dieser Arbeit benutzen Marker sind die Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) und die Alkalische Phosphatase (AP). Bei der Verwendung der HRP, wird die endogene Peroxidase des Gewebes, durch vor der Immunmarkierung im Überschuss eingesetztes Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) blockiert.

Der Farbstoff 3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) wird als Substrat eingesetzt. Nach der Sekundärantikörperbindung wird das Wasserstoffperoxid

enthaltende DAB-Substrat von der Peroxidase umgesetzt, wodurch folglich nach Oxidation durch die Peroxidase ein dunkelbrauner, unlöslicher Niederschlag gebildet wird. Zur Verstärkung der Reaktion entsteht durch Zugabe von Schwermetallsalzen wie z.B. NiO<sub>4</sub>, eine schwarze Färbung.

Endogene Phosphatasen werden bei der Detektion mittels Alkalischer Phosphatase durch Levamisol blockiert. Im verwendeten Fast-Red-Substat ist dieses bereits enthalten und muss somit nicht separat hinzugefügt werden. Bei diesem wässrigen Substrat entsteht nach der Reaktion mit dem Enzym Alkalische Phosphatase eine intensive rot-leuchtende Färbung, welche alkohollöslich ist und folglich nicht entwässert und mit lösungsmittelhaltigen Medien eingedeckt werden darf (Mulisch et al., 2015).

Um ausreichend starke positive Signale zu erhalten, kamen in dieser Arbeit verschiedene Protokolle und teilweise Signalverstärkungen zum Einsatz, welche zuvor in Vorversuchen ermittelt wurden:

Tabelle 12: Übersicht Färbemethoden und Signalverstärkungen

<b>Färbung</b>	<b>Sekundär-AK</b>	<b>Signalverstärkung</b>	<b>Enzym</b>	<b>Substrat</b>
CD19, CD68	AP-konjugierter Sekundärantikörper	-	Alkalische Phosphatase	Fast-Red
GDF-15	biotinylierter Sekundärantikörper	ABC-AP Kit	Alkalische Phosphatase	Fast-Red
PGP 9.5	biotinylierter Sekundärantikörper	ABC-Peroxidase	HRP	DAB
PD-L1	biotinylierter Sekundärantikörper	ABC-Peroxidase, biotyniliertes Tyramid	HRP	DAB

Die Immunmarkierung der CD68- und CD19 positiven Zellen wurde mit einem alkalischen Phosphatase-konjugierten Sekundär-Antikörper durchgeführt, welcher mit der Fast-Red-Methode visualisiert wurde. Ebenfalls leuchtend rot mit dem Fast-Red-Kit gefärbt wurden die GDF-15-positiven Zellen. Deren Signal wurde mittels dem ABC-AP Kit verstärkt, wobei hier die Alkalische Phosphatase und nicht wie bei der PGP 9.5 und PD-L1-Färbung die HRP als Detektionssystem eingesetzt wurde.

Bei der PD-L1 Färbung ist in Kombination mit der ABC-Technik eine weitere Signalverstärkung mittels biotinyliertem Tyramin durchgeführt worden. Die Tyramin-Moleküle werden nach der Immunmarkierung mit dem biotinylierten Sekundärantikörper hinzugefügt. Da die Tyraminmoleküle biotinyliert sind, lagern sie sich an den Avidin-Biotin-Komplex des Sekundärantikörpers an und können selbst erneut mit einem solchem Komplex markiert werden. Dadurch soll die Peroxidase-

Markierung, welche selbst bereits eine Signalverstärkung darstellt, nochmals verstärkt werden. (Mulisch et al., 2015) Die Visualisierung erfolgt durch Enzymumsetzung der Peroxidase durch DAB.

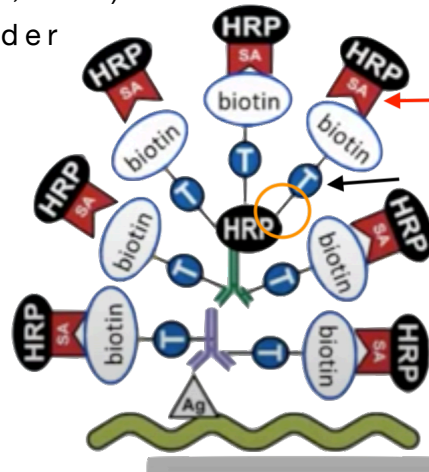


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Signalverstärkung mit biotinyliertem Tyramin

Der Pfeil zeigt auf ein Tyramin-Molekül, welches Biotin gebunden hat. Nach erneuter Zugabe des AB-Komplexes, hat sich ebenfalls am Tyramin ein (Strept-)Avidin-Biotin Komplex gebildet. (roter Pfeil) Die orangene Umrandung zeigt die Verbindung mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, welcher durch ein HRP-Enzym markiert wurde.

(TSA for immunohistochemistry, [https://www.youtube.com/watch?v=wMcYNN9\\_4HQ](https://www.youtube.com/watch?v=wMcYNN9_4HQ), zuletzt aufgerufen am 16.07.22, verändert)

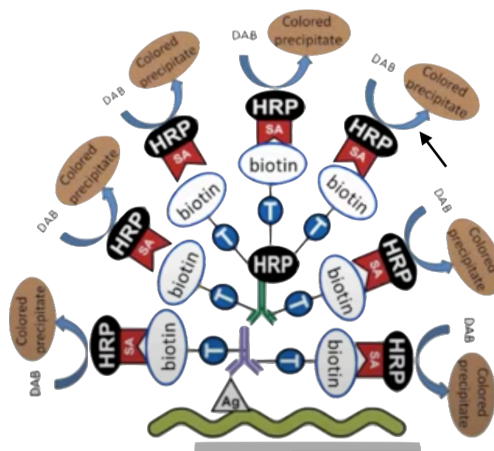


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Visualisierung durch DAB

Der Pfeil zeigt Oxidationsreaktion des DAB durch die HRP. Es entsteht ein farblicher Niederschlag, welcher die Immunreaktion sichtbar macht. (TSA for immunohistochemistry, [https://www.youtube.com/watch?v=wMcYNN9\\_4HQ](https://www.youtube.com/watch?v=wMcYNN9_4HQ), zuletzt aufgerufen am 16.07.22, verändert).

### 3.2.3 Einzelfärbungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Einzelfärbungen mit den Antikörper CD68, GDF-15, PGP9.5, CD19 und PD-L1 an den Lymphknoten-Präparaten durchgeführt. Zur Entparaffinierung der Schnitte wurde bei allen Färbungen anfangs das gleiche Entparaffinierungsprotokoll angewendet:

Tabelle 13: Durchführung und Inkubationszeiten zur Entparaffinierung:

Durchführung	Inkubationszeiten
Entparaffinierung in Xylol	3x15 Min
Entfernung des Xylols in absol. Isopropanol	3x10 Min
Entalkoholisierung in abst. Alkoholreihe (96%-, 70%-, 50% Ethanol)	3x5 Min
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	3x5 Min
Abtrocknen mit Filterpapier	

In Vorversuchen wurde für den jeweiligen Antikörper die effektivste Demaskierungsmethode (hier enzymatisch mittels Trypsin, chemisch mittels Citrat- oder EDTA-Puffer und Hitze) und Antikörperverdünnung ermittelt und etabliert. Die genaue Anwendung der jeweiligen Demaskierungsmethode ist den Protokollen zu entnehmen.

Um die spezifische Bindung der Antikörper sicherzustellen, wurden humane Prostata- und Plazentaproben als Positiv- und Negativkontrolle mit gefärbt.

### 3.2.3.1 CD68 Färbung

Für das Anfärben von CD68 positiven Zellen, M1-MΦ, wurde eine Einzelfärbung mit alkalischer Phosphatase und Fast-Red-Substrat verwendet.

Tabelle 14: Durchführung und Inkubationszeiten der CD68 Färbung

Durchführung	Inkubationszeiten
Entparaffinierte Schnitte	
Waschen in PBS	5 Min
Antigendemaskierung in 0,15%igen Trypsin-Lösung	30 Min bei RT in Feuchtkammer
Waschen in PBS	2x5 Min
Abtrocknen mit Filterpapier	
Inkubation in Roti-Block 5% (1:1 Verdünnung mit PBS)	30 Min bei RT in Feuchtkammer
kurzes Waschen in PBS	
Abtrocknen mit Filterpapier	
Inkubation des Primärantikörper (ms-anti-hu CD68) 1:100 in PBS	über Nacht bei 4-6°C in Feuchtkammer
am nächsten Tag	
Waschen in PBS	3x5 Min

Waschen in 0,02M Tris-Puffer	5 Min
Inkubation des Sekundärantikörpers (rb-anti-mouse_AP) 1:100 in 0,02M Tris-Puffer	60 Min bei RT in Feuchtkammer
Waschen in PBS	3x5 Min
Waschen in 0,02M Tris-Puffer (pH 8,2) zur Anpassung des pH-Wertes	5 Min
Fast-Red-Kit vorbereiten 1. Tris Puffer (SIGMA FAST TRIS BUFFER) aus 1ml Analyse-H <sub>2</sub> O und goldener Tablette herstellen 2. nach vollständigem Auflösen Fast RED/ Naphtol (silber) Tablette hinzugeben	
Abtrocknen mit Filterpapier	
Visualisierung mit Fast-Red-Kit	20 Min bei RT in Feuchtkammer
Stoppen der Reaktion durch Waschen mit Analyse-H <sub>2</sub> O	
Waschen in PBS	2x5 Min
Kerngegenfärbung mit Hämalun nach P. Mayer	
Bläuen der Schnitte auf OT in Leitungswasser	15 Min
Eindecken mit Kaiser's Glycerol Gelatine	

### 3.2.3.2 GDF-15 Färbung

Die immunhistochemische Färbung von GDF-15 wurde anhand folgenden Protokolls durchgeführt:

Tabelle 15: Durchführung und Inkubationszeiten der GDF-15 Färbung

Durchführung	Inkubationszeiten
Entparaffinierte Schnitte	
Antigendemaskierung in 0.05% Trypsin-EDTA in DPBS (1x)	30 Min bei RT in Feuchtkammer
Waschen in PBS	3x5 Min
Abtrocknen mit Filterpapier	
Inkubation in Roti-Block 5% (1:1 Verdünnung mit PBS)	30 Min bei RT in Feuchtkammer
kurzes Waschen in PBS	
Abtrocknen mit Filterpapier	

Inkubation des Primärantikörper (rat_a_hu_GDF-15) 1:50 in PBS	am nächsten Tag	über Nacht bei 4-6°C in Feuchtkammer
Waschen in PBS		3x5 Min
Inkubation des Sekundärantikörpers (do_a_rat biot.) 1:100 in PBS		75 Min bei RT in Feuchtkammer
Waschen in PBS		3x5 Min
Inkubation mit ABC-AP Kit (1:100 in PBS)		30 Min bei RT in Feuchtkammer, zuvor 30 Min reagieren lassen
Waschen in PBS		2x5 Min
Waschen in 0,02M Tris-Puffer (pH 8,2) zur Adaptation des pH-Wertes		5 Min
Fast-Red-Kit vorbereiten 1. Tris Puffer (SIGMA FAST TRIS BUFFER) aus 1ml Analyse-H <sub>2</sub> O und goldener Tablette herstellen 2. nach vollständigem Auflösen Fast RED/ Naphtol (silber) Tablette hinzugeben		
Abtrocknen mit Filterpapier		
Visualisierung mit Fast-Red-Kit		30 Min bei RT in Feuchtkammer
Stoppen der Reaktion mit Analyse-H <sub>2</sub> O		
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O		2x5 Min
Kerngegenfärbung mit Hämalan nach P. Mayer		
Bläuen der Schnitte auf OT in Leitungswasser		15 Min
Eindecken mit Kaiser's Glycerol Gelatine		

### 3.2.3.3 CD19 Färbung

Zur Färbung und Identifizierung der B-Lymphozyten mit dem Antigen CD19 wurde folgendes Protokoll verwendet:

Tabelle 16: Durchführung und Inkubationszeiten der CD19 Färbung

Durchführung	Inkubationszeiten
Entparaffinierte Schnitte	
Antigendemaskierung im Natrium-Citratpuffer	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Erwärmen des Natrium-Citratpuffers für 2 Min bei 600 Watt in der Mikrowelle (ohne OT)</li> <li>2. mit OT: 10 Min bei 360 Watt</li> <li>3. OT 20 Min abkühlen lassen</li> </ol>
Waschen in PBS	3x5 Min

Durchführung	Inkubationszeiten
Abtrocknen mit Filterpapier	
Inkubation in 5% BSA-PBS	30 Min bei RT in Feuchtkammer
kurzes Waschen in PBS	
Abtrocknen mit Filterpapier	
Inkubation des Primärantikörper (ms_a_h_CD19) 1:50 in 1%BSA-PBS am nächsten Tag	über Nacht bei 4-6°C in Feuchtkammer
Waschen in PBS	3x5 Min
Inkubation des Sekundärantikörpers (rb_a_ms_AP) 1:100 in 1% BSA-PBS	60 Min bei RT in Feuchtkammer
Waschen in PBS	2x5 Min
Waschen in 0,02M Tris-Puffer (pH 8,2) zur Adaptation des pH-Wertes	5 Min
Fast-Red-Kit vorbereiten 1. Tris Puffer aus 1ml Analyse-H <sub>2</sub> O und goldener Tablette herstellen 2. nach vollständigem Auflösen Fast RED/ Naphtol (silber) Tablette hinzugeben	
Visualisierung mit Fast-Red-Kit	22 Min bei RT in Feuchtkammer
Stoppen der Reaktion mit Analyse-H <sub>2</sub> O	
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	2x5 Min
Kerngegenfärbung mit Hämalun nach P. Mayer	
Bläuen der Schnitte auf OT in Leitungswasser	15 Min
Eindecken mit Kaiser's Glycerol Gelatine	

### 3.2.3.4 PGP 9.5 Färbung

Zur immunhistochemischen Färbung von Nervenfasern wurde die Markierung mit dem Antikörper PGP 9.5 (Protein Gene Product 9.5) gewählt:

Tabelle 17: Durchführung und Inkubationszeiten der PGP 9.5 Färbung

Durchführung	Inkubationszeiten
Entparaffinierte Schnitte	
Blockierung der endogenen Peroxidase mit 0,15% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 Min, lichtunempfindlich aufbewahren

Durchführung	Inkubationszeiten
Proteindemaskierung im Natrium-Citratpuffer	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Erwärmen des Natrium-Citratpuffers für 2 Min bei 600 Watt in der Mikrowelle (ohne OT)</li> <li>2. mit OT: 10 Min bei 360 Watt</li> <li>3. OT 20 Min abkühlen lassen</li> </ol>
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	2x5 Min
Abtrocknen mit Filterpapier	
Proteinblockierung durch Inkubation in 5% BSA-PBS	30 Min bei RT in Feuchtkammer
Waschen in PBS	2x5 Min
Abtrocknen mit Filterpapier	
Inkubation des Primärantikörper (rb-a-hu_PGP 9.5) 1:100 in 1%BSA-PBS	über Nacht bei 4-6°C in Feuchtkammer
am nächsten Tag	
Abspülen des Primär-Antikörpers mit Analyse-H <sub>2</sub> O	
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	3x5 Min
Waschen in PBS	10 Min
Waschen in 0,5% BSA-PBS	5 Min
Inkubation des Sekundärantikörpers (do-a-rb_biot. ) 1:500 in 1% BSA-PBS	bei 37°C im Inkubator in Feuchtkammer für 45 Min
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	3x5 Min
Waschen in PBS	10 Min
Waschen in 0,5% BSA-PBS	5 Min
Inkubation mit ABC-Peroxidase-Kit (1:50 in 1% BSA-PBS)	30 Min bei RT in Feuchtkammer, zuvor 30 Min reagieren lassen
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	3x5 Min
Waschen in PBS	10 Min
DAB Substrate vorbereiten <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Puffer auftauen lassen</li> <li>2. working solution zentrifugieren</li> <li>3. 50µl des Überstandes der working solution mit 450µl des Puffers mischen</li> </ol>	
Visualisierung mit DAB Substrate mit stabilem Peroxid-Substratpuffer	8 Min
Stoppen der Reaktion durch Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	2x5 Min



Durchführung	Inkubationszeiten
Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach P. Mayer	
Bläuen der Objektträger in Leitungswasser	15 Min
Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe	
50% Ethanol	5 Min
70% Ethanol	5 Min
96% Ethanol	5 Min
Isopropanol	3x5 Min
Xylol	3x5 Min
Eindecken mit Roti®-Histokitt II	

### 3.2.3.5 PD-L1 Färbung

Die Immunhistochemie zur Färbung von Programmed death Ligand 1 wurde anhand des folgenden Protokolls durchgeführt:

Tabelle 18: Durchführung und Inkubationszeiten der PD-L1 Färbung

Durchführung	Inkubationszeiten
Entparaffinierte Schnitte	
Proteindemaskierung in SignalStain EDTA Unmasking Solution	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 1:10 Verdünnung des 10-fach Konzentrates mit Analyse-H<sub>2</sub>O</li> <li>2. Schnitte und Lösung bei 600W 4 Min in der Mikrowelle zum Kochen bringen</li> <li>3. 15 Min bei 180-360W erwärmen, dabei darf Lösung nicht kochen</li> </ol>
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	3x5 Min
Blockierung der endogenen Peroxidase mit 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 Min , lichtunempfindlich aufbewahren
Waschen in TBS-T	2x5 Min
Proteinblockierung in 5% BSA-TBS	30 Min
Proteinblockierung in 1% BSA-TBS	1 Min
überschüssiges BSA-TBS mit Saugpumpe absaugen	

Durchführung	Inkubationszeiten
Blockierung von endogenem Biotin mittels Avidin-Biotin-Blockierung:  1. Avidin (unverdünnt) auf OT auftragen  2. mit Analyse-H <sub>2</sub> O abspülen, in Küvette mit 1% BSA-TBS sammeln  3. Biotin (unverdünnt) auf OT auftragen  4. mit Analyse-H <sub>2</sub> O abspülen, in Küvette mit 1% BSA-TBS sammeln	15 Min Inkubation bei Raumtemperatur in Feuchtkammer
überschüssiges BSA-TBS mit Saugpumpe absaugen	
Inkubation des Primärantikörper (rb_a_hu_PD-L1) 1:200 in SignalStain Antibody Diluent	über Nacht bei 16°C in Feuchtkammer
am nächsten Tag	
Inkubation	2h bei 37°C im Inkubator
Abwaschen des Primärantikörpers mit Analyse-H <sub>2</sub> O	
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	2x5 Min
Waschen in TBS-T	10 Min
Inkubation des Sekundärantikörpers (do_a_rb biot.) 1:400 in 1% TBS-BSA	45 Min in 37°C Inkubator in Feuchtkammer
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	2x5 Min
Waschen in TBS-T	10 Min
in Küvette mit 0,5% BSA-TBS sammeln	1 Min
überschüssiges BSA-TBS mit Saugpumpe absaugen	
Inkubation mit ABC-Peroxidase-Kit (1:100 in 1%BSA-TBS)	30 Min in Feuchtkammer in 37°C Inkubator, zuvor 30 Min reagieren lassen
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	5 Min
Waschen in TN-Puffer	3x5 Min
Signalverstärkung mit biotinyliertem Tyramid (aus TSA Biotin Stand Alone Tyramide Kit, biotinyliertes Tyramid wurde zuvor in DMSO gelöst und 1:50 in Amplification Diluent verdünnt)	10 Min in Feuchtkammer
Waschen in TN-Puffer	2x5 Min
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	5 Min

Durchführung	Inkubationszeiten
Waschen in TBS-T	5 Min
Sammeln der Objektträger in 0,5% BSA-TBS	kurz
überschüssiges BSA-TBS mit Saugpumpe absaugen	
Inkubation mit ABC-Peroxidase-Kit (1:100 in 1%BSA-TBS)	30 Min in Feuchtkammer in 37°C Inkubator, zuvor 30 Min reagieren lassen
Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	2x5 Min
Waschen in PBS	
DAB-Aliquot (100mg) und Nickel-Aliquot (600mg) in 800 ml PBS lösen und filtrieren	
Präparate in DAB-Nickel-Lösung unter Lichtschutz vorinkubieren	5 Min
Zugabe von 112µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8 Min
Reaktionsstop durch Waschen in Analyse-H <sub>2</sub> O	2x5 Min
Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach P. Mayer	
Bläuen der Schnitte auf OT in Leitungswasser	15 Min
Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe	
50% Ethanol	5 Min
70% Ethanol	5 Min
96% Ethanol	5 Min
Isopropanol	3x5 Min
Xylol	3x5 Min
Eindecken der OT mit Eukitt Quick-hardening mounting medium	

### 3.3 Auswertung der histologischen Untersuchungen und Datenerhebung

#### 3.3.1 Aufnahme der Gewebeschnitte

Die Aufnahme der Bilder erfolgte unter dem Axio Imager M2 Mikroskop mit dem Softwareprogramm Axio Vision und der Mikroskopkamera Axio Cam HRc. Für alle Aufnahmen wurde eine feste Belichtungszeit von 4,8ms festgelegt. Vor jeder Aufnahme einer Bildreihe eines Präparates wurde ein Weißabgleich durchgeführt und die Helligkeit so eingestellt, dass keine Sättigung mehr vorhanden war. Anschließend konnten die Bilder aufgenommen und gespeichert werden. Die Analyse der Bilder

wurde mit der Software Fiji-ImageJ durchgeführt. Der Maßstab wurde automatisch durch Zusammenführung der Einstellungen vom Mikroskop und der Kamera mit dem Programm Axio Vision bestimmt (1,5504 pixel/ $\mu\text{m}$ ).

Bei vergleichenden oder zur Gegenüberstellung herangezogenen Bildern wurde anhand charakteristischer Strukturen die gleiche Stelle im Präparat aufgesucht und diese fotografiert.

### **3.3.2 Messung der CD19<sup>+</sup>-Fläche**

Zur Bestimmung der CD19<sup>+</sup>-positiven Fläche wurden bei 100-facher Vergrößerung Bilder der Präparate der CD19<sup>+</sup>-Färbung aufgenommen. Die Präparate wurden hierfür systematisch abgefahren. Es wurden versucht pro Präparat mindestens 5 Bilder mit immunreaktiven Zellen aufzunehmen, wobei das bei den Präparaten 7097/10 und 11585/13 auf Grund eines zu hohen Fettanteils und zu geringen Anteils lymphatischen Gewebes nicht realisierbar war.

Zur Markierung der positiv gefärbten CD19<sup>+</sup>-Zellen wurden für alle Bilder „Farb-Schwellenwerte“ („Color Threshold“) festgelegt (s. Abbildung 15). Diese wurden so gewählt, dass ausschließlich positive, stark rot gefärbte B-Lymphozyten markiert wurden und gleichzeitig die Auswahl an Artefakten (z.B. Fettvakuolen, Präparaträndern, dunkelblau angefärbte Zellen) gering gehalten wurde.

Es wurden folgende Einstellungen der „Farb-Schwellenwerte“ („Color Threshold“) verwendet:

- „Hue“ (Farbton): 13-241, zum Ausschluss blauer, grüner und gelber Bereiche
- „Saturation“ (Sättigung): 70-245, zum Einschluss von stark gesättigten Bereichen
- „Brightness“ (Helligkeit): 0-205, zum Einschluss von dunklen Bereichen

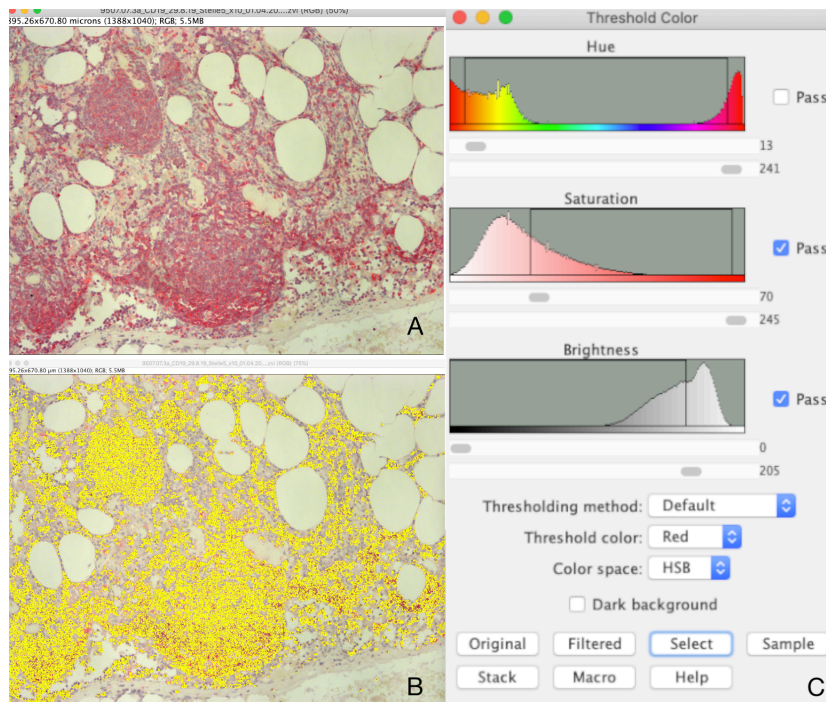


Abbildung 15: Beispiel für die Bestimmung der CD19<sup>+</sup>-positiven Fläche

Screenshots der Auswertung der CD19<sup>+</sup>-positiven Fläche mit der Software Fiji ImageJ bei einem Bild des Präparates 9507/07 bei 100-facher Vergrößerung. A: Originalbild mit rot gefärbten CD19<sup>+</sup>-positiven B-Lymphozyten, B: Markierung der positiv gefärbten Zellen (gelb) C: Einstellung der „Farb-Schwellenwerte“ („Color Threshold“) im Programm Fiji ImageJ

Die so markierte Fläche wurde anschließend mit dem Werkzeug „measure“ des Programms Fiji ImageJ berechnet. Um ausschließlich das lymphatische Gewebe der Lymphknoten, ohne Fettvakuolen oder interstitielles Bindegewebe in die Berechnung einzubeziehen, musste dieses bestimmt werden und wurde von der Gesamtfläche subtrahiert (Abb. 19). Zur Bestimmung der Fläche des Nicht-lymphatischen Gewebes wurden ebenso „Farb-Schwellenwerte“ festgelegt:

- „Hue“ (Farbton): 0-255, zum Einschluss des gesamten Spektrums
- „Saturation“ (Sättigung): 0-255, zum Einschluss des gesamten Spektrums
- „Brightness“ (Helligkeit): 0-[203-210], zum Einschluss von hellen Bereichen

Die Grenze des Helligkeitswertes variierte bei jeder Aufnahme in einem Rahmen von 203 bis 210 und wurde individuell angepasst.

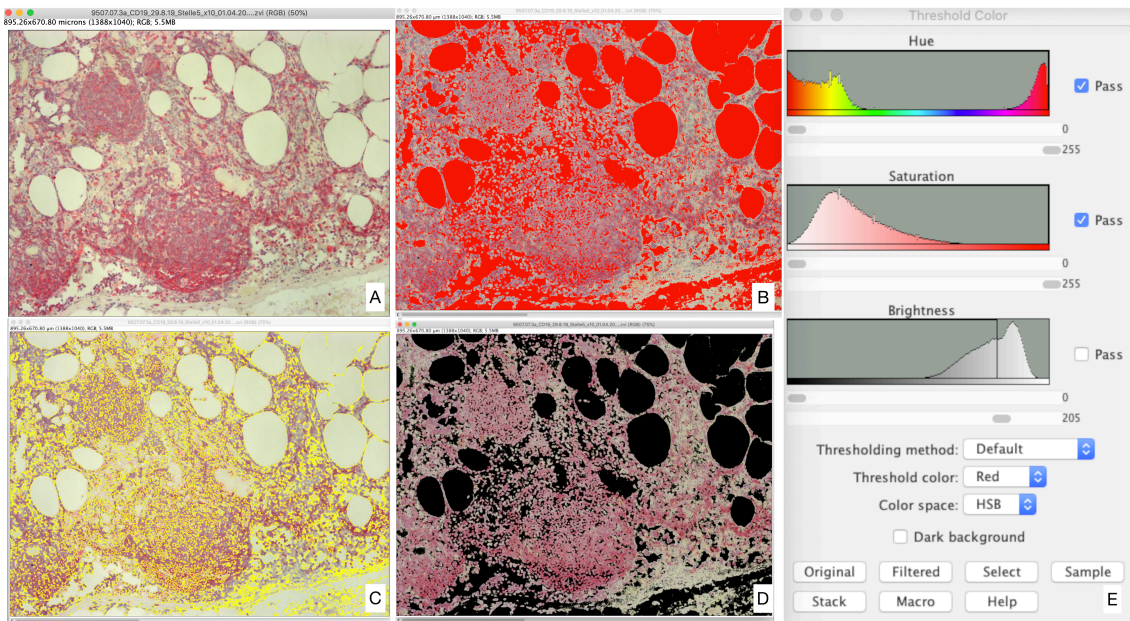


Abbildung 16: Beispiel für die Bestimmung der Nicht-lymphatischen Fläche

Screenshots der Auswertung für die Bestimmung der Nicht-lymphatischen Fläche bei dem Präparat 9507/07 A: Original-Präparat. B: Markierung der Nicht-lymphatischen Fläche (rot). C: Auswahl (gelb) der in (B) markierten Fläche („select“). D: Die ausgewählte Fläche wurde aus dem Bild herausgeschnitten. Hierfür musste die Selektion invertiert werden („Edit“>>„Selection“ >> „Make Inverse“), um sie folglich zu beschneiden („Edit“>>„Cut“). E: Einstellungen der Farb-Schwellenwerte für die Bestimmung der Nicht-lymphatischen Fläche.

Zuvor wurde die Gesamtfläche eines Bildes ermittelt, indem der gesamte Bildinhalt markiert („select all“) und dieser gemessen wurde („measure“). Die ermittelte Fläche des Nicht-lymphatischen Gewebes konnte daraufhin von der Gesamtfläche des Bildes abgezogen werden. Zur Kontrolle der berechneten Fläche des lymphatischen Gewebes, wurde die inverse Fläche des zuvor markierten nicht-lymphatischen Gewebes, entsprechend der lymphatischen Fläche, ebenfalls nochmal gemessen („measure“) und die Übereinstimmung der beiden Werte kontrolliert.

Aus der gemessenen positiven CD19<sup>+</sup> Fläche und der Fläche des lymphatischen Gewebes wurde für jedes Bild der prozentuale Anteil positiver CD19<sup>+</sup>-Zellen am Gesamtanteil des lymphatischen Gewebes bestimmt. Folglich wurde für jedes Lymphknoten-Präparat aus den Prozentwerten der Bildreihen das arithmetische Mittel bestimmt.

### 3.3.3 Messung der CD68<sup>+</sup>-Fläche

Die Bestimmung der Fläche der M1-MΦ erfolgte analog zu der Bestimmung der CD19<sup>+</sup>-positiven Fläche (vgl. 3.2.2). Anhand der systematisch in 100-facher Vergrößerung aufgenommenen Bildern konnte mittels der Bildbearbeitungs-Software Fiji Image J und dem Werkzeug der Farb-Schwellenwerte („Color Threshold“) die positive Fläche der CD68<sup>+</sup>-immunreaktiven Zellen markiert und anschließend



gemessen werden. Es wurden folgende Farb-Schwellenwerte zur Markierung verwendet:

- „Hue“ (Farbton): 15-240, zum Ausschluss blauer, grüner und gelber Bereiche
- „Saturation“ (Sättigung): 60-240, zum Einschluss von stark gesättigten Bereichen
- „Brightness“ (Helligkeit): 0-250, zum Einschluss von dunklen und hellen Bereichen.

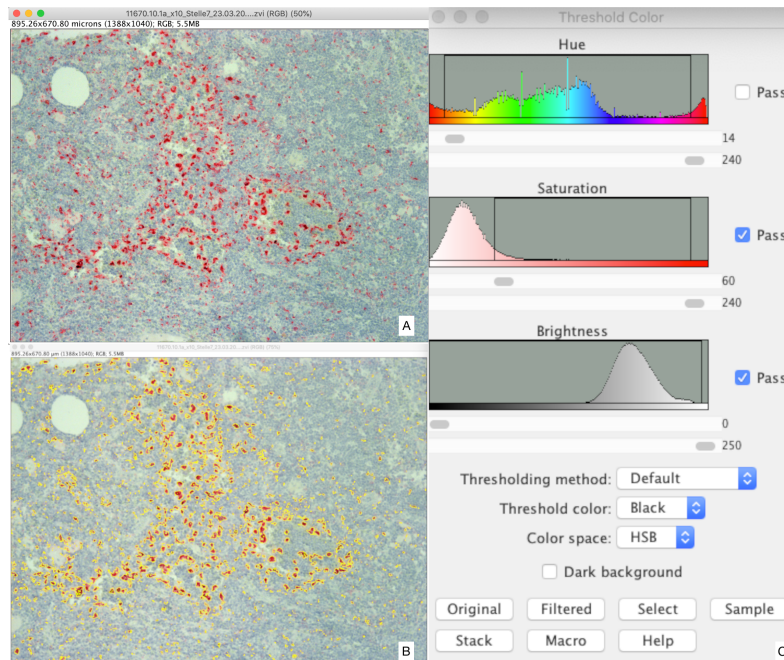


Abbildung 17: Beispiel für die Bestimmung der CD68<sup>+</sup>-positiven Fläche

Screenshots der Auswertung der CD68<sup>+</sup>-positiven Fläche mit der Software Fiji ImageJ bei einem Bild des Präparates 11670/10 bei 100-facher Vergrößerung. A: Originalbild mit rot gefärbten CD68<sup>+</sup>-positiven M1-MΦ, B: Markierung der positiv gefärbten Zellen (gelb) C: Einstellung der „Farb-Schwellenwerte“ („Color Threshold“) im Programm Fiji ImageJ.

Daraufhin wurde die Gesamtfläche des lymphatischen Gewebes des Bildausschnittes, gleichermaßen wie beim Vorgehen für die Messung der CD19<sup>+</sup>-Fläche bestimmt. Folglich konnte der prozentuale Flächenanteil der CD68<sup>+</sup>-Zellen an der gesamtlymphatischen Fläche für jedes Bild und mittels des arithmetischen Mittels der prozentuale Flächenanteil jedes Präparates bestimmt werden.

### 3.3.4 Messung der positiven PD-L1 Fläche

Zur Quantifizierung der PD-L1-positiven Fläche wurde die gleiche Methodik wie in 3.2.2 und 3.2.3 angewendet. Zunächst wurden systematische Aufnahmen der Präparate in 100-facher Vergrößerung aufgenommen, woraufhin diese mittels des Werkzeuges „Color Threshold“ des Programms Fiji Image J selektiert und folglich quantifiziert werden konnten.

Die Markierung der positiven Zellen erfolgte mit folgenden Farb-Schwellenwerten:

- „Hue“ (Farbton): 150-210, zum Einschluss schwarzer Bereiche

- „Saturation“ (Sättigung): 0-255, zum Einschluss des gesamten Spektrums
- „Brightness“ (Helligkeit): 14-100, zum Einschluss von dunklen Bereichen.

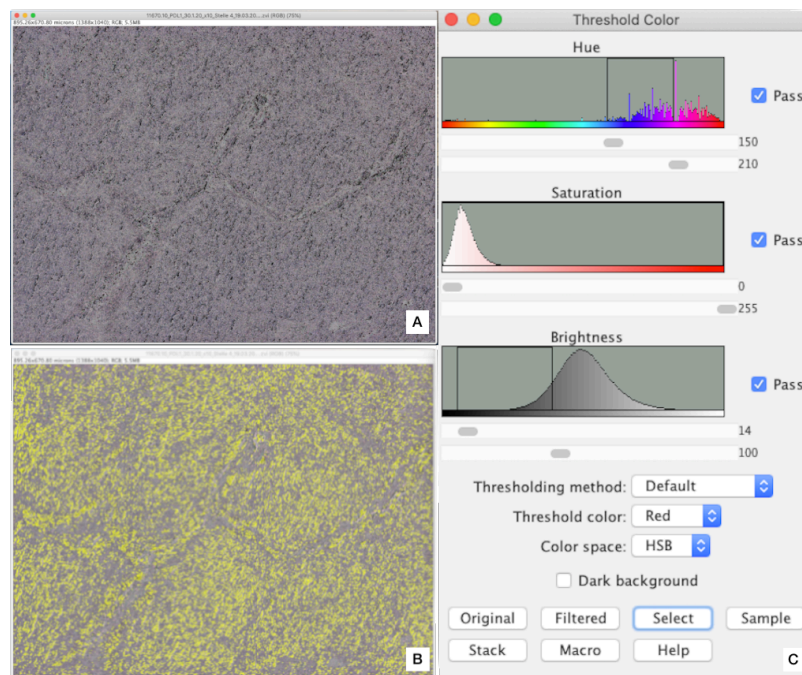


Abbildung 18: Beispiel für die Bestimmung der PD-L1-positiven Fläche

Screenshots der Auswertung der PD-L1-positiven Fläche mit der Software Fiji ImageJ bei einem Bild des Präparates 11670/10 bei 100-facher Vergrößerung. A: Originalbild mit schwarz gefärbten PD-L1, B: Markierung der positiv gefärbten Zellen (gelb) C: Einstellung der „Farb-Schwellenwerte“ („Color Threshold“) im Programm Fiji ImageJ.

Zum Ausschluss der Nicht-lymphatischen-Fläche wurde diese mit folgenden Farb-Schwellenwerten gemessen und anschließend von der Gesamtfläche abgezogen (vgl. 3.2.1.):

- „Hue“ (Farbton): 0-255, zum Einschluss des gesamten Spektrums
- „Saturation“ (Sättigung): 0-255, zum Einschluss des gesamten Spektrums
- „Brightness“ (Helligkeit): 0-[141-165], zum Einschluss von hellen Bereichen

Die Grenze des Helligkeitswertes lag meist bei 150. Bei einzelnen Aufnahmen musste sie im Rahmen von 141 bzw. 165 angepasst werden.



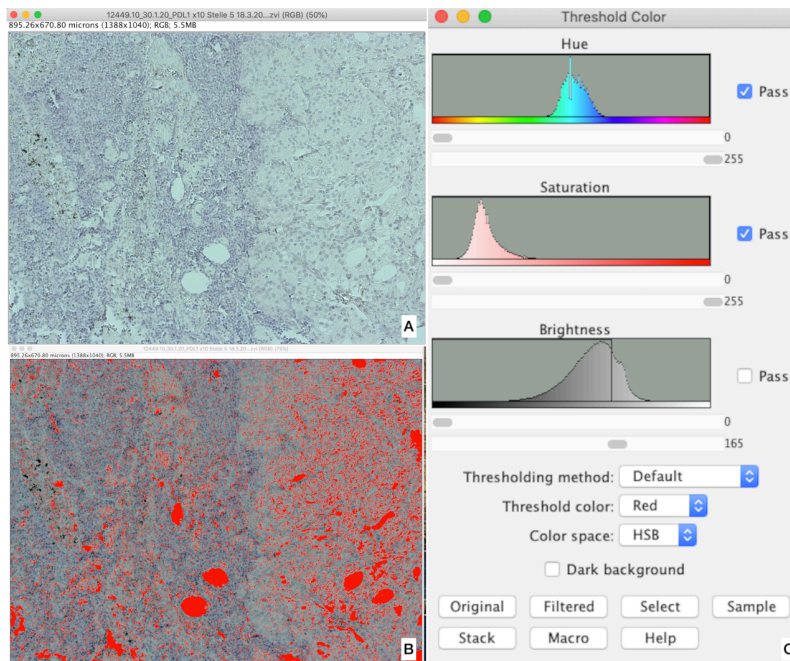


Abbildung 19: Beispiel für die Bestimmung der Nicht-lymphatischen Fläche der PD-L1 Färbung  
Screenshots der Auswertung für die Bestimmung der Nicht-lymphatischen Fläche bei dem Präparat 12249/19. A: Original-Präparat. B: Markierung der Nicht-lymphatischen Fläche (rot). C: Einstellungen der Farb-Schwellenwerte für die Bestimmung der Nicht-lymphatischen Fläche.

Die Aufnahmen der PD-L1 Färbung des Präparates 7097/10 enthielten aufgrund des Vorkommens zahlreicher Fettvakuolen nicht ausreichend lymphatisches Gewebe und konnten somit nicht in die Auswertung einbezogen werden. Bei allen anderen Präparaten wurden mindestens 3 Aufnahmen pro Präparat in die Auswertung einbezogen und somit der prozentuale Flächenanteil bestimmt.

### 3.3.5 Statistische Erhebung: IHC

Die ermittelten Daten wurden zwecks der statistischen Erhebung zunächst in LibreOffice übertragen. Dort wurde das arithmetische Mittel, die Standardabweichung (Standard deviation, SD) und die Standardfehler (Standard error, SEM) der Ergebnisse berechnet. Anschließend wurde die Ergebnisse und die Standardfehler mittels Numbers graphisch dargestellt.

## 3.4 Molekularbiologische Expressionsanalyse

### 3.4.1 Prinzip der molekularbiologischen Expressionsanalyse

Die in dieser Arbeit verwendete quantitative Reverse Transkriptase Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) („Quantitative reverse transcription PCR“ beruht auf dem Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und dient demnach als Vervielfältigungsmethode von Nucleinsäuren. Zusätzlich ermöglicht die RT-qPCR eine Quantifizierung der amplifizierten Genfragmente in Echtzeit (Holzapfel et al., 2007). Die

PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung gewünschter DNA-Abschnitte, welche zuvor aus einer Probe direkt gewonnen oder von der RNA kopiert werden muss.

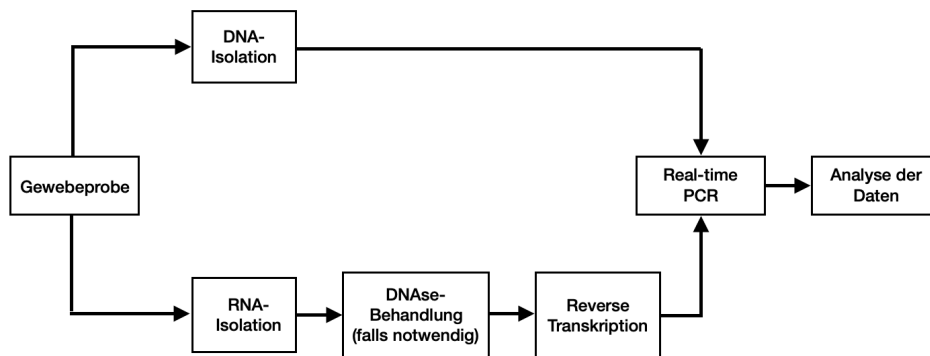


Abbildung 20: Schema der DNA- und RNA-Analyse von Gewebeproben

Aus einer Gewebeprobe gewonnene RNA muss, bevor sie mittels RT-PCR vervielfältigt werden kann, von DNA befreit werden (DNase Behandlung) und mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden (Kubista et al., 2006, verändert).

In der vorliegenden Arbeit wurde das totalRNA FFPE XS-Kit verwendet, um aus den Gewebeschnitten der Paraffinblöcken RNA zu extrahieren. Zur Beurteilung der Qualität, Quantität und Konzentration dieser extrahierten RNA wurden photometrische Absorptionsmessungen mit dem NanoDrop durchgeführt.

Der Quotient der Messungen im UV-Bereich bei 260 (A260) und 280nm (A280) dient der Bestimmung der Reinheit der DNA bzw. RNA. Bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 spricht man von reiner DNA und RNA, wobei bei einem Quotienten unter 1,8 von verunreinigter DNA bzw. RNA auszugehen ist.

Die Konzentration ist ein aus A260, speziellen Extinktionskoeffizient und Verdünnungsfaktor berechneter Wert (Arnemann et al., 2019). Da die Quotienten der Proben 7097/10 und 11585/13/2a mit 1,6 und 1,74 unterhalb von 1,8 liegen (s. Anhang 7.1.7) wurden diese nicht in weitere Analysen einbezogen.

Zur Generierung von DNA-Templaten wurden alle anderen Proben mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA, „complementary DNA“) umgeschrieben. Bei dem auch cDNA-Synthese genannten Umschreiben der RNA in DNA, kommen komplementäre Oligo(dT)-Primer und Random Primer zum Einsatz. Erstere hybridisieren durch ihren komplementären Aufbau an den Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA. Beginnend am 3'-Ende initiieren sie damit die reverse Transkriptase.

Random Primer bestehen aus zufälligen Nukleotidsequenzen. Diese sind meist sechs Basen, dann random hexamers, oder neun Basen, dann random nonamers genannt,

lang und schreiben unspezifisch mRNA-Fragmente um (Kubista et al., 2006). In einem weiteren Schritt werden dem einsträngigen RNA-Strang die komplementären Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) angehängt und es entsteht doppelsträngige cDNA.

Die umgeschriebene cDNA wird daraufhin mittels RT-qPCR und spezifischen Primern vervielfältigt, wobei die eingesetzten Primer den Genabschnitt bestimmen, welcher analysiert wird.

Die Besonderheit der RT-qPCR liegt darin, dass durch Fluoreszenzmessungen die Quantität der DNA bestimmt werden kann, da diese proportional zu der Fluoreszenz zunimmt. Zum Einsatz kommen hierbei sog. interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie bspw. SYBR-Green, welche sich mit einer hohen Selektivität während der Vervielfältigungszyklen der DNA-Doppelhelix anlagern und fluoreszieren (Holzapfel et al., 2007). Diese emittieren unter Anregung und Emission bei 492 nm und 516 nm Wellenlänge, sodass während der Zyklen der PCR durch Fluoreszenzmessungen die Quantität der Amplifikate bestimmt werden kann (Müller and Prange, 2016). Zur Quantifizierung der amplifizierten cDNA wird der  $C_T$ -Wert (Threshold Cycle = Schwellenwert-Zyklus) herangezogen. Dieser ist der Schnittpunkt zwischen dem Exponentialbereich einer Amplifikationskurve und einer Schwellenwertlinie (s. Abbildung 21). Die  $C_T$ -Werte sind ein relatives Maß für die Konzentration des Zielgens in der PCR-Reaktion.

Zur relativen Quantifizierung der eingesetzten Proben wird eine Standardkurve mit einer Verdünnungsreihe von externen Standards herangezogen, welche zuvor erstellt werden muss. Mithilfe der Steigerung der erstellten Standardkurve und den  $C_T$ -Werten der DNA-Proben, kann nun die Ausgangsmenge der Transkripte abgeleitet werden (Jansohn et al., 2012).

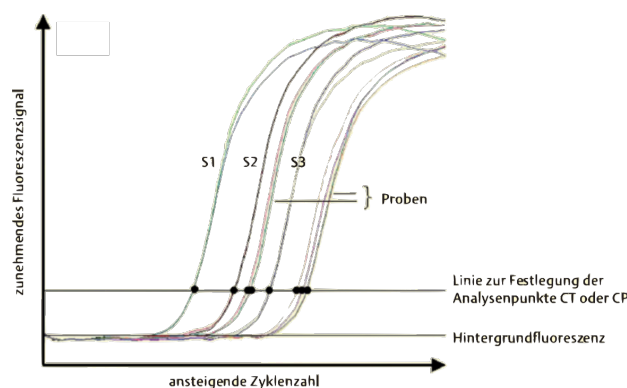


Abbildung 21: beispielhafter Verlauf einer Fluoreszenzkurve von Standards

Mit zunehmender Zykluszahl steigt das Fluoreszenzsignal und sobald dieses die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, kann der  $C_T$ -Wert bestimmt werden (Holzapfel et al., 2007, verändert).

Die Beurteilung der Spezifität des PCR-Produkt wird anhand von Schmelzkurven vollzogen. Hierbei wird das DNA-Produkt (Amplikon) durch kontinuierliche

Temperaturerhöhung aufgetrennt. Sollte der SYBR-Green Farbstoff unter ungünstigen Bedingungen auch mit Primer-Dimeren oder PCR-Beiprodukten reagieren, käme es zu mehreren Peaks mit geringeren oder anderen Schmelzpunkten als die der spezifischen Amplikons.

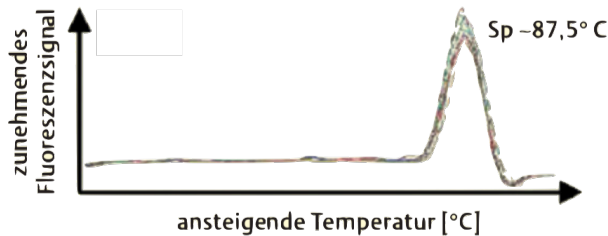


Abbildung 22: beispielhafte Darstellung einer Schmelzkurve

Die Spezifität des amplifizierten PCR-Produktes wird durch das Vorliegen nur eines Peaks bei  $\sim 87,5^{\circ}C$  verifiziert (Holzapfel et al., 2007, verändert).

### 3.4.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde bei allen 7 Lymphknoten-Präparaten und dem Plazenta Präparat durchgeführt. Zur Positivkontrolle und zwecks Vergleichbarkeit mit bereits vorhandenen Ergebnissen wurden zwei Prostata-Proben sowie zwei benigne Prostatahyperplasie-Proben der RT-qPCR hinzugefügt. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit wurden die dem Lymphknoten zugehörigen Prostata-Proben ausgewählt. Von diesen Proben lag die RNA bereits aus dem Projekt der Masterthesis von Lucia Sophie Kilian vor und wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Kilian, 2016). Die Lagerung der RNA erfolgte im Gefrierschrank bei  $-80^{\circ}C$ .

Die zu isolierenden Proben wurden nach dem Protokoll des Herstellers des „Nucleo Spin®totalRNA FFPE XS“ für FFPE histopathologische Proben behandelt. Durch Einbettung und Fixierung möglicherweise vorhandene Quervernetzungen und Fragmentierungen der RNA werden hierbei durch eingesetzte Puffer und Waschschriffe entfernt. Zur Lösung der auf SuperFrost Plus Objektträgern aufgezogenen Schnitte (vgl. 3.1.2. Anfertigung der Schnittpräparate mittels Schlittenmikrotom) wurden die Objektträger mit Paraffin Dissolver beschickt und die Proben vorsichtig mit einer Pipettenspitze in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Das Plazentapräparat wurde hierbei in mütterlichen und kindlichen Anteil aufgetrennt und diese in jeweilige Mikroreaktionsgefäße befördert.

Anschließend wurde zur weiteren Entparaffinierung 1ml Paraffin Dissolver in das Gefäß der Proben pipettiert und diese für eine Einwirkzeit von 5 Min auf  $56^{\circ}C$  erwärmt. Nach zwei-minütigem Zentrifugieren bei  $16000 \times g$  wurde der Überstand abpipettiert. Nach Zugabe von  $140\mu l$  des Lyse Puffers MLF, erneutem Vortexen bei  $16000 \times g$  für 2 Min

und Abpipettieren des Überstandes, wurde den Proben 15µl Proteinase K hinzugefügt und diese über Nacht bei 55°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde entsprechend des Protokolls des Herstellers verfahren und nach Zugabe von 12µl Präzipitationspuffer MKA und dessen fünf-minütiger Inkubation auf Eis, die Proben 5 Min lang zentrifugiert und der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Dieses wurde für 15 Min auf 80°C erhitzt, um die Quervernetzungen aufzulösen. Um die Bindebedingungen zu verbessern, wurde daraufhin 400µl Binde-Puffer zur Probe hinzugegeben und diese nach kurzem Vortexen für 1 Min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Reinigung der RNA wurden die Proben in Säulen überführt und in mehreren Waschschritten mit Waschpuffer gewaschen. Die genaue Durchführung ist dem Herstellerprotokoll zu entnehmen. Es folgte der DNA-Verdau mittels rDNase, dem weitere Waschschrritte nachgeschaltet waren. Um die RNA zu eluieren, wurde den Proben insgesamt 14µl RNase-freies-H<sub>2</sub>O hinzugefügt, dieses für eine Minute inkubiert und anschließend die Mischung zentrifugiert. Insgesamt wurden mit dieser Methode 14µl RNA-Eluat gewonnen. Die Konzentrations- und Absorptionsspektrumsbestimmung dieser RNA-Eluate erfolgte mittels NanoDrop (s. Anhang 7.1.7).

### **3.4.3 cDNA-Synthese**

Die Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop diente der Ermittlung des benötigten Volumens an RNA, welche eingesetzt werden muss, um 200 ng RNA zu erhalten. Die ermittelte Menge der RNA-Probe (zwischen 0,8µl und 11,7µl) wurde mit 1µl Oligo-dT<sub>12-18</sub>-Primer und 1µl Random Primer gemischt. Ergänzt wurde die Mischung mit Analyse-H<sub>2</sub>O (RNase-/DNase-frei), sodass das Endvolumen insgesamt 13,7µl betrug. Die Proben inkubierten anschließend für 5 Min bei 65°C, gefolgt von 10-minütiger Verweildauer bei 20°C im Thermocycler und wurden anschließend auf Eis gestellt. Das Erhitzen der Proben bezweckt eine bessere Bindung der Primer an die RNA. Zur weiteren cDNA-Synthese wird eine Mischung aus 2µl AffinityScript RT Buffer, 2µl Dithiothreitol (DTT), 0,8µl dNTP-Mix, 0,5µl RNase-Inhibitor und 1µl AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transkriptase benötigt. Von diesem Ansatz werden jeweils 6,3µl in die Proben (4°C) pipettiert. Es folgt eine erneute Inkubation im Thermocycler, zunächst 5 Min bei 25°C, dann 60 Min bei 50°C und zuletzt, zum Stoppen der Reaktion, für 15 Min bei 70°C. Die fertig umgeschriebene cDNA wird zur Aufbewahrung bei -20°C gelagert.

### **3.4.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion**

Mit der quantitativen Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion wurden mittels verschiedenen Primern Abschnitte der Zielgene PD-L1, GDF-15, KRT20 und UCHL1 der cDNA untersucht. Zum Einordnen der Ergebnisse bedarf es einerseits der

Normalisierung der Messwerte durch eine relative Quantifizierung mit Housekeeping Genen (HKG). HKG werden konstitutiv exprimiert und dienen als interne Referenz (Arnemann, 2018). In der vorliegenden Arbeit wurden die HKG GAPDH, TBP und HPRT1 untersucht, da diese am zuverlässigsten in pelvischen Lymphknoten von PCa Patienten exprimiert werden (Tsaur et al., 2013; Mori et al., 2008).

Zur Erstellung von Standardkurven der zu untersuchenden Gene (PD-L1, KRT20, GDF-15 und GAPDH), wurden in dieser Arbeit ein humaner Standard-RNA Pool verwendet. Für PGP9.5 (UCHL1) sowie zur erneuten Beurteilung von PD-L1 wurde eine im hiesigen Institut etablierte humane PCa Standardkurve herangezogen. Die Bestimmung der Standardkurven des humanen Standard-RNA Pools und des humanen PCa erfolgte mit einer RT-qPCR Verdünnungsreihe mit Analyse-H<sub>2</sub>O (RNase-/DNase-frei) (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 und 1:320).

Die restlichen cDNA-Proben, die cDNA-Standards und die eingesetzten Primer wurden zur weiteren Behandlung zunächst aufgetaut und auf Eis gelegt. Die cDNA der Proben wurde mit Analyse-H<sub>2</sub>O (Nukleasefrei) 1:10 verdünnt. Die folgenden Schritte wurden innerhalb einer mit UV-Licht sterilisierten „PCR-Workstation“ durchgeführt, wobei die Proben sich auf Eis befanden. Die wells der 96-well Platte wurden nun mit 5µl des jeweiligen cDNA-Ansatzes gefüllt. Hinzu pipettiert wurden jeweils 10µl eines RT-qPCR Mix, bestehend aus 7,5µl QPCR MasterMix, 1µl Analyse-H<sub>2</sub>O (Nukleasefrei) und 1,5µl des jeweiligen Primers, sodass sich in jedem well insgesamt 15µl Gesamtvolumen befanden. In die Negativkontrolle wurde anstatt des cDNA-Ansatzes Analyse-H<sub>2</sub>O gegeben. Die 96-well Platte wurde nach Verschluss kurz zentrifugiert und anschließend in einen Thermocycler mit einem wärme-leitenden Metallblock (QPCR-System) eingespannt und das RT-qPCR Programm gestartet. Die jeweiligen Programmschritte mit Temperatur, Dauer und Anzahl der Zyklen sind Tabelle 19 zu entnehmen.

Tabelle 19: Tabellarische Darstellung und Übersicht über das RT-qPCR-Programm mit Temperaturen, Dauer und Anzahl der Zyklen

Programmschritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	95°C	3Min	1
Denaturierung	95°C	10s	} 47
Annealing/Elongation	60°C	20s	
Dissoziationsanalyse	95°C 55°C +1°C bis 95°C	1 Min 30s alle 30s 30s } 20 Min	1

Nach abgeschlossener RT-qPCR wurden die PCR-Amplikons zusätzlich mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert zwecks Beurteilung der Größe des Amplikons. Das Prinzip der Gelelektrophorese besteht darin, dass nach Erkalten des Agarosegels dieses große Poren aufweist. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes, welches mit Hilfe eines Puffers eine bessere Leitfähigkeit aufweist, werden die DNA-Amplikons-/Produkte anhand ihrer Ladung und Größe innerhalb des Agarosegels in Banden aufgeteilt. Dabei wandern die DNA-Fragmente mit ihrem negativ geladenen Phosphatrückgrat der Nucleinsäure zur positiv geladenen Anode. Als limitierender Faktor bei der Wanderung der Moleküle dienen die Poren des Agarosegels, welche größere Moleküle langsamer passieren lassen und somit ein Auftrennen nach Größe ermöglichen. Hierbei erzeugt jeder Primerpaar eine definierte und genau Amplikonlänge nach der PCR Reaktion (s. Tabelle 10).

Vor der Elektrophorese werden die DNA-Proben mit einem Probenpuffer gemischt. Dieser enthält neben Glycerol, welches eine hohe Dichte sicherstellt, auch Farbstoffe, wie bspw. Bromphenolblau, zur Markierung der Lauffront (Jansohn et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurden 2,5%ige Agarosegele verwendet, welche mit 1x TBE-Puffer versetzt wurden. In dem Agarosegel wurde 1µl/10µl GelRed zur Färbung der DNA-Banden gelöst. Zu den RT-qPCR Proben wurden 2,5µl der DNA-Färbelösung „Orange loading dye“ hinzugegeben. Es enthält zwei verschiedene Farbstoffe (Xylencyanol FF und Orange G) für die visuelle Verfolgung der DNA-Migration während der Elektrophorese. Das Vorhandensein von Glycerin stellt sicher, dass die DNA in Leiter und Probe eine Schicht auf dem Boden des Wells bildet. Nachdem die Agarosegele in TBE-Puffer gelegt wurden, fügte man 5µl Gel Standard-Leiter („Low Range DNA Ladder“ und 17µl der RT-qPCR Proben hinzu. Anschließend wurde zur Erzeugung eines elektrischen Feldes eine konstante Spannung von 120V über zwei Stunden angelegt. Schließlich wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels dem E-Box-System Bilder aufgenommen (s. Anhang 7.1.8, 7.1.9, 7.1.10 und 7.1.11).

### **3.5 Auswertung der Molekularbiologische Expressionsanalyse**

Die Software Mx3005P QPCR-Mx Pro erstellte die Amplifikations- und Schmelzkurven (auch Dissoziationskurve) der analysierten RT-qPCR Ansätze. Mit Hilfe der eingesetzten cDNA-Standards konnten die Standardkurven für jeden Primer ermittelt werden. Die Standardkurven hatten eine Effizienz von 95,5-99,7%. Anschließend erfolgte ein Vergleich der Amplifikations- und Schmelzkurven der Proben und Negativkontrollen mit denen der Standards (s. Abbildung 23).

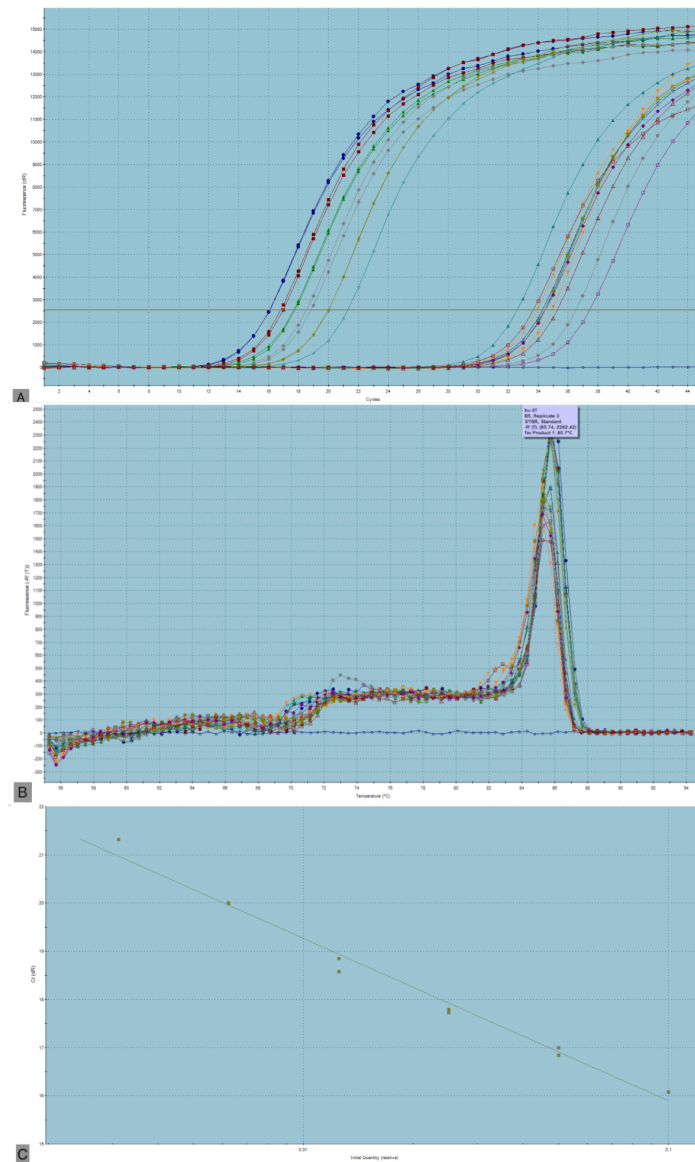


Abbildung 23: Exemplarische Darstellung der Auswertung der RT-qPCR

Screenshots der Auswertung der GAPDH-Expression mit der QPCR Software MxPro. A: Amplifikationskurve B: Dissoziationskurve C: Standardkurve

Ebenfalls wurde zur Sicherstellung der Spezifität, die Dissoziationskurven auf Abweichungen untersucht, um Primer-Dimere oder PCR-Beiprodukte von der weiteren Auswertung auszuschließen. Abweichungen von den Amplifikationskurven der Standards bzw. Primer-Dimere traten bei TBP und HRPT1 auf. Somit wurden sie nicht als Referenzgen verwendet. Ebenfalls von der weiteren Auswertung ausgeschlossen wurden die KRT20-Ansätze, da keine KRT-20 Amplifikate nachgewiesen werden konnten.

Zur Kontrolle der aus den Amplifikationskurven gewonnenen Ergebnissen, wurden die Gelelektrophorese-Agarosegele herangezogen. Es wurden die Laufstrecken der eingesetzten Standards mit den Laufstrecken der RT-qPCR Ansätzen verglichen.



Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Proben mit von dem Standard abweichenden Dissoziationskurven ebenso kürzere Banden als die der Standardprobe aufwiesen. Teilweise konnten in der Agarose-Gelelektrophorese auch keine Banden nachgewiesen werden.

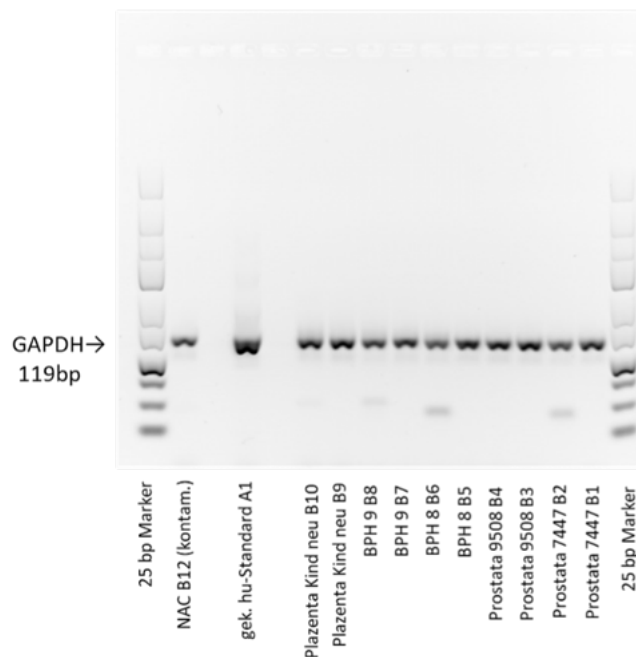


Abbildung 24: Aufnahmen des 2,5%igen Agarosegels der GAPDH PCR Produkte (Amplikon) zur beispielhaften Überprüfung

Nach Ausschluss der unspezifischen Ergebnisse, konnte mittels der QPCR-Software MxPro die relative Quantität ( $Q_r$ ) mit den ausgewählten Standardkurven bestimmt werden. Es wurde jeweils der Mittelwert aus den  $Q_r$ -Werten der Doppelbestimmung berechnet. Der Quotient aus dem  $Q_r$ -Wert des Zielgens und dem  $Q_r$ -Wert des Referenzgens ( $Q_r$ -Wert Zielgen /  $Q_r$ -Wert Referenzgen) diente zur Bestimmung der Expression der Zielgene. Von den drei eingesetzten Housekeeping Genen TBP und HRPT1 konnte lediglich GAPDH in allen Proben nachgewiesen werden und wurde somit als Referenzgen verwendet.

### 3.5.1 Statistische Erhebung: Molekularbiologische Expressionsanalyse

Die Auswertung der Daten und das Erstellen von Diagrammen erfolgte mit den Programmen Excel und Numbers. Hierbei wurde sich auf Grund mangelnder Probenanzahl auf das Erheben der einzelnen Expressionen in jedem Präparat beschränkt und keine weiteren statistischen Test durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 H.E.-Färbungen

Die HE-Färbungen geben einen generellen Überblick über die Struktur der Lymphknoten. Es können Cortex, Lymphfollikel sowie interstitielles Gewebe mit retikulären Fasern unterschieden werden. Ebenfalls ist die Struktur der Lymphsinus erkennbar (s. Abbildung 25).

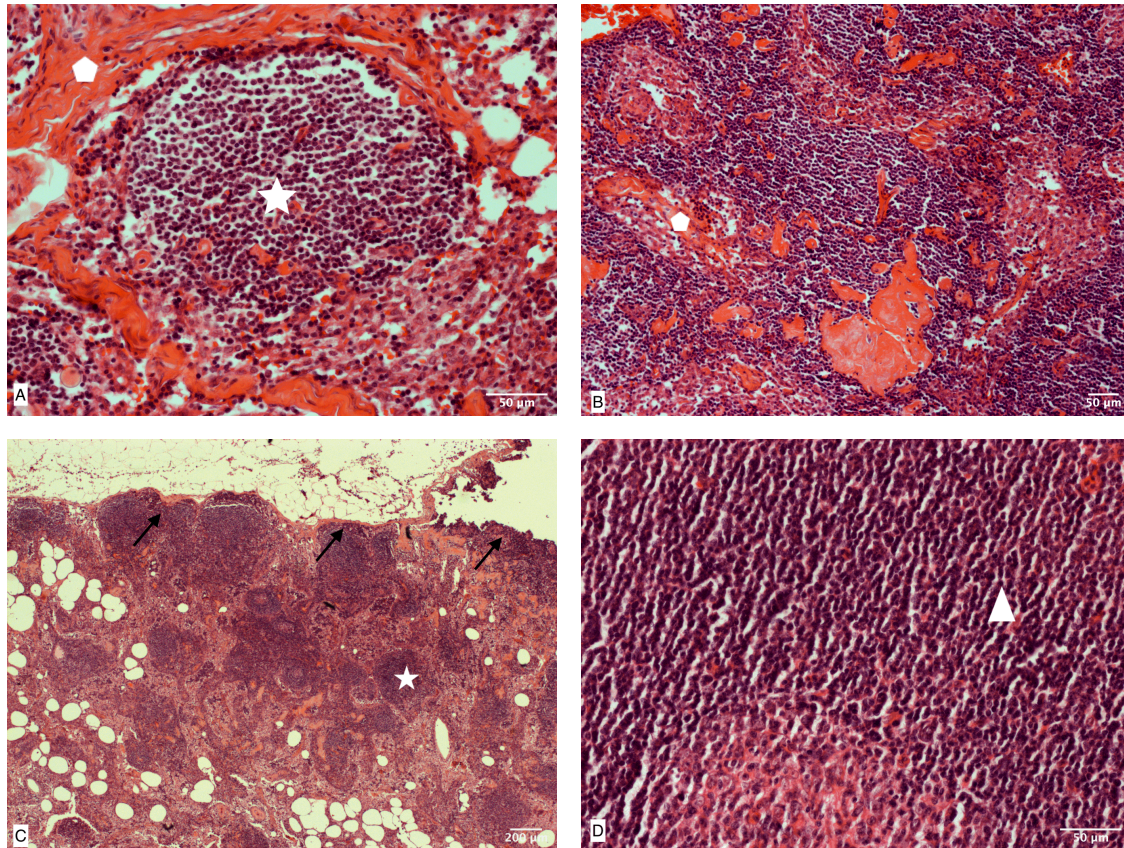


Abbildung 25: Exemplarische Darstellung von Gewebeschnitten der Lymphknoten (HE-Färbung)

A: GS6 (Präparatnr.: 7232/10), B: GS9 (Präparatnr.: 7746/10), C: GS7 (Präparatnr.: 9507/07), D: GS6 (Präparatnr.: 16770/10). Weißer Stern: Lymphfollikel, schwarze Pfeile: Cortex, weißes Fünfeck: interstitielles Gewebe, weiße Pfeilspitze: Lymphsinus

### 4.2 GDF-15 IHC

#### 4.2.1 Gegenüberstellung der Positiv- und Negativkontrolle unter Verwendung von Prostata-Gewebe

Die Lymphknoten wurden mittels IHC Färbung auf das Vorhandensein von GDF-15 untersucht werden, wobei zur Sicherstellung von korrekten Färbeergebnissen eine Positivkontrolle des PCa (Präparatnummer: 11586/13, GS9) simultan mit den Lymphknotenpräparaten gefärbt wurde. Aus der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass sich

in diesem Prostata-Präparat GDF-15<sup>+</sup>-Zellen befinden und sich diese Probe somit gut als Positivkontrolle eignet (Maximilian Skowronek, Dissertation 2022).

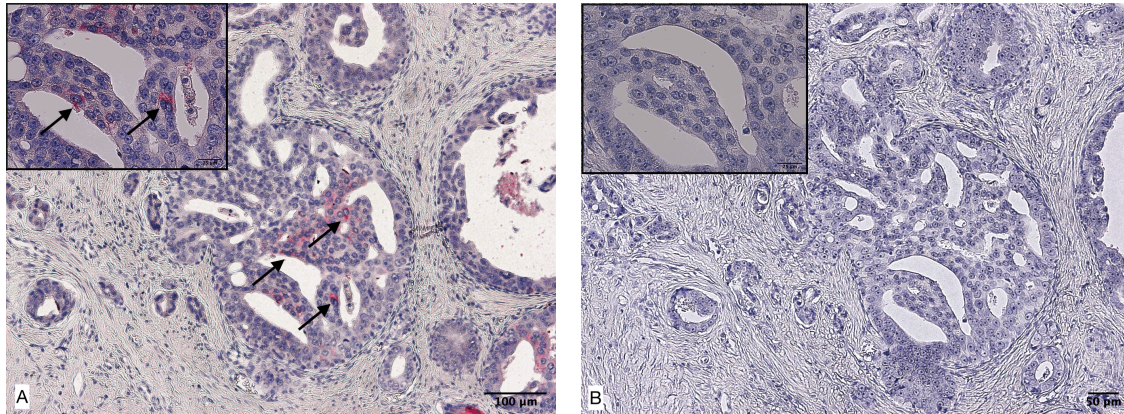


Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der GDF-15 IHC einer PCa Biopsie (Präparat 11586/13, GS9). Positiv- (A) und Negativkontrolle (B). Die Bilder zeigen jeweils die identische Stelle der Positiv- (A) und Negativkontrolle (B) bei unterschiedlicher Vergrößerung. Die schwarzen Pfeile zeigen auf GDF-15<sup>+</sup> Zellen.

In den Präparaten der Positivkontrolle ist eine hellrote Färbung der Prostatadrüsenzellen erkennbar. Diese nimmt luminalwärts zu, wohingegen im Interstitium der Prostata keine positiven Signale zu erkennen sind (s. Abbildung 26 A). In der Negativkontrolle ist an den kongruenten Stellen eine immunhistochemische Färbung ausgeblieben (s. Abbildung 26B).

#### 4.2.2 Gegenüberstellung der GDF-15 gefärbten Lymphknoten und Negativkontrolle

Im immunhistochemisch mittels GDF-15 Antikörper untersuchten LK-Präparat 7746/10 (GS 9) sind hellrote Bereiche im Interstitium erkennbar (s. Abbildung 27A). Diese befinden sich zwischen den Lymphozyten, haben keinen ersichtbaren Zellkern und treten in unterschiedlicher Größe im gesamten Lymphknotenpräparat auf (s. Abbildung 27A). In der Negativkontrolle- des LK-Präparates 7746/10 (GS9) sind an den kongruenten Stellen simultane Rotfärbungen des Interstitiums sichtbar (s. Abbildung 27B).



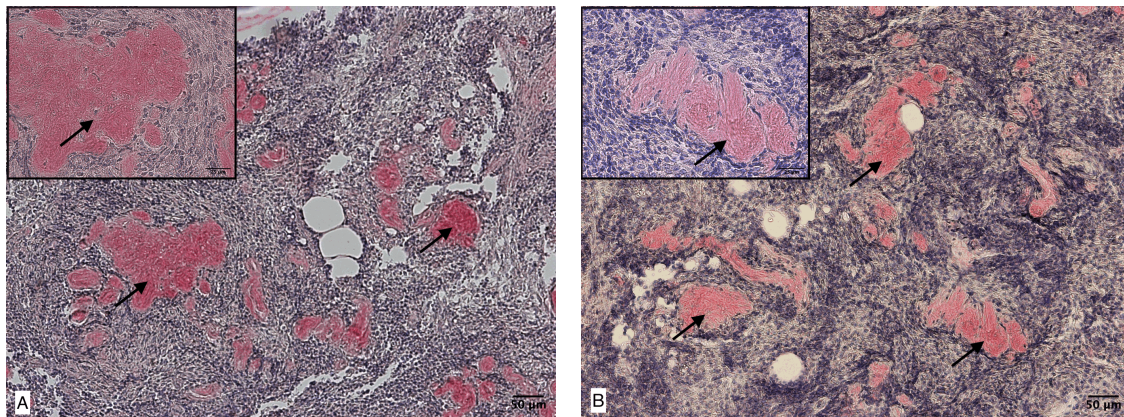


Abbildung 27: Exemplarische Darstellung der GDF-15 IHC im Lymphknoten (Präparat 7746/10, GS 9). Positiv- (A) und Negativkontrolle (B). Die Bilder zeigen jeweils identische Stellen der Positiv- (A) und Negativkontrolle (B) bei unterschiedlicher Vergrößerung. Die schwarzen Pfeile zeigen auf die hellroten Bereiche.

In allen Lymphknotenpräparaten, welche immunhistochemisch mittels GDF-15 Antikörper untersucht wurden, sind zwischen den Lymphozyten, im interstitiellen Raum, hellrot gefärbte, Bereiche zu beobachten (s. Abbildung 28 A+B). Diese liegen in allen Lymphknoten, unabhängig ihres GS vor.

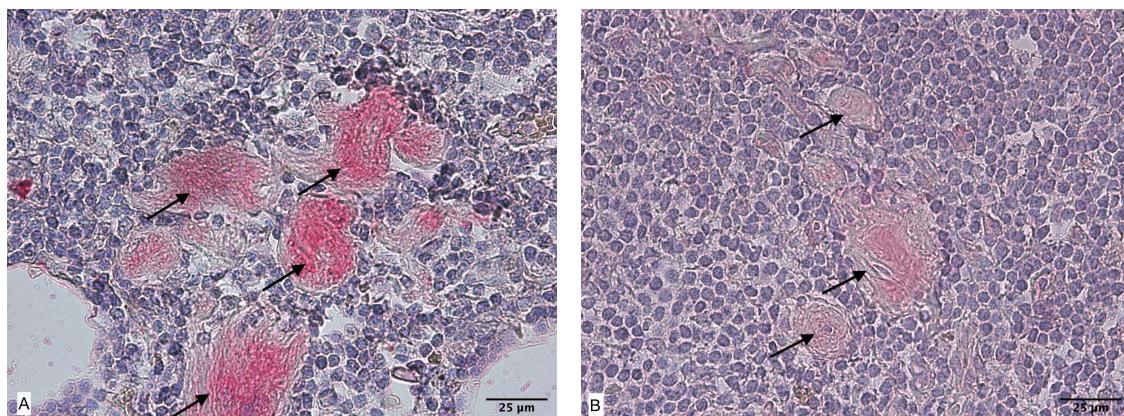


Abbildung 28: Exemplarische Darstellung der GDF-15 IHC in Lymphknoten. A: GS6 (Präparat 11670/10), B: GS9 (Präparat 11585/13). Die schwarzen Pfeile zeigen auf die hellroten Bereiche.

### 4.3 PD-L1-IHC

#### 4.3.1 Gegenüberstellung der Positiv- und Negativkontrolle unter Verwendung von Plazenta-, Prostata- und Lymphknoten-Gewebe

In den untersuchten Plazenta-, PCa- und Lymphknotenpräparaten wurden mittels IHC-Färbung PD-L1-positive Zellen identifiziert. Diese liegen im Placentapräparat hauptsächlich im Randbereich der Zotten vor (s. Abbildung 29C). In der Amnionplatte sowie im Chorionepithel konnten keine positiven PD-L1+ Zellen gefunden werden (s.



Abbildung 29A). In der Negativkontrolle (s. Abbildung 29 B, D) sind keine positiv gefärbten Zellen erkennbar.

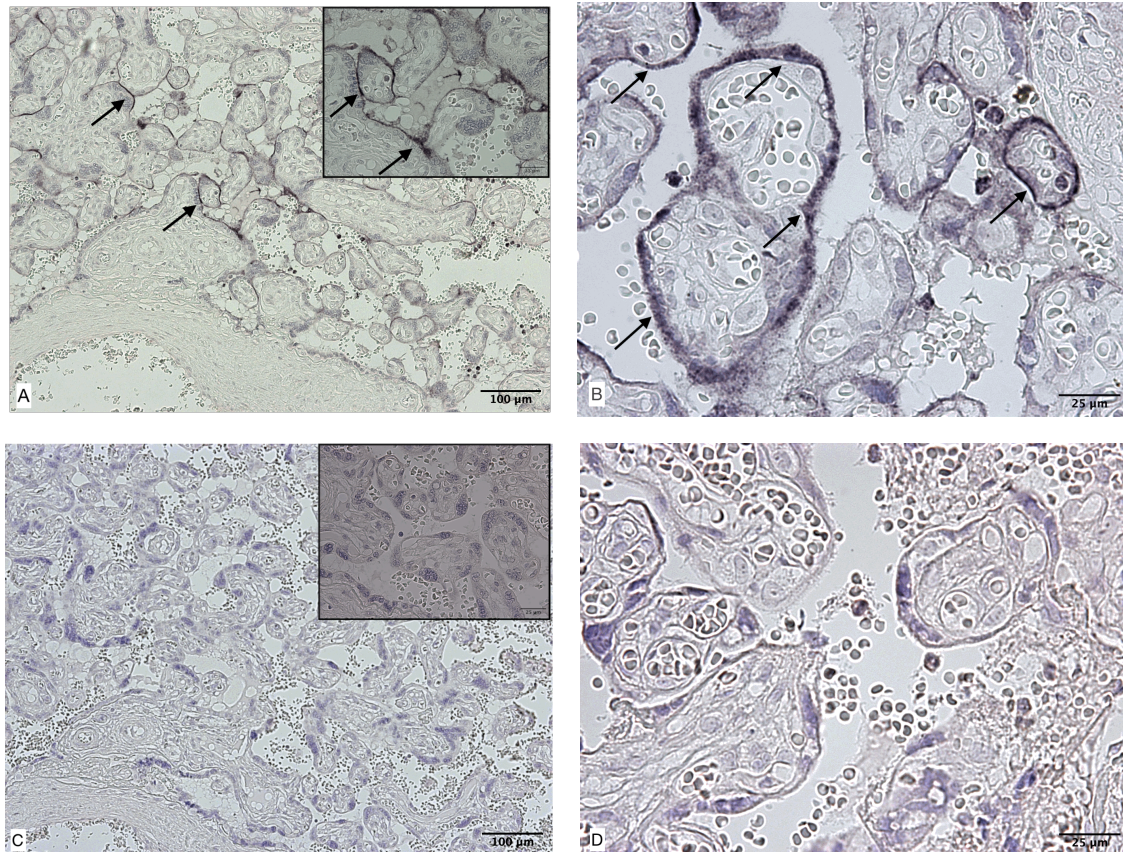


Abbildung 29: Exemplarische Darstellung der IHC in der Plazenta (Präparat 1331)

Positiv- (A,B) und Negativkontrolle (C,D). Die Bilder zeigen jeweils identische Stellen der Positiv- (A, B) und Negativkontrolle (C, D). Die schwarzen Pfeile zeigen auf die Randbereiche der Zotten mit positiv gefärbten PD-L1+ Zellen.

Im immunohistochemisch untersuchten PCa-Präparat 11586/13 (GS9) liegen die PD-L1+-Zellen in einer länglich gezogenen Akkumulierung zwischen den Prostatadrüsen, im Stroma vor (s. Abbildung 30A). In den Prostatadrüsen sowie in deren Lumen (s. Abbildung 30A) sind, genauso wie in der Negativkontrolle (s. Abbildung 30B) keine PD-L1+-Zellen vorzufinden.



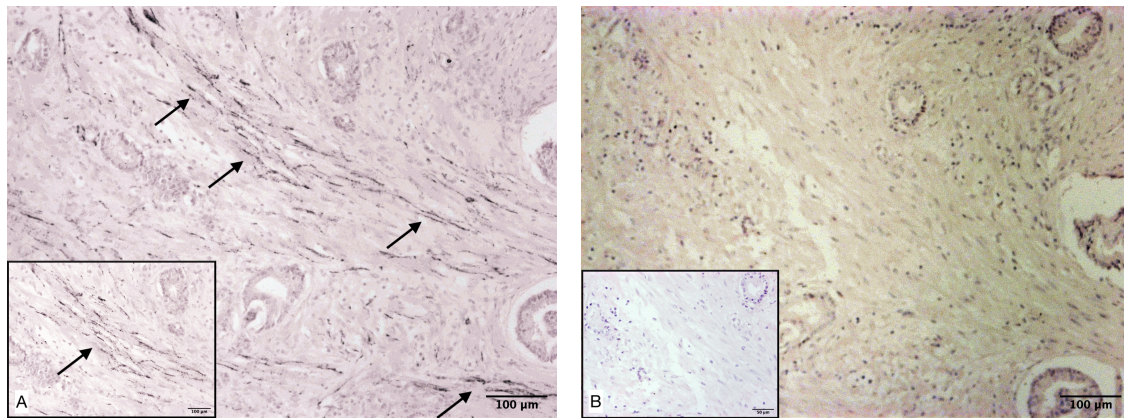


Abbildung 30: Exemplarische Darstellung der PD-L1 IHC in der Prostata (Präparat: 11586/13, GS 9). Positiv- (A) und Negativkontrolle (B). Die Bilder zeigen jeweils identische Stellen der Positiv- (A) und Negativkontrolle (B). Die schwarzen Pfeile zeigen auf die PD-L1+ Zellen.

In dem als Positivkontrolle verwendeten LK-Präparat 7232/10 (GS6) konnten PD-L1-immunreaktive Zellen insbesondere in den Randbereichen der Lymphfollikel in Akkumulationen identifiziert werden. Vereinzelt PD-L1+-Zellen sind auch im Lymphfollikel erkennbar (s. Abbildung 31A). In der Negativkontrolle ist an der identischen Stelle im Präparat hingegen eine immunhistochemische Färbung ausgeblieben (s. Abbildung 31B).

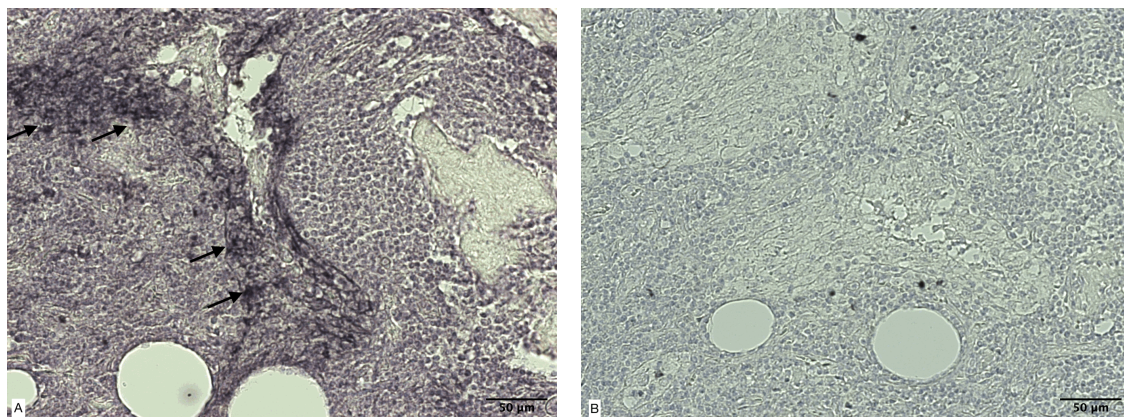


Abbildung 31: Exemplarische Darstellung der PD-L1 IHC im Lymphknoten (Präparat 7232/10, GS6) Positiv- (A) und Negativkontrolle (B). Die Bilder zeigen jeweils identische Stellen der Positiv- (A) und Negativkontrolle (B). Die schwarzen Pfeile zeigen auf die PD-L1+ Zellen.

#### 4.3.2 Lokalisation PD-L1 immunreaktiver Zellen im Lymphknoten

Der „programmed death ligand 1“ konnte in den Lymphknoten mittels IHC identifiziert werden. In allen Lymphknoten-Präparaten waren PD-L1+Zellen zu erkennen (s. Abbildung 32 A-D). Dabei treten sie meistens in nestartigen, langgezogenen Gruppen im Randbereichen der Lymphfollikel auf, welche sich analog der retikulären Fasern um die Lymphfollikel winden. Es ist weder ein vermehrtes Auftreten medulla- noch cortexwärts zu bemerken. Seltener findet man immunreaktive PD-L1 Zellen zwischen den einzelnen Lymphozyten (s. Abbildung 32A).



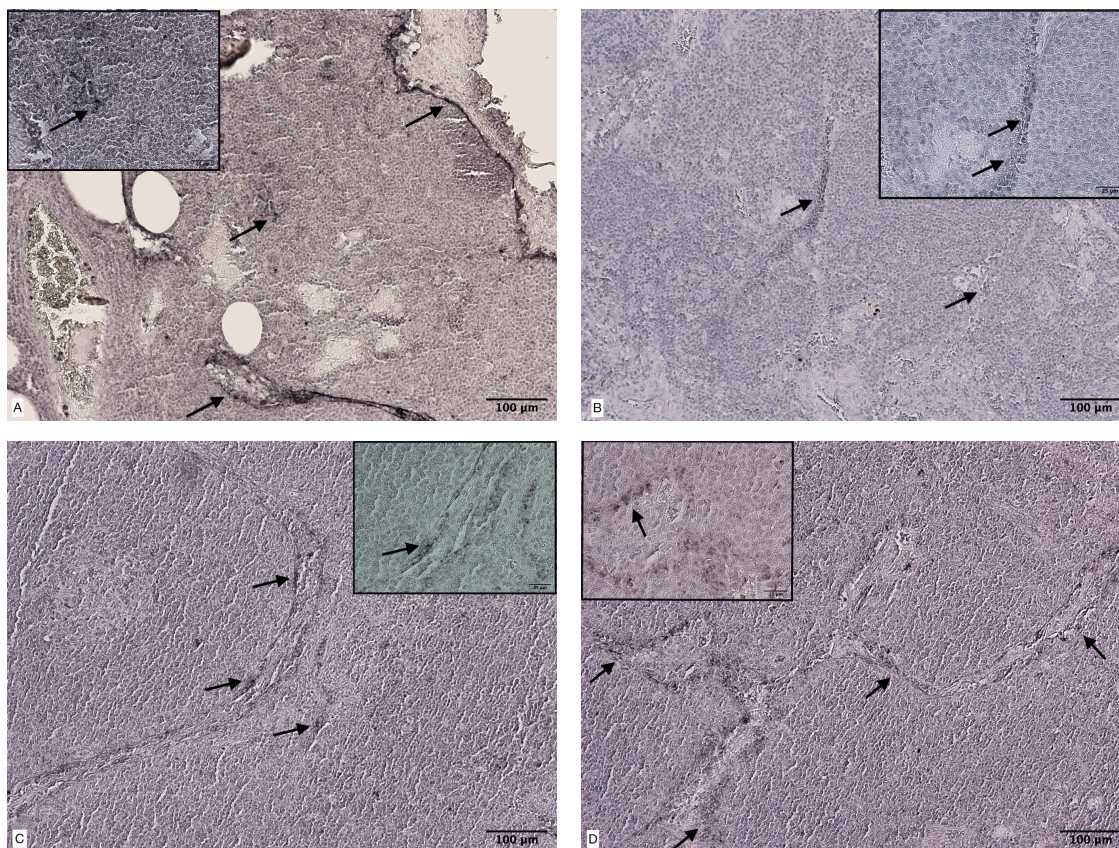


Abbildung 32: Exemplarische Darstellung der PD-L1 IHC in Lymphknoten

A: GS6 (Präparat 7232/10), B: GS7 (Präparat 9507/07), C+D: GS9 (Präparat 11670/10). Die schwarzen Pfeile zeigen auf PD-L1+ Zellen.

#### 4.3.3 Flächenanteil von PD-L1

Der prozentuale Flächenanteil der PD-L1-immunreaktiven Zellen wurde in sechs der sieben Lymphknoten Präparaten bestimmt (s. 3.3.4 und Abbildung 33). Der Anteil der PD-L1-immunreaktiven Fläche liegt bei den untersuchten Lymphknoten unterschiedlicher GS zwischen 1,8% und 23,2%. Den höchsten Flächenanteil immunreaktiver PD-L1 Zellen weist mit 23,3% Präparat 7232/10 auf, das aus einem Patienten mit GS6 stammt. Am niedrigsten (1,8%) war der Anteil PD-L1-immunreaktiver Zellen im Präparat 7232/10, das aus einem PCa-Patienten mit GS7 stammt (s. Abbildung 33). Die Flächenanteile PD-L1 immunreaktiver Zellen der anderen Präparate 11670/10 (GS6; 5,2%), 12449/10 (GS7; 7,8%), 11585/13 (GS9; 6,7%) und 7746/10 (GS9; 10,0%) liegen dazwischen (s. Abbildung 33).

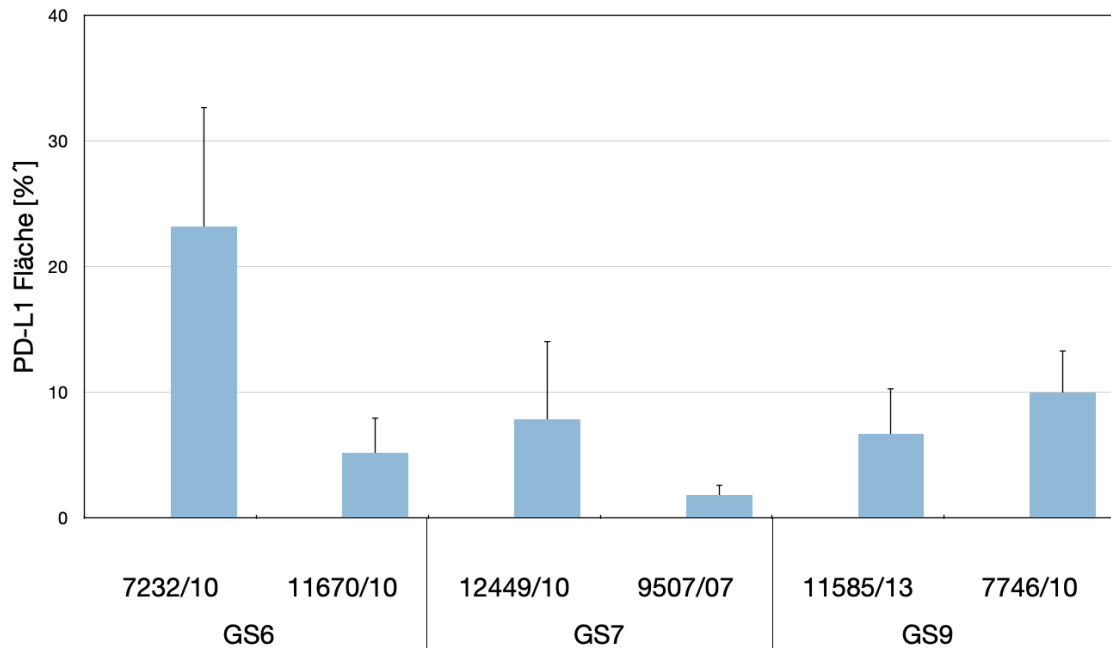


Abbildung 33: PD-L1 Flächenanteil (in %) in Lymphknoten unterschiedlicher GS  
Mittelwerte der Dreifachmessung eines Präparates +SEM.

Um mögliche Unterschiede im Auftreten von PD-L1 Zellen in Abhängigkeit von der Malignität festzustellen, wurden die einzelnen Lymphknotenpräparate je nach Zugehörigkeit ihrer GS zusammengefasst.

Hierbei zeigen die Lymphknotenpräparate der GS6-PCa Patienten den höchsten durchschnittlichen prozentualen Flächenanteil mit 14,2%, die Präparate der GS7-PCa Patienten weisen im Durchschnitt mit 4,8% den niedrigsten Flächenanteil auf und die Präparate der GS9-PCa Patienten befinden sich mit durchschnittlich 8,3% PD-L1 Flächenanteil in der Mitte (s. Abbildung 34). Dabei beträgt der Durchschnitt des PD-L1 Flächenanteils der LK der GS6-PCa Patienten das 2,9-fache der LK der GS7-PCa Patienten und das 1,7fache der LK der GS9-PCa Patienten. Der durchschnittliche prozentuale Flächenanteil der LK der GS9-PCa Patienten ist um den Faktor 1,7 höher als in den LK der GS7-PCa Patienten (s. Abbildung 34).



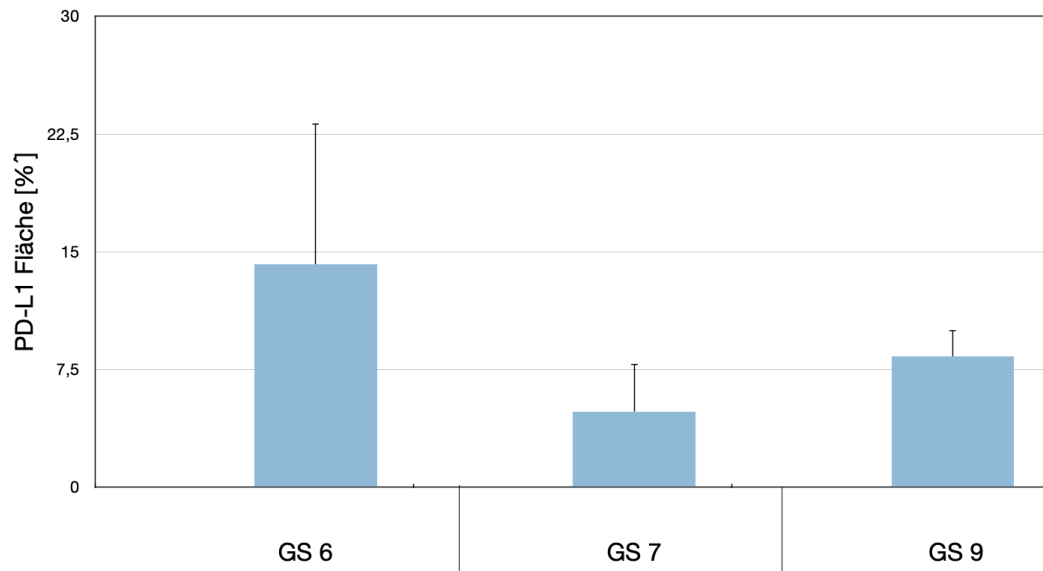


Abbildung 34: PD-L1 Flächenanteil (in %) in Lymphknoten, gruppiert nach zugehörigen GS  
Mittelwerte (GS6 n=2, GS7 n=2, GS9 n=2) + SEM.

## 4.4 CD68 IHC

### 4.4.1 Lokalisation und Morphologie der CD68<sup>+</sup>-MΦ

Die CD68<sup>+</sup>-MΦ wurden in allen Lymphknoten unterschiedlicher GS gefunden. Sie sind sowohl im Cortex als auch im Paracortex lokalisiert. Akkumulationen CD68<sup>+</sup>-MΦ existieren zwischen den Lymphfollikeln innerhalb der Trabekel des Lymphknotens (Abbildung 35 B).

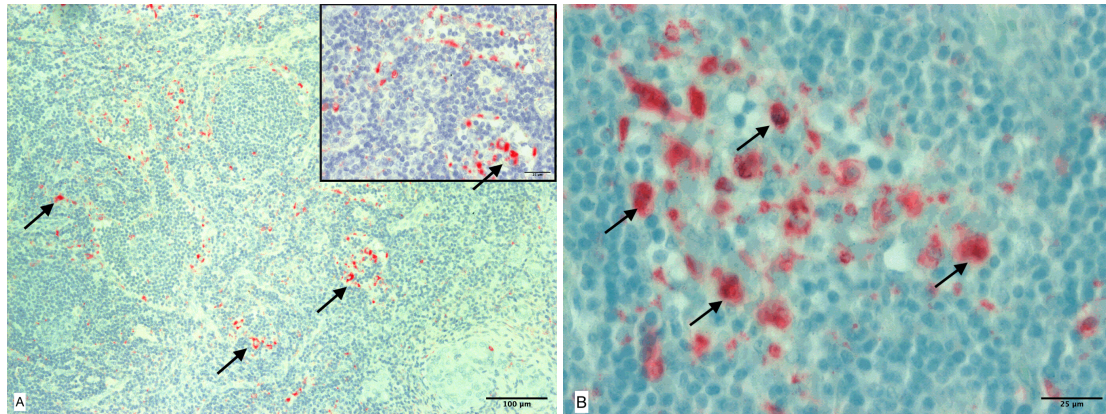


Abbildung 35: Exemplarische Darstellung der CD68 IHC in Lymphknoten

A: GS6 (Präparat 11670/10), B: GS9 (11586/13). Die schwarzen Pfeile zeigen auf CD68<sup>+</sup>-MΦ.

### 4.4.2 Flächenanteil der CD68<sup>+</sup>-Makrophagen

Der Anteil der CD68<sup>+</sup>-MΦ-Fläche liegt in den einzelnen Lymphknoten Präparaten zwischen 1,6 und 6,5% (Abbildung 36). In den Präparaten mit GS6 (7097/10; 6,5%), (11670/10; 5,3%), GS7 (12449/10; 6,3%) und GS9 (7746/10; 5,5%) ist der Flächenanteil ähnlich hoch (5,3-6,5%). Niedriger als in diesen Präparaten liegt der Flächenanteil in den anderen Präparaten des GS6 (7232/10; 2,1%) GS7 (9507/07; 3,3%), und GS9 (11585/13; 1,6%) (Abbildung 36).

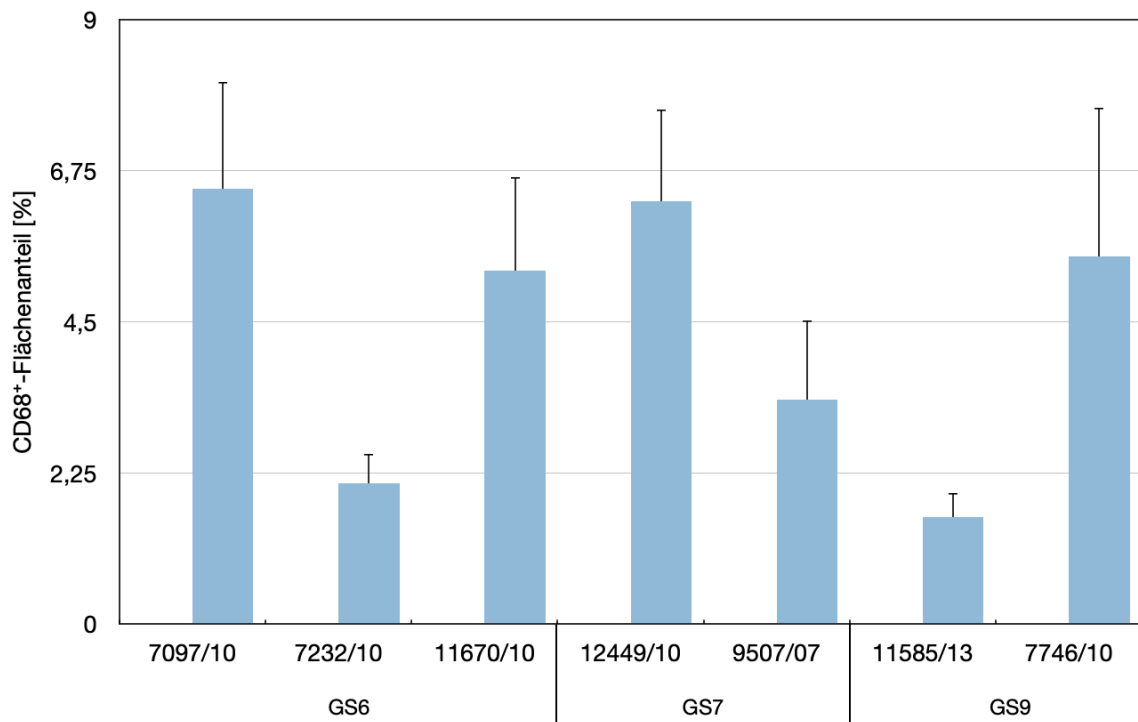


Abbildung 36: CD68<sup>+</sup>-Flächenanteil (in %) in Lymphknoten unterschiedlicher GS  
Mittelwerte der Fünffachmessung eines Präparates +SEM.

Der mittlere CD68<sup>+</sup>-MΦ-Flächenanteil zeigt, bei Zusammenfassung der jeweiligen GS6, GS7 bzw. GS9 Daten, keine starke Variation zwischen den CD68<sup>+</sup>-MΦ Flächenanteilen der einzelnen GS. Diese liegen zwischen 3,5% und 4,8%.

Hierbei zeigt der Durchschnitt der Lymphknotenpräparate der GS7-PCa Patienten im Mittel den höchsten CD68<sup>+</sup>-MΦ Flächenanteil (4,8%), gefolgt von denen der GS6-PCa Patienten mit 4,6%. Der CD68<sup>+</sup>-Flächenanteil in den LK der GS9-PCa Patienten stellt mit 3,5% den niedrigsten Wert dar (s. Abbildung 37). Dieser ist im Vergleich zum CD68<sup>+</sup>-Flächenanteil der GS6-PCa Patienten um den Faktor 0,76 niedriger und 0,73-fach niedriger als der CD68<sup>+</sup>-Flächenanteil der GS7-PCa Patienten. Der höchste CD68<sup>+</sup>-Flächenanteil der GS7-PCa Patienten ist gegenüber dem der GS6-PCa Patienten um den Faktor 1,05 erhöht.

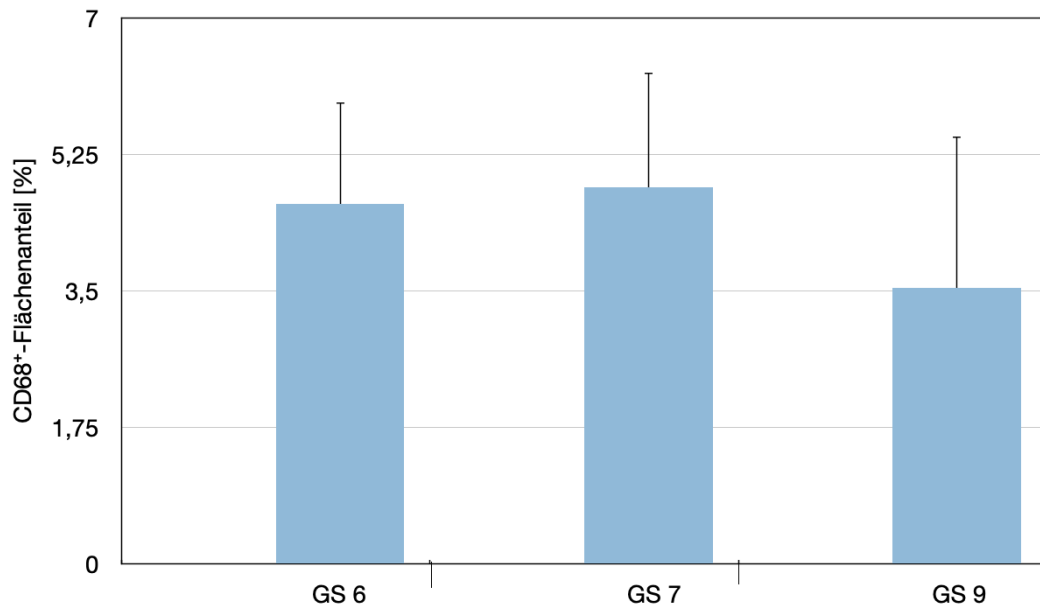


Abbildung 37: CD68<sup>+</sup>-Flächenanteil (in %) in Lymphknoten, gruppiert nach zugehörigen GS  
Mittelwerte +SEM (GS6 n=3, GS7 n=2, GS9 n=2).

## 4.5 B-Lymphozyten (CD19) IHC

### 4.5.1 Lokalisation und Morphologie der B-Lymphozyten (CD19)

CD19 immunreaktive B-Lymphozyten wurden in allen untersuchten Lymphknotenpräparaten unterschiedlicher GS gefunden. Im Cortex des Lymphknotens ist ihre Anordnung in Follikel deutlich erkennbar. (s. Abbildung 38 A). Vereinzelt sind CD19<sup>+</sup>-Zellen auch außerhalb der Follikel nachweisbar (s. Abbildung 38 B). Durch die hellrote Immunfärbung mittels alkalischer Phosphatase konnten sie gut vom Rest des lymphatischen Gewebes unterschieden werden. Zusätzlich diente der runde, meist zentral liegende Zellkern als Identifizierungsmerkmal.

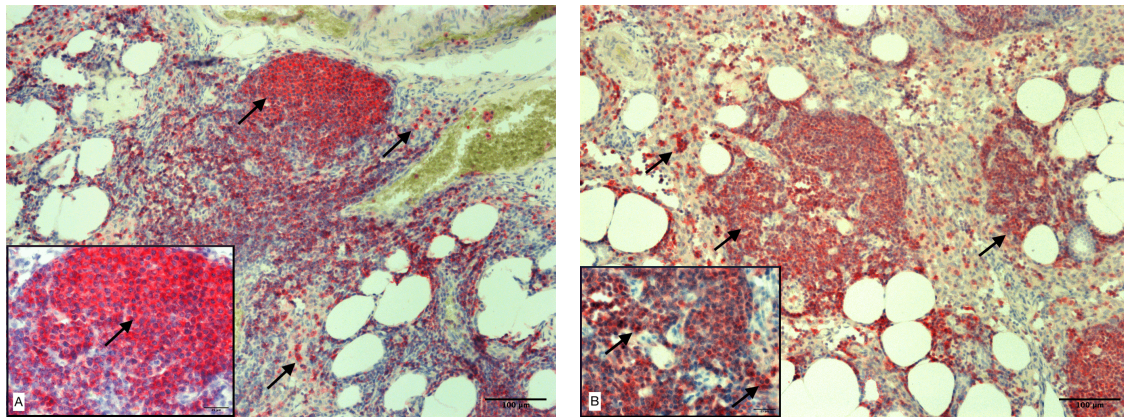


Abbildung 38: Exemplarische Darstellung der CD19 IHC in Lymphknoten

A: GS6 (Präparat 7232/10), B: GS9 (Präparat 7746/10). Die schwarzen Pfeile zeigen auf CD19<sup>+</sup>-Lymphozyten.

### 4.5.2 Flächenanteil der B-Lymphozyten

Der prozentuale Flächenanteil der CD19<sup>+</sup>-Lymphozyten liegt in den untersuchten Lymphknoten unterschiedlicher GS zwischen 0,9 und 22,3% (s. Abbildung 39). Hierbei liegt der Flächenanteil in den Präparaten 7097/10 (GS6; 0,9%), 7232/10 (GS6; 7,7%) und 11670/20 (GS6; 4,7%) zwischen 0,9 und 7,7%. In den restlichen Präparaten (12449/10 (GS7; 17,9%), 9507/10 (GS7; 17,6%), 11585/13 (GS9; 22,3%) und 7746/10 (GS9; 12,5%) ist der Anteil deutlich höher (s. Abbildung 39).

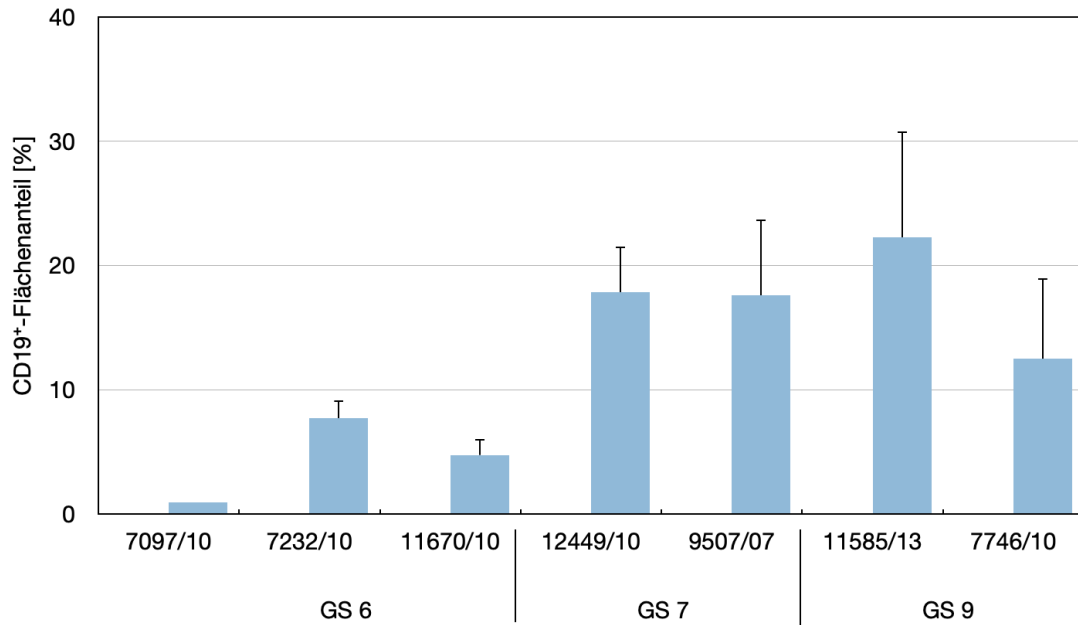


Abbildung 39: CD19-Flächenanteil (in %) in Lymphknoten unterschiedlicher GS  
Mittelwerte der Fünffachmessung eines Präparates +SEM.

In der Zusammenfassung der GS liegt der mittlere Flächenanteil der immunreaktiven CD19<sup>+</sup>-Lymphozyten der LK des GS6-PCa Patienten bei 4,5% (s. Abbildung 40). Die mittleren CD19<sup>+</sup>-Flächenanteile in LK der GS7 und 9 PCa Patienten liegen mit 17,8% (GS 7) und 17,4% (GS9) deutlich höher als die der GS 6 PCa Patienten (s. Abbildung 40). Der höchste prozentuale CD19<sup>+</sup>-Flächenanteil in LK der GS7 PCa Patienten ist 4,0 fach höher als der prozentuale CD19<sup>+</sup>-Flächenanteil in LK der GS6 PCa Patienten aber nur um den Faktor 1,02 höher als der durchschnittliche CD19<sup>+</sup>-Flächenanteil in LK der GS9 Patienten. Der Durchschnitt des CD19<sup>+</sup>-Flächenanteil in LK der GS9 PCa Patienten ist 3,9fach höher als bei GS6 PCa Patienten (s. Abbildung 40).

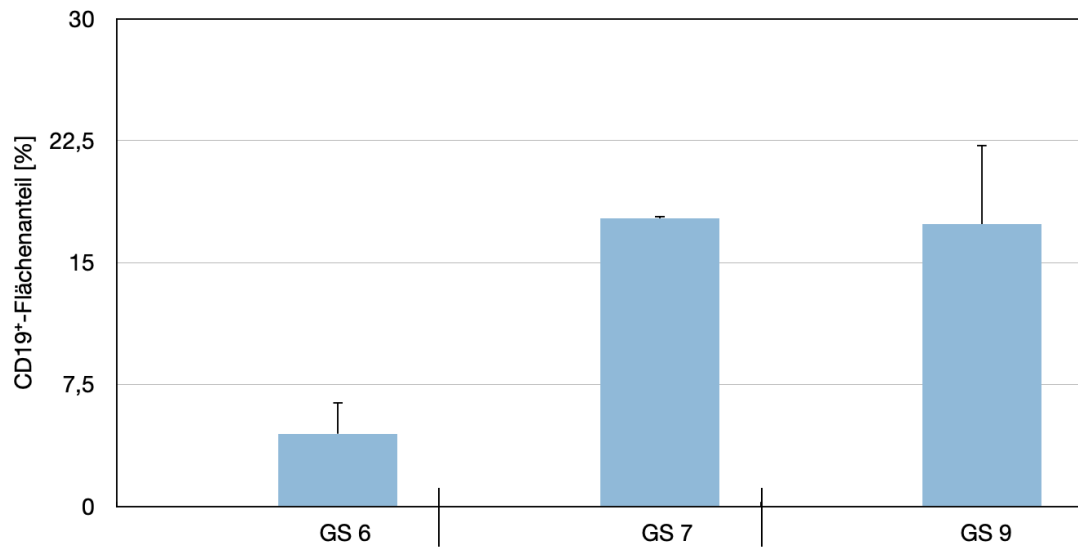


Abbildung 40: CD19<sup>+</sup>-Flächenanteil (in %) in Lymphknoten, gruppiert nach zugehörigen GS  
Mittelwerte +SEM (GS6 n=3, GS7 n=2, GS9 n=2).



## 4.6 IHC-Färbung: PGP 9.5

Zur Identifikation von Neuronen und neuroendokrinen Zellen wurde die immunhistochemische Färbung mit PGP 9.5 angewendet. Zur Kontrolle der spezifischen Färbung wurde die Färbemethode mit einer Positiv- und Negativkontrolle aus PCa-Schnitten überprüft.

### 4.6.1 Gegenüberstellung von Positiv- und Negativkontrolle

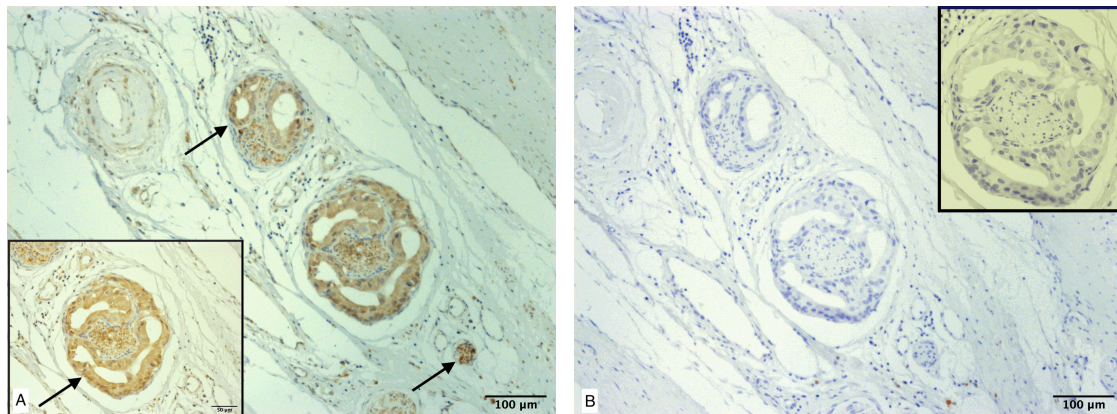


Abbildung 41: Exemplarische Darstellung der PGP 9.5 IHC in der Prostata

(Präparat 11586/13, GS9). Positiv- (A) und Negativkontrolle (B). Die Bilder zeigen jeweils identische Stellen der Positiv- (A) und Negativkontrolle (B). Die schwarzen Pfeile zeigen auf PGP 9.5+ Zellen.

In der Positivkontrolle sind bei der PGP9.5 IHC komplette Nervenbündel bräunlich angefärbt (s. Abbildung 41 A), wohingegen in der Negativkontrolle aufgrund der Kerngegenfärbung lediglich die Zellkerne bläulich markiert wurden (s. Abbildung 41 B).



## 4.6.2 PGP 9.5 im Lymphknoten

In den Lymphknoten Präparaten wurden keine PGP 9.5<sup>+</sup> Strukturen gefunden, welche histologisch Neuronen oder neuroendokrinen Zellen ähneln (Abbildung 42).

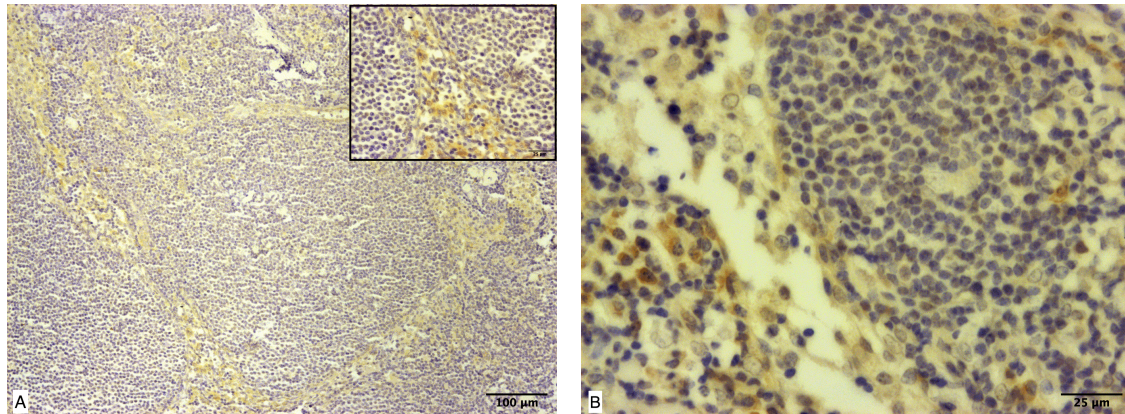


Abbildung 42: Exemplarische Darstellung der PGP 9.5 IHC in Lymphknoten

A: GS 9 (Präparat 7746/10), B: GS 7 (Präparat 9507/07). Es ist eine unspezifische Hintergrund-Braunfärbung sichtbar. Neuronen oder neuroendokrine Zellen wurden nicht angefärbt.

## 4.7 Expressionsanalysen: RT-qPCR

In insgesamt fünf Lymphknoten-, zwei PCa, zwei BPH und zwei Plazentapräparaten wurde die GDF-15-, PD-L1 und PGP 9.5 Expression mit GAPDH als Referenzgen ermittelt. Die Bestimmung der Expression wurde als Quotient der relativen Quantität ( $Q_r$ ) des Zielgens und des Referenzgens bestimmt ( $Q_r$  Zielgen /  $Q_r$  Referenzgen).

### 4.7.1 GDF-15 Expression

Die RT-qPCR ergab, dass in den Lymphknotenpräparaten 7232/10 (GS6; relative Expression (r.E.): 0,0), 11670/10 (GS6; r.E.: 0,0), 9507/07 (GS 7; r.E.: 0,0), 7446/10 (GS9, r.E.: 0,0) keine GDF-15 Expression vorhanden ist (s. Abbildung 43). Im Lymphknotenpräparat 12449/10 (GS7) konnte im Verhältnis zu GAPDH eine relative Expression von 2,1 detektiert werden (s. Abbildung 43). Während im PCa-Präparat 9508/07(GS7) keine GDF-15 Expression gemessen werden konnte, lag im PCa-Präparat 7447/10 (GS9) eine geringe r.E. von 12,1 vor (s. Abbildung 43). Wie erwartet wurde in der Plazentaprobe eine hohe GDF-15 Expression (288,6) festgestellt (s. Abbildung 43).

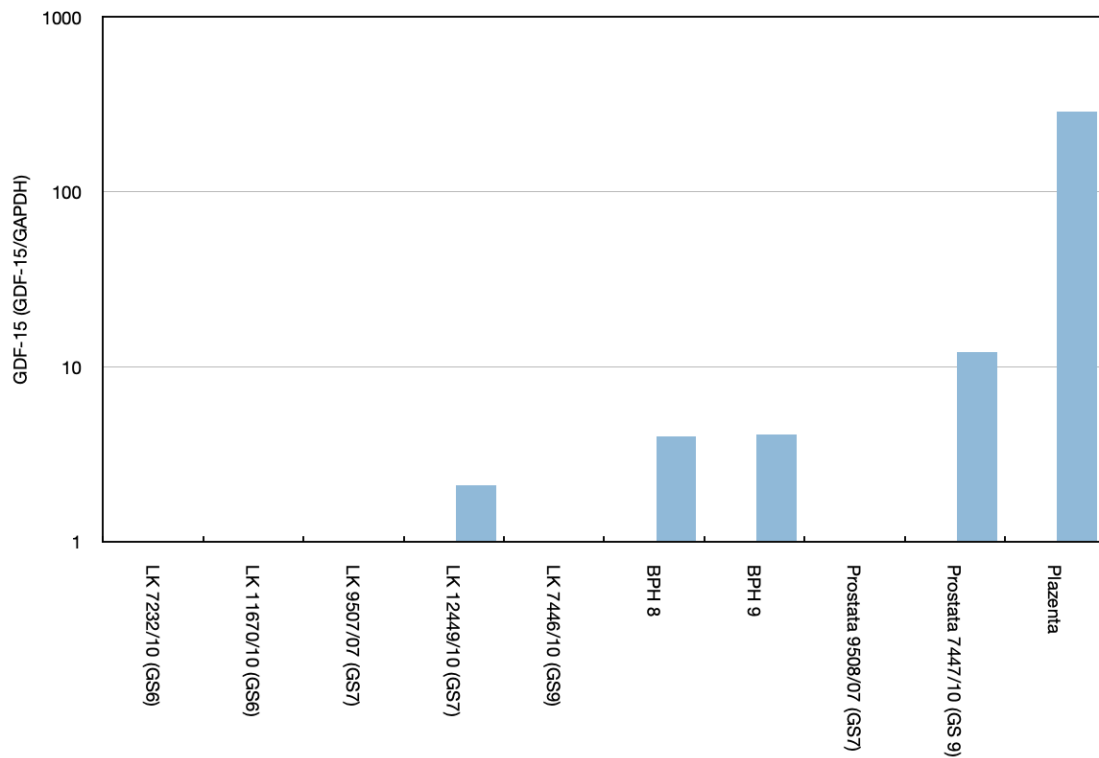


Abbildung 43: relative GDF-15 Expression

Relative GDF-15 Expression (normalisiert auf GAPDH) in LK, PCa bzw. Placenta. Mittelwerte.

In der Zusammenfassung der Gleason Scores der LK und der untersuchten BPH-, Prostata- und Plazentapräparate zeigt sich, dass die GDF-15-Expression in den zur Kontrolle verwendeten BPH-, Prostata- und Plazentapräparaten um ein Vielfaches höher ist als in den LK-Präparaten. Lediglich in den LK des GS7 wird GDF-15 exprimiert (r.E.: 1,06), wobei die Expression in den BPH-Präparaten um den Faktor 3,8, in den PCa-Präparaten um den Faktor 5,7 (r.E.: 6,0) und in dem Plazentapräparat um den Faktor 272,1 (r.E.: 288,6) höher ist (s. Abbildung 44).

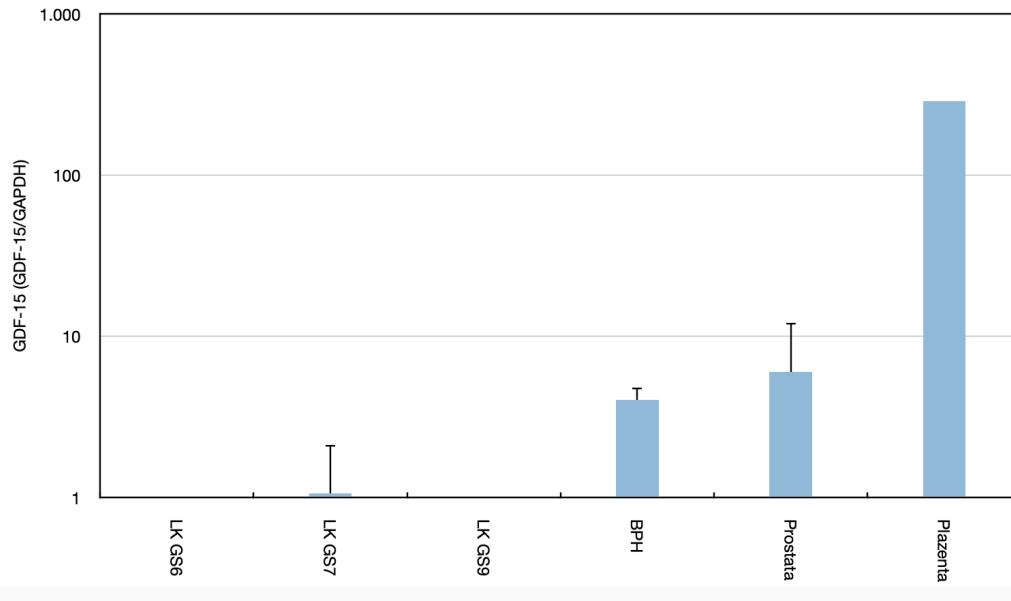


Abbildung 44: GDF-15 Expression

Relative GDF-15 Expression (normalisiert auf GAPDH) in LK, PCa bzw. Plazenta, gruppiert nach GS der LK (GS6 n=2, GS7 n=2, GS9 n=1), BPH (n=2), Prostata (n=2) bzw. Plazenta (n=1). Mittelwerte +SEM.

#### 4.7.2 PD-L1 Expression

In drei der fünf Lymphknotenpräparaten konnte mittels RT-qPCR eine Expression von PD-L1 festgestellt werden (s. Abbildung 45). Dabei ist die Expression im LK 7232/10 (GS6; r.E.: 7637,3) 5-fach so hoch wie im LK 11670/10 (GS6; r.E.: 1528,2). In den LK des GS7 (9507/07, 12449/19) wurde keine PD-L1 Expression erkannt. Die PD-L1-Expression im LK 7446/10 (GS9; r.E.: 6626,9) ist um das 0,87-fache niedriger als im LK 7232/10 (GS6). In den BPH-Präparaten wurde im Präparat BPH8 eine 4,5-fach höhere PD-L1-Expression gemessen (r.E.: 2099,9), als im Präparat BPH9 (r.E.: 462,6). Im PCa-Präparat 9508/07 (GS7; r.E.: 11287,4) wurde eine 12,1-fach höhere PD-L1 Expression mittels RT-qPCR ermittelt als im PCa-Präparat 7447/10 (GS9; r.E.: 932,3). Die höchste PD-L1-Expression wurde im Plazentapräparat ermittelt (r.E.: 26579,6) (s. Abbildung 45).

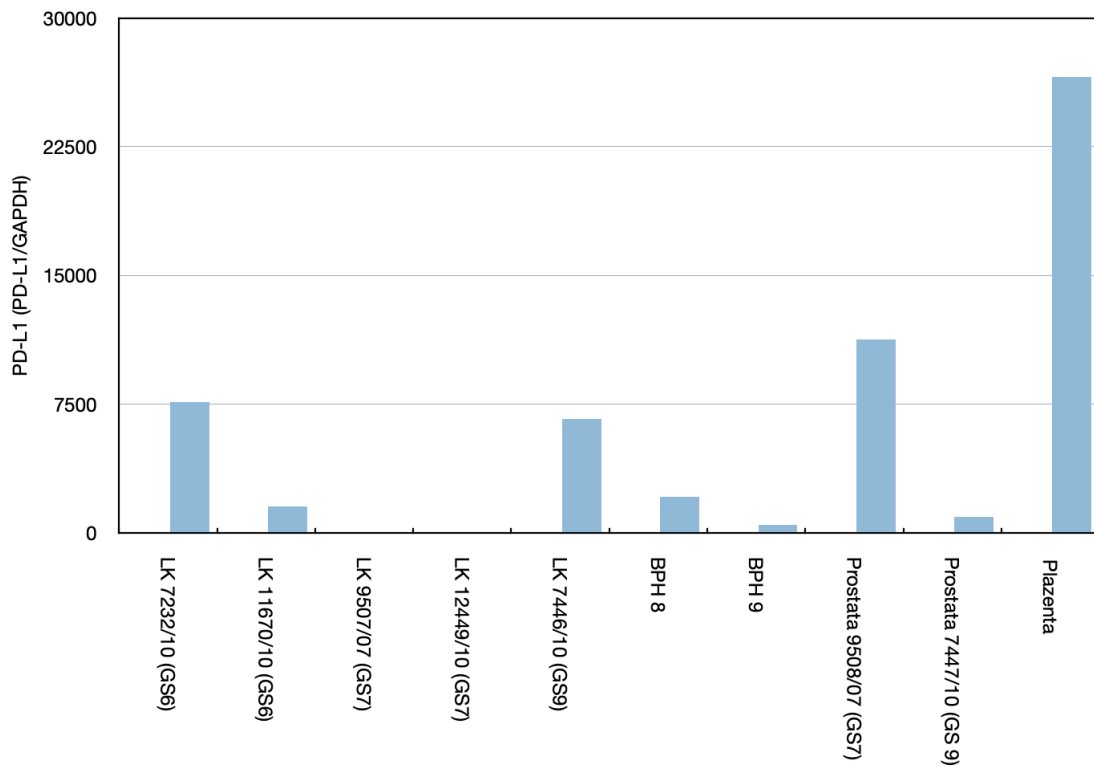


Abbildung 45: PD-L1 Expression

Relative PD-L1 Expression (normalisiert auf GAPDH) in LK, PCa bzw. Plazenta. Mittelwerte.

Die Zusammenfassung der untersuchten LK in ihre zugehörigen GS zeigt im GS 9 (r.E.: 6626,9) eine 1,45 höhere PD-L1 Expression als im GS6 (r.E.: 4582,7) (s. Abbildung 46). Zudem ist die PD-L1 Expression in LK der GS9-PCa Patienten 5,2-fach höher als die PD-L1 Expression der BPH-Präparate (r.E.: 1281,3) und 1,1-fach höher als die PD-L1 Expression der PCa-Präparate (r.E.: 6109,9) (s. Abbildung 46). Die höchste gemessene PD-L1 Expression liegt in der Plazenta vor (r.E.: 26579,6) und ist um den Faktor 4,0 höher als im LK GS9 (s. Abbildung 46).

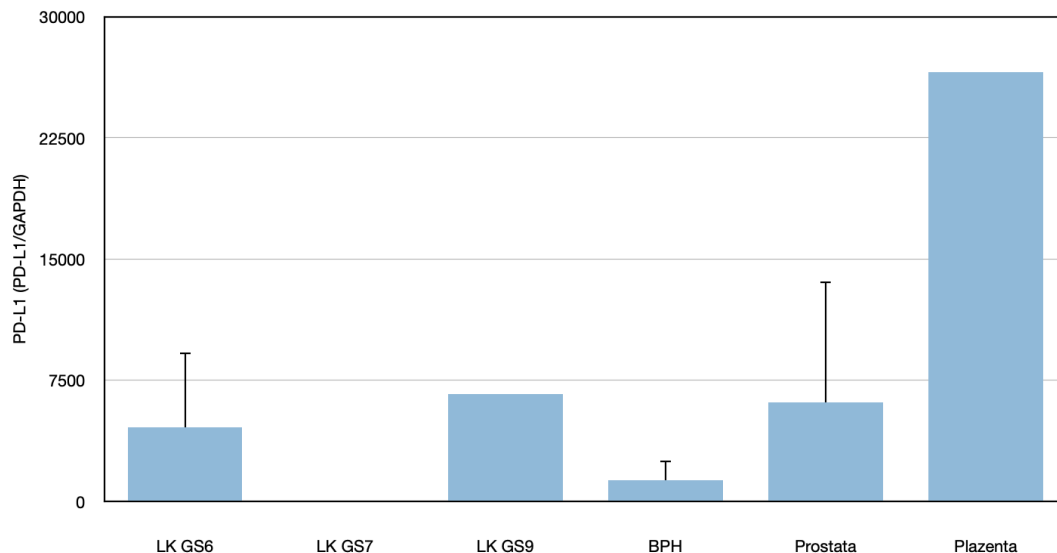


Abbildung 46: PD-L1 Expression

Relative PD-L1 Expression (normalisiert auf GAPDH) in LK, PCa bzw. Plazenta, gruppiert nach GS der LK (GS6 n=2, GS7 n=2, GS9 n=1), BPH (n=2), Prostata (n=2) bzw. Plazenta (n=1 Mittelwerte +SEM).

#### 4.7.3 Expression von PGP9.5

Eine PGP9.5 Expression konnte in den fünf Lymphknoten lediglich im Präparat 9507/07 (GS7) festgestellt werden (r.E.: 577,88) (s. Abbildung 47). Eine im Vergleich dazu, um den Faktor 8,7 niedrigere PGP 9.5 Expression konnte im BPH 8 (r.E.: 66,4) und um den Faktor 2,3 niedrigere PGP9.5 Expression im BPH9 Präparat (r.E.: 247,5) ermittelt werden. In den untersuchten PCa-Präparaten 9508/07 (GS7, r.E.: 1,1) und 7747/10 (GS9; r.E.: 119,5) wurden stark variierende PGP9.5 Expressionen gefunden. Im PCa-Präparat 9508/07 lag im Vergleich zu dem aus dem gleichen Spender stammenden LK (9507/07) eine 525,3-fach niedrigere PGP 9.5 Expression vor, wohingegen die PGP 9.5 Expression im PCa-Präparat 7747/10 (GS9) nur um den Faktor 4,8 niedriger als im LK 9507/07 war (s. Abbildung 47).

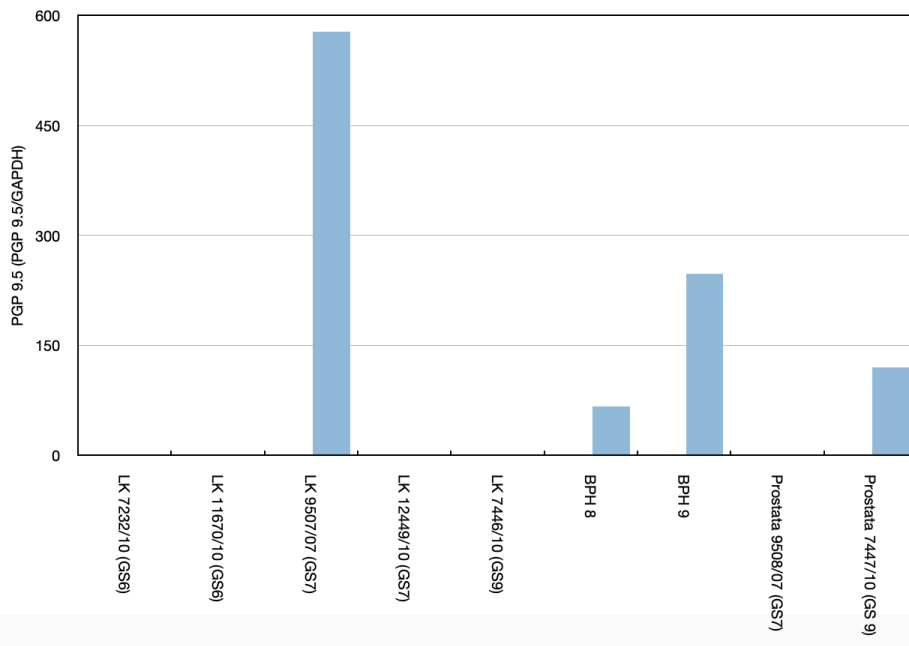


Abbildung 47: PGP 9.5 Expression

Relative PGP 9.5 Expression (normalisiert auf GAPDH) in LK, BPH bzw. PCa. Mittelwerte.

In den LK des GS 6 und 9 liegt keine PGP 9.5 Expression vor. In den LK des GS7 (r.E.: 288,9) wurde eine um den Faktor 5,3 höhere mittlere PGP9.5 Expression als in den untersuchten BPH-Präparaten (r.E.: 76,8) und um den Faktor 6,9 höher als in den untersuchten PCa-Präparaten (r.E.: 59,0) gefunden.

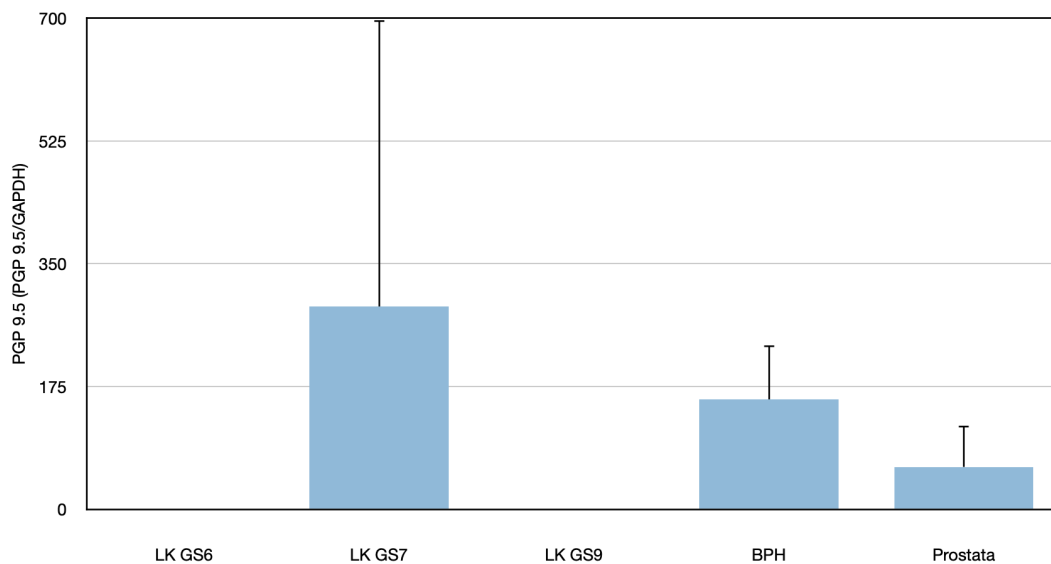


Abbildung 48: PGP 9.5 Expression

Relative PD-L1 Expression (normalisiert auf GAPDH) in LK, PCa bzw. Plazenta, gruppiert nach GS der LK (GS6 n=2, GS7 n=2, GS9 n=1), BPH (n=2), Prostata (n=2) bzw. Plazenta (n=1). Mittelwerte +SEM.

## 5. Diskussion

Der Wachstums- und Differenzierungsfaktor 15 (GDF-15) ist als divergentes Mitglied der TGF- $\beta$  Superfamilie an zahlreichen physiologischen Prozessen des menschlichen Körpers beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen wird er nur in der Plazenta konstitutiv hoch exprimiert (Ago und Sadoshima, 2006), während in bestimmten pathologischen Zuständen wie bspw. Atherosklerose, Herzversagen bzw. Diabetes mellitus der stress-induzierte GDF-15 auch generell vermehrt exprimiert wird. Die erhöhte GDF-15 Expression unter pathologischen Zuständen, wie der Tumorprogression und -metastasierung ist Gegenstand vieler Forschungen (Breit et al., 2011; Corre et al., 2013; Spanopoulou and Gkretsi, 2020). Neben pleiotropen Effekten von GDF-15 konnte eine Korrelation zwischen hohen GDF-15 Konzentrationen im Serum oder Gewebe von Patienten und einem verkürzten Gesamtüberleben beobachtet werden (Spanopoulou und Gkretsi, 2020). Interessanterweise wird in einigen Publikationen GDF-15 eine Beteiligung an der Metastasierung zugeschrieben (Spanopoulou und Gkretsi, 2020; Li et al., 2015). Beim PCa wurde diesbezüglich in vivo eine Reorganisation der Aktinfilamente und in vitro ein vermehrtes Auftreten von Metastasen beschrieben (Senapati et al., 2010). Die in der bisherigen Literatur beschriebenen Befunde konzentrieren sich dabei hauptsächlich auf Untersuchungen von Serum-Konzentrationen oder von Tumorgewebe. In dieser stand die immunhistologische Untersuchung der Mikrometastasen in regionären Lymphknoten, den sog. Wächter-Lymphknoten (Sentinel-Lymphknoten) der Prostatakrebspatienten, im Fokus. Um das Verständnis der Rolle von GDF-15 bei der Metastasierung zu verbessern, wurde auch der Zusammenhang mit immunologischen Aspekten, insb. der M $\Phi$ - und B-Lymphozyteninfiltration, sowie das Vorkommen PD-L1 immunreaktiver Zellen und der Innervation untersucht.

### 5.1 Diskussion des Materials und der Methodik

Die meisten, der in der Literatur beschriebenen Untersuchungen, welche sich mit einer GDF-15 abhängigen Metastasierung befassen, basieren auf Analysen von Zelllinien (Senapati et al., 2010; Bruzzese et al., 2014; Wang et al., 2019), sowie aus von Mäusen stammendes Gewebe (Tsui et al., 2012; Husaini et al., 2012) oder humanen Patientenserum (Windrichova et al., 2017; Brown et al., 2009). Das in dieser Arbeit verwendete humane, formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe der Lymphknoten gibt, im Vergleich zum Tiermodell, eine spezifischere Aussage über das humane PCa. Allerdings limitiert die Abhängigkeit von humanen Spendern die Verfügbarkeit von Gewebe, sodass für die vorliegende Arbeit nur eine geringe Anzahl von Proben (n=7) zu Verfügung stand, wodurch statistische Analysen nicht möglich waren. Weitere Spenden von PCa-Patient\*innen in Form von formalin-fixierten

Lymphknoten oder Patientenseren wurden dem Institut der Anatomie und Zellbiologie leider nicht zur Verfügung gestellt.

Die Basis dieser Arbeit lag deshalb in der immunhistochemischen Untersuchung des vorhandenen Probenmaterials. Immunhistochemische Färbemethoden sind seit Jahren etablierte Nachweisverfahren zur Darstellung von Antigenen im Gewebematerial. Hierbei bedarf die Lagerung der Schnittpräparate keine aufwendige Kühlung und die Analyse der Proben kann unter einem laborüblichen Lichtmikroskop erfolgen. Dennoch nachteilig anzusehen, ist die unterschiedliche Sensitivität und Spezifität der verwendeten Antikörper. Zur spezifischen Färbung der einzelnen Antikörper wurden nach Vorversuchen unterschiedliche Signalverstärkungsmethoden eingesetzt, um ein ausreichend starkes Signal zu erhalten. Im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen wird dadurch das Hintergrundsignal erhöht. Außerdem ist bei der Lagerung der formalin-fixierten Proben eine Veränderung der Epitope der Antigene nicht ausgeschlossen, wodurch trotz Demaskierungsverfahrens eine Reaktion des Antikörpers mit dem Antigen ausbleiben kann.

## **5.2 HE-Färbungen**

Die HE-Färbung vermittelt einen generellen Überblick des vorliegenden Lymphknoten-Gewebes. Es ist erkennbar, dass die vorliegenden Lymphknotenbiopsien viel Fettgewebe enthalten und das lymphatische Gewebe reich an Fettzellen ist. Zur Berechnung der Fläche des lymphatischen Gewebes an der Gesamtfläche des Präparates musste die nicht-lymphatische Fläche von der Gesamtfläche subtrahiert werden. Das zahlreiche Vorkommen von Fettgewebe im Schnittpräparat limitierte die Menge des insgesamt vorkommenden, lymphatischen und somit auszuwertenden Gewebes. Darüber hinaus ist zwischen den Lymphfollikeln ein unregelmäßiger Aufbau erkennbar, welcher aufgrund nicht oder nur unregelmäßig vorhandener Zellkerne das Hämatoxylin weniger gebunden hat und dadurch heller erscheint. Künftig wäre zur Bestimmung des Vorliegens etwaiger Mikro- bzw. Makrometastasen, eine Cytokeratin- bzw. anti-PSA IHC hilfreich (Litjens et al., 2018; Potter et al., 2000), welches eine genauere Aussage über die Malignität der vorliegenden LK zulassen würde.

## **5.3 GDF-15**

Die Metastasierung von Krebszellen stellt für an PCa erkrankte Patienten eine enorme Prognoseverschlechterung dar (Shou et al., 2018; Beyer et al., 2021). Umso entscheidender ist demnach die Wahl der Therapie, denn nur durch eine radikale Prostatektomie zusammen mit der Lymphknotenentfernung kann eine weitere Metastasierung mit großer Wahrscheinlichkeit inhibiert werden. Eine operative Lymphadenektomie sollte jedoch nur bei der Wahl der kurativen Therapieform durchgeführt werden.



Präoperativ kann mittels PSA-Wert, DRU-Status, Ausmaß des PCa und Gleason-Score in der Biopsie und bildgebenden Verfahren (TRUS, ggf. MRT) die Wahrscheinlichkeit der lymphatischen Ausbreitung ermittelt werden. Diagnostisch und auch therapeutisch stellt die Lymphadenektomie die einzig sichere Form des N-Stagings und der Entfernung der Metastasen dar (Schmelz et al., 2014).

Da GDF-15 nach neuesten Erkenntnissen einen maßgeblichen Einfluss auf die Metastasierung von Krebszellen zu nehmen scheint (Spanopoulou and Gkretsi, 2020), wurden die LK-Biopsien von PCa Patienten unterschiedlicher GS auf die Existenz GDF-15 immunreaktiver Zellen untersucht. Bislang wurden GDF-15 beim PCa sowohl Fern- (Husaini et al., 2012), als auch Knochen- (Wang et al., 2019) metastasen-induzierende Eigenschaften zugeschrieben. Ferner wurde die Ansteuerung des molekularen Wirkmechanismus des FAK-RhoA Signalwegs identifiziert, welcher bei einer GDF-15 Überexpression die Metastasierung induziert. Ebenso konnten Untersuchungen von Sadasivan et al. die Bedeutung von GDF-15 als Biomarker unterstreichen, wobei sie herausstellten, dass insbesondere unterschiedliche Expressionen von GDF-15 in tumor-angrenzenden Regionen und dem Tumor selbst, der stärkste Prädiktor für ein BCR seien (Sadasivan et al., 2020). Durch einen Nachweis von GDF-15 in PCa metastasierenden Lymphknoten würde die Rolle von GDF-15 als Biomarker für bereits metastasierten Krebs zunehmen, wodurch die bereits bestehende Diagnostik ergänzt werden könnte. Bislang gibt es keine Arbeiten, die sich explizit mit den metastasierten Lymphknoten der PCa-Patienten und dem dortigen Vorkommen GDF-15 immunreaktiver Zellen beschäftigen.

Ein Nachweis von GDF-15 im metastasierten Lymphknoten konnte in dieser Arbeit immunhistochemisch leider nicht erzielt werden. Dementsprechend konnte folglich auch keine Analyse der Morphologie, Dichte und Lokalisation erfolgen. Da – entgegen der Hypothese – GDF-15 immunreaktive Zellen in metastasierenden Lymphknoten immunhistologisch nicht nachweisbar waren, wurde im Anschluss an immunhistochemie Untersuchungen eine RT-qPCR Analyse der Lymphknotenpräparate durchgeführt, um eine mögliche GDF-15 Expression zumindest auf mRNA Ebene zu detektieren. RT-qPCR Analysen zeigten allerdings lediglich in einem einzigen der untersuchten Lymphknoten (GS7) eine äußerst niedrige GDF-15 Expression, sodass selbst auf RNA Ebene in 4 von 5 Fällen keine GDF-15 Expression gefunden wurde und damit diese molekularbiologischen Ergebnisse die immunhistochemischen Befunde zusätzlich unterstützen.

Deshalb deuten unsere bisherigen Ergebnisse eher weniger auf eine Beteiligung von GDF-15 im metastasierten Lymphknoten beim PCa hin. Dieses Ergebnis schließt allerdings nicht aus, dass GDF-15 an den zellulären Vorgängen im PCa beteiligt ist (Spanopoulou and Gkretsi, 2020; Senapati et al., 2010). Um eine verlässliche Aussage bezüglich des Vorkommens von GDF-15 im metastasierten Lymphknoten und dem Verhalten in Abhängigkeit der GS treffen zu können, bedarf es weiterer Studien mit größerer Anzahl von Patientenproben, sowohl PCa-, als auch metastasierender LK-

Biopsien, sowie Serum-/Plasmaproben, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Dichte GDF-15 immunreaktiver Zellen im PCa, in metastasierenden LK und möglicherweise der Serum-/Plasma-Konzentration untersuchen zu können und belastbare Daten zu generieren.

## 5.4 PD-L1

Die Entdeckung des Immuncheckpoint Moleküls PD-1 und seines Liganden PD-L1 ermöglichen in der Krebstherapie neue, vielversprechende Therapiemöglichkeiten. Das PCa, insb. das mCRPC zeigt jedoch noch kein zuverlässiges Ansprechen auf die Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (Topalian et al., 2012). Bislang besteht in der Literatur eine große Diskrepanz bezüglich der Expression von PD-L1 im PCa, welche von 8% bis 92% variiert (Calagua et al., 2017; Baas et al., 2017; Martin et al., 2015; Gevensleben et al., 2016). Diese Frage zu klären, scheint in Anbetracht der Tatsache, dass PD-L1 positive Tumoren mit einer höheren Rate auf die Therapie ansprechen, von entscheidender Bedeutung zu sein (Sunshine und Taube, 2015). In der vorliegenden Arbeit zeigen die IHC-Untersuchungen der metastasierten Lymphknoten, dass in allen untersuchten Proben immunreaktive PD-L1+-Zellen vorhanden sind. Molekularbiologische Expressionsanalysen mittels RT-qPCR zeigten eine PD-L1 Expression in der Mehrzahl der Lymphknoten, allerdings nicht in den Proben 9507/07 und 12449/10. Auch Dammeijer et al. konnten PD-L1 in tumordrainierenden Lymphknoten vorfinden und suggerieren, dass ein therapeutisches Ansteuern dieser, eine effektive anti-Tumor-Immunantwort generiert (Dammeijer et al., 2020).

Unterschiedliche Ergebnisse aus den beiden Untersuchungsmethoden hinsichtlich einer Tendenz zur PD-L1 Expression in Abhängigkeit der GS, lassen keinen Trend aus der vorliegenden Arbeit ableiten. In Untersuchungen zum PCa konnte diese Korrelation hingegen dargelegt werden (Haffner et al., 2018; Gevensleben et al., 2016). In der Studie von Haffner et al. konnte eine Tendenz zu höheren PD-L1 Expressionen in höher-klassifizierten Gruppen, insb. GS4 und 5 erkannt werden ( $p=0,08$ ) (Haffner et al., 2018). Eine hohe PD-L1 Immunreaktion konnte außerdem im mCRPC (31,6%) beobachtet werden, welches auf eine Beteiligung von PD-L1 an der Metastasierung hindeutet (Haffner et al., 2018). Auch Gevensleben et al. zeigten in primären PCa eine hohe PD-L1 Expression (52.2% der Proben), welche positiv mit der Proliferation und den GS korreliert (Gevensleben et al., 2016).

Ob diese Korrelation auch in Lymphknoten vorhanden ist und inwieweit ein Zusammenhang mit GDF-15 besteht, sollte in größer angelegten Studien überprüft werden. In diesem Rahmen wäre eine Identifizierung der PD-L1 Zellen ebenso interessant, um ein genaueres immunologisches Verständnis zu erlangen. Darüber hinaus deuten neuere Studien darauf hin, dass GDF-15 die PD-L1 Expression über den SMAD2/3 Signalweg im Glioblastom induziert (Peng et al., 2019). Da die

Ergebnisse dieser Arbeit keine Expression von GDF-15 in Lymphknoten aufweisen, kann die Theorie für dieses Gewebe aktuell eher vernachlässigt werden, stellt aber für das PCa, in welches GDF-15 nachgewiesen werden konnte, eine interessante Fragestellung dar.

## 5.5 CD68<sup>+</sup> (M1-)Makrophagen

MΦ sind in allen körperlichen Geweben und Organen vorhanden, in welchen sie teils organ-spezifische Funktionen ausüben (Welsch et al., 2018). MΦ in Lymphknoten, besonders im metastasierten Lymphknoten, kommen durch die Lymphe in Kontakt mit den Tumorzellen und stellen eine wichtige Barrierefunktion des Immunsystems dar (Louie und Liao, 2019). Sowohl bei viralen als auch bakteriellen Infektionen können MΦ die Ausbreitung von Pathogenen limitieren, indem sie direkt oder indirekt weitere angeborene Immunzellen im LK aktivieren oder über die Aktivierung von B- oder T-Zellen die spezifische Immunantwort aktivieren (Louie und Liao, 2019). Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere sich im subkapsulären Sinus des LK befindliche MΦ, sog. subkapsuläre Sinus (subcapsular sinus, SCS) -MΦ bei der krebsbedingten Regulation des Immunsystems beteiligt sind, wobei sie sich verschiedenen Mechanismen bedienen. Lymph-getragene Pathogene werden entweder durch eine Weiterleitung der Antigene an B-Zellen, eine Produktion von Cytokinen, welche eine Signalkaskade auslösen und dendritische, neutrophile oder natürliche Killerzellen rekrutieren oder unter bestimmten Bedingungen auch durch eine Präsentation der Antigene an T-Zellen versucht zu eliminieren. (Louie und Liao, 2019). Denkbar wäre, dass Zellen, welche das in dieser Arbeit untersuchte Zytokin GDF-15 exprimieren, im Rahmen einer von SCS-MΦ ausgelösten Immunreaktion, zerstört wurden und dadurch ein immunhistochemischer Nachweis von GDF-15 nicht erfolgen konnte.

In dieser Arbeit wird sich auf die Untersuchung proinflammatorischer CD68<sup>+</sup> MΦ in metastasierenden Lymphknoten von PCa Patienten konzentriert. Diese konnten in allen untersuchten Lymphknotenpräparaten von Patienten unterschiedlicher GS nachgewiesen werden. Ihr vornehmlich in Akkumulationen vorkommendes Auftreten spricht dafür, dass die pro-inflammatorische Zytokinproduktion ihrerseits, über einen positiven Feedback-Mechanismus weitere MΦ rekrutiert hat (Hao et al., 2012).

Hinsichtlich des prozentualen Flächenanteils dieser CD68<sup>+</sup> M1-MΦ in Abhängigkeit der GS ist im Lymphknoten ein Trend zu erkennen. Der Flächenanteil der CD68<sup>+</sup>-MΦ steigt von GS6 zu GS7 leicht an und reduziert sich bei GS9 wiederum. Auch Lucia Kilian konnte in diesbezüglich untersuchten BPH- und PCa-Proben feststellen, dass die Dichte der M1-MΦ von GS6 bis GS8 zunimmt, im GS9 allerdings wieder gesunken ist (Kilian, 2016). Publierte Studien zum PCa, stellen ebenfalls eine Korrelation zwischen der steigenden Dichte von M1-MΦ und der GS dar, gleichzeitig konnte auch ein Zusammenhang zwischen einer niedrigen M1-MΦ-Dichte und einem invasiven Tumorwachstum festgestellt werden (Sfanos et al., 2014; Shimura et al., 2000). Das

niedrigere Vorkommen von M1-M $\Phi$  in Lymphknoten von PCa Patienten mit GS 9 wäre auch durch ein verändertes Zytokinmilieu im progressiven Tumorstadien erklärbar, wodurch sich der vorherrschende M $\Phi$ -Phänotyp von M1- zu M2- M $\Phi$  ändern würde (Salmaninejad et al., 2019). Zur Bestätigung dieser These im Lymphknoten wäre eine weitere Analyse dieser unter Einbeziehung einer CD163-IHC zur Analyse der M2-M $\Phi$  notwendig. Ebenfalls benötigt man eine Ausweitung auf eine größere Anzahl von Lymphknotenpräparate inkl. physiologischem Referenzgewebe.

## 5.6. B-Lymphozyten

Das Verständnis der Rolle des Immunsystems bei der Modulation solider maligner Erkrankungen hat in den letzten Jahren erheblich zugenommen. Es wurde gezeigt, dass das angeborene und auch das adaptive Immunsystems Reaktionen gegen PCa-Zellen auslösen (May et al., 2011; Woo et al., 2014). Bei der Behandlung des PCa wirken Immuntherapeutika durch eine Stärkung des Immunsystems des Wirts (May et al., 2011; Woo et al., 2014). Aus diesem Grund ist es wichtig, Leukozyten, wie B-Lymphozyten in den Lymphknoten und ihre etwaige Beziehung zu Krebs zu analysieren. Der Lymphknoten ist der Ort, an dem naive B-Zellen nach Antigenkontakt zu Plasmazellen reifen. Dieses geschieht in den B-Zellfollikeln im Cortex der Lymphknoten (Welsch et al., 2018). In der vorliegenden Arbeit konnten dementsprechend in allen untersuchten Lymphknotenpräparaten unterschiedlicher GS CD19<sup>+</sup>-Lymphozyten nachgewiesen werden. Auffällig ist hierbei, dass in GS 6 der Flächenanteil der B-Lymphozyten deutlich geringer ist, als in den GS 7 und GS9. Dieser Trend könnte ein Indiz dafür sein, dass B-Lymphozyten die Tumorprogression fördern. Allerdings wurde in dieser Arbeit nicht geklärt, welche Antikörper von den vorhandenen B-Lymphozyten produziert werden. So ist einerseits denkbar, dass wie Carmi et al. beschrieben hat, die von B-Zellen produzierten IgG Antikörper, in Kombination mit einer Stimulation der dendritischen Zellen eine zytotoxische T-Zell Antwort generieren, welche das Tumorwachstum inhibieren (Carmi et al., 2015). Außerdem wurde in einer weiteren Untersuchung zur Charakterisierung von B-Zellen in Lymphknoten eine erhöhte Frequenz von Plasmazellen in metastasierten Lymphknoten im Vergleich zu nicht-metastasierten Lymphknoten aufgewiesen (Zirakzadeh et al., 2013). Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Li et al., welche in Lymphknoten der Abflusswege von Brustkrebspatientinnen weniger B-Lymphozyten in der Marginalzone auffinden konnten als in gesunden Lymphknoten. Festgestellt wurde allerdings, dass tumor-assoziierte B-Zellen die Angiogenese und somit die Tumorprogression fördern (Li et al., 2020). In beiden Studien konnte gezeigt werden, dass sich zwar die Gesamtanzahl der B-Lymphozyten ändert, entscheidend für ihre zelluläre Wirkung jedoch der vorherrschende Phänotyp der B-Zelle ist. Zum besseren Verständnis der spezifischen Wirkungen der B-Lymphozyten bedarf es in künftigen Studien eine weitere Analyse mit B-Lymphozyten wirk-spezifischeren Antikörpern,

bspw. CD21, CD22, CD24a, CD27, CD38, CD72, CD79, wie sie auch in den publizierten Arbeiten verwendet wurden (Zirakzadeh et al., 2013; Li et al., 2020).

Das vermehrte Vorkommen von B-Lymphozyten in den höhergradigen GS 7 und 9 steht des Weiteren im Einklang zu Studien, welche eine PD-1 Expression auf B-Lymphozyten zeigen und folglich zur Immunevasion des Tumors beitragen (Thibult et al., 2013; Okazaki et al., 2001). In diesem Zusammenhang wäre eine Identifizierung der vorhandenen B-Lymphozyten im Rahmen einer Doppelfärbung mit CD19 und PD-1 bzw. PD-L1 eine interessante Fragestellung. Eine weitere Inhibierung des Immunsystems mit darauffolgender Tumorprogression kann durch eine von Bregs induzierte Zytokinsekretion hervorgerufen werden (Lindner et al., 2013), was eine weitere Erklärung für das gesteigerte Vorkommen von B-Lymphozyten in den LK von von PCa-Patienten mit GS 7 und 9 darstellt.

## **5.7 Innervation - PGP9.5**

PGP9.5 ist spezifisch in den Neuronen und Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems exprimiert (Leiblich et al., 2007). Es ist bekannt, dass die Methylierung des PGP9.5-Promotors im Primärtumor stark mit Lymphknotenmetastasen und einer folglich schlechten Prognose korreliert (Mandelker et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte in den untersuchten Lymphknoten von Patienten unterschiedlicher GS, mit Hilfe der Immunhistochemie in keinem Präparat PGP9.5 immunreaktive Zellen gefunden werden. Ausschließlich in dem Lymphknotenpräparat 9507/07 wurde mittels molekularbiologischer qRT-PCR Technik eine relative PGP9.5 Expression von 577.9 im Verhältnis zu GAPDH nachgewiesen. Beide Methoden führen dennoch zu einem kongruenten negativem Nachweis von PGP 9.5 im Lymphknoten. Somit lies sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit weder ein Zusammenhang zwischen der Progression des PCa bzw. einer Metastasierung und der Innervation, noch ein Zusammenhang zwischen der Innervation und den untersuchten Immunzellen oder GDF-15 zeigen. Auch eine von Decker et al. beschriebene Reaktivierung ruhender PCa-Zellen durch eine sympathische Innervation (Decker et al., 2017), konnte in dieser Arbeit aufgrund fehlenden Nachweises von Nervenfasern in den untersuchten Lymphknoten nicht bestätigt werden.

## **5.8. Ausblick**

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde zu humanen Lymphknoten von PCa-Präparaten unterschiedlicher Gleason Scores (GS 6 – 9), die mittels IHC-Färbungen und Expressionsanalysen generiert wurden, können als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Um statistisch signifikante Ergebnisse unter Anwendung der etablierten Methoden zu generieren, bedarf es allerdings einer deutlichen Erhöhung der Fallzahlen der LK-Proben.

Insbesondere das in dieser Arbeit im Lymphknoten nachgewiesene PD-L1 bietet weitere Ansatzpunkte für künftige Untersuchungen und stellt sowohl diagnostisch als auch prognostisch einen wichtigen Aspekt dar. Von besonderem Interesse ist dabei die Identifizierung der immunreaktiven PD-L1 Zellen, welches mit einer Ausweitung der bereits durchgeführten IHC unter zusätzlichen Analysen von T-Lymphozyten (CD4 und CD8) oder B-Lymphozyten (CD19) mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbungen realisierbar wären. Darüber hinaus kann durch eine immunhistochemische Detektion von Mikrometastasen im Rahmen einer Doppelfärbung mit PD-L1 Antikörpern ein etwaiger topographischer Zusammenhang zwischen PD-L1 und Mikrometastasen im LK geklärt werden. Durch eine ausgeweitete Analyse der im Lymphknoten nachgewiesenen Immunzellen, insbesondere auf M2-M $\Phi$  und Subklassifizierungen von B-Lymphozyten, kann eine weitere Charakterisierung der vorliegenden Immunreaktion, bezogen auf die Pathogenität unterschiedlicher GS erfolgen. Hierbei können Expressionsanalysen die Ergebnisse der IHC, wie in der vorliegenden Arbeit ergänzen.

Zur Verifizierung der negativen Ergebnisse bezüglich des Vorkommens von GDF-15 und PGP 9.5 im LK, bedarf es einer Ausweitung des Probenmaterials. Zusätzlich stellt die Verwendung von Kryo-Gewebe anstelle von in Paraffin-eingebettetes Gewebe sicherlich eine qualitative Verbesserung dar, welches die Ergebnisse dieser Arbeit validieren könnte. Diesbezüglich wünschenswert wäre eine künftige prospektive Studie mit höheren Fallzahlen, welche sowohl Biopsien von PCa, metastasierten LK von PCa-Patienten sowie Serum bzw. Plasma von PCa Patienten hinsichtlich der Dichte GDF-15-immunreaktiver Zellen im Zusammenhang mit steigenden GS beleuchten würde.

## 5.9. Zusammenfassung

Das PCa ist in Deutschland der häufigste maligne Tumor bei Männern und stellt unter den Krebstodesursachen beim Mann die dritthäufigste Entität dar. Eine enorme Prognoseverschlechterung geht mit dem Zustand des metastasierten PCa als systemische Erkrankung einher. Bei der lymphatischen Metastasierung werden Sentinel-Lymphknoten, welche das lymphatische Abflusssystem des Tumors als erstes filtern, von disseminierten Tumorzellen besiedelt, sodass nach Proliferation eine solide Metastase ausgebildet wird.

In vielen medizinischen Forschungsbereichen, u.a. der Erforschung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie der Krebsforschung hat in den letzten Jahren der Wachstums-Differenzierungs-Faktor-15 (Growth Differentiation Factor-15; GDF-15) zunehmend an Bedeutung gewonnen. Beim PCa konnte ihm eine Beteiligung an diversen zellulären Mechanismen nachgewiesen werden. Insbesondere bei hohen GDF-15 Konzentrationen konnte eine vermehrte Metastasierung beobachtet werden, was im Einklang zu der pleiotropen Wirkung von GDF-15 mit einer Inhibierung der Karzinogenese in frühen Krebsstadien und einer Promotion des Tumors in späten Stadien steht. Ferner konnten Untersuchungen zur Entstehung und Progression des PCa Zusammenhänge zwischen der Innervation, sowie der Infiltration verschiedener Immunzellen, u.a. M1-Makrophagen (M $\Phi$ ) und B-Lymphozyten aufweisen.

Die Tatsache, dass disseminierte Tumorzellen in Lymphknoten metastasieren, wurde als Grundlage dieser Arbeit genommen, um zu untersuchen, ob die im PCa gegenüber benigner Prostatahyperplasie erhöhte Dichte GDF-15 immunreaktiver Zellen (eigene, bisher nicht publizierte Ergebnisse der AG) auch in metastasierenden Lymphknoten aufzufinden ist, abhängig von der Malignität (GS). Gleichmaßen wurde die Innervation sowie die Infiltration von Immunzellen (M1-M $\Phi$  und B-Lymphozyten) Malignitäts-abhängig analysiert. Zum Vorkommen des Immuncheckpoint Ligand PD-L1, welcher eine Inhibierung der Immunantwort und folglich ein besseres Überleben des Tumors initiiert, gibt es bislang im PCa sowie in metastasierten Lymphknoten anderer Krebsentitäten widersprüchliche Aussagen. Aufgrund der hohen klinischen Relevanz, welche mit dem Ansprechen auf eine Immuntherapie einhergeht, wird in dieser Arbeit auch die PD-L1-Expression sowie der PD-L1-Immunreaktivität untersucht.

Die Lymphknotenbiopsien wurden mittels Immunhistochemie und RT-qPCR untersucht.

Molekularbiologische und immunhistochemische Analysen metastasierender Lymphknoten des PCa zeigten, dass GDF-15 wider Erwarten dort weder auf mRNA- noch Proteinebene zu existieren scheint. Somit konnten weitere Arbeitshypothesen, wie der Zusammenhang zwischen in Lymphknoten vorkommenden M1-M $\Phi$ , B-Lymphozyten, PD-L1 oder der Innervation und GDF-15 nicht eingehender untersucht werden. Des Weiteren konnte eine Immunreaktivität von PGP9.5, ein Antikörper gegen

Neurone und neuroendokrine Zellen, mittels der IHC in keinem Präparat und eine PGP9.5-Expression mittels der molekularbiologische Expressionsanalyse in nur einem Lymphknotenpräparat gezeigt werden. Somit scheint in metastasierenden Lymphknoten bei PCa – im Gegensatz zum PCa an sich – eine Metastasierung unabhängig von der Innervation zu sein. Weitere molekularbiologische und immunhistochemische Analysen zeigten, dass PD-L1 (Ligand des Immuncheckpoints) sowohl auf RNA Ebene, als auch auf Proteinebene in in drei von fünf Präparaten (RT-qPCR) bzw. gar in allen Lymphknotenpräparaten exprimiert wird. Eine Tendenz zur PD-L1 Expression in Abhängigkeit der GS, kann aufgrund der geringen Fallzahl allerdings nicht abgeleitet werden.

Außerdem erfolgten immunhistochemische Untersuchungen unter Verwendung von Antikörpern gegen M1-MΦ (CD68) und B-Lymphozyten (CD19). M1-MΦ kommen vornehmlich in Akkumulationen vor, wobei unsere Ergebnisse keine vermehrte bzw. reduzierte Immunreaktivität, abhängig nach GS ausweisen können. Die immunhistochemische Detektion von CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten erfolgte in allen Lymphknotenpräparaten, allerdings zu einem größeren prozentualen Flächenanteil in GS7 und GS9 als im GS6.

Da GDF-15 an der Malignität metastasierender Lymphknoten beim PCa maßgeblich beteiligt sein soll, zeigen unsere Ergebnisse erstmals, dass GDF-15 in LK weder auf RNA noch auf Proteinebene exprimiert wird. Ferner bestätigen unsere Ergebnisse die Immunreaktivität sowie die Expression von PD-L1 im metastasierten Lymphknoten von PCa-Patienten, welches einen Ansatzpunkt zur weiteren Erforschung therapeutischer Möglichkeiten des metastasierten PCa bietet.



## 5.10. Summary

Prostate cancer is the most common form of tumor found in men in Germany and is the third most common cause of death. When the tumor becomes metastatic and displays a systematic disease, there is an even worse prognosis. In the process of lymphatic metastasis, the sentinel-lymph nodes, which drain the primary location of the tumor, are infiltrated by disseminated tumor cells, that after proliferation form a solid metastasis.

In recent years, the cytokine Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) has gained importance in medical research, especially in cardiovascular diseases and cancer. In the field of cancer research, it could be proven to participate in many cellular mechanisms in prostate cancer. Especially with high GDF-15 concentrations, one could see increased metastasis coinciding with its pleiotropic effects in cancer in general. In the early stages of cancer GDF-15 seems to suppress the carcinogenesis while in later stages, it seems to promote it. Furthermore, investigations into the development and progression of prostate cancer could prove a correlation between the innervation and the infiltration of different immune cells, such as M1-macrophages (M $\Phi$ ) and B-lymphocytes.

The fact, that disseminating tumor cells metastasize into lymph nodes was taken as basis for this work. From this we investigate whether GDF-15, which is found in an increased amount in prostate cancer, can also be found in the lymph nodes of prostate cancer patients and dependent on the malignancy (defined by Gleason Score (GS)) can have an increased occurrence. In addition, the innervation and infiltration of immune cells (M1-M $\Phi$  and B-lymphocytes) was analysed.

The presence of the immune-checkpoint ligand PD-L1, which initiates the inhibition of the immune response and therefore a better survival rate for the tumor, causes contradicting statements in prostate cancer and in metastatic lymph nodes of other cancer types. Due to PD-L1's high clinical relevance, which goes along a positive response to immune therapy, this work also examines the expression and area ratio of it in lymph nodes.

We evaluated all lymph node samples with the technique of immunostaining using different antibodies. Additionally, we analysed the antibodies GDF-15, PD-L1 and PGP 9.5 using the gene expression profiling method RT-qPCR.

Neither the immunostaining, or the gene expression profiling method, could detect GDF-15 in the lymph nodes. Thus, further working hypotheses, such as the connection between M1-M $\Phi$ , B-lymphocytes, PD-L1 or the innervation and GDF-15, could not be investigated. Likewise, showing the incidence of PGP 9.5, an antibody against neurones and neuroendocrine cells, was only successful via RT-qPCR in one lymph node sample but unsuccessful via immunostaining. Therefore, a connection between the innervation of the lymph node and the progression of the prostate cancer, could not be proven. In contrast, the ligand of the immuncheckpoint PD-1, PD-L1,

was found in all lymph nodes samples via immunostaining and could be detected in three of five samples via RT-qPCR. Since both methods show a different trend in the summary of the respective GS, no tendency between the occurrence of PD-L1 in the lymph nodes and the malignancy could be found.

Moreover, we identified M1-M $\Phi$  (CD68) and B-lymphocytes (CD19) by immunostaining. M1-macrophages occur mainly in accumulation where our findings could not demonstrate a Gleason-Score dependent increase or decrease in occurrence. B-lymphocytes (CD 19) were found in all lymph node samples by immunostaining, showing an higher percental ratio of the area in GS7 and GS9 than in GS6.

Since GDF-15 is said to be mainly involved in the malignancy of metastatic lymph nodes, our results demonstrate for the first time, that GDF-15 could not be shown in lymph nodes neither on a molecular RNA nor a protein basis. Furthermore, the prove of expression and immunoreactivity of the immune checkpoint ligand PD-L1 in the lymph node can lead to the development of new therapeutic methods for fighting metastatic lymph node cancer.

## 6. Literaturverzeichnis

Adela, R., Banerjee, S.K., 2015. GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. *J Diabetes Res* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/490842>

Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubat, T., Yagita, H., Honjo, T., 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International Immunology* 8, 765–772. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.5.765>

Ago, T., Sadoshima, J., 2006. GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein. *Circ Res* 98, 294–297. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000207919.83894.9d>

Aikian, A.Z., Shynkevych, V.I., Kaidashev, I.P., 2019. Quantitative assessment of CD68+ AND CD163+ macrophages in the primary focus and metastatic lesions of regional lymph nodes in non-luminal her2-positive invasive breast carcinoma. *Wiad Lek* 72, 1861–1865.

Ammirante, M., Luo, J.-L., Grivennikov, S., Nedospasov, S., Karin, M., 2010. B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature* 464, 302–305. <https://doi.org/10.1038/nature08782>

Andersson, C., Enserro, D., Sullivan, L., Wang, T.J., Januzzi, J.L., Benjamin, E.J., Vita, J.A., Hamburg, N.M., Larson, M.G., Mitchell, G.F., Vasan, R.S., 2016. Relations of Circulating GDF-15, soluble ST2, and Troponin-I Concentrations with Vascular Function in the Community: The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 248, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.02.013>

Andreu, P., Johansson, M., Affara, N.I., Pucci, F., Tan, T., Junankar, S., Korets, L., Lam, J., Tawfik, D., DeNardo, D.G., Naldini, L., de Visser, K.E., De Palma, M., Coussens, L.M., 2010. FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell* 17, 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.019>

Arnemann, J., 2019. DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung, in: Gressner, A.M., Arndt, T. (Eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Springer Reference Medizin. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 719–719. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4\\_3464](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3464)

Arnemann, J., 2018. PCR, quantitative in Echtzeit, in: Gressner, A.M., Arndt, T. (Eds.), Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–1. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-49054-9\\_3570-1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-49054-9_3570-1)

Aus, G., Nordenskjöld, K., Robinson, D., Rosell, J., Varenhorst, E., 2003. Prognostic Factors and Survival in Node-Positive (N1) Prostate Cancer—A Prospective Study Based on Data from a Swedish Population-Based Cohort. *European Urology* 43, 627–631. [https://doi.org/10.1016/S0302-2838\(03\)00156-8](https://doi.org/10.1016/S0302-2838(03)00156-8)

Auyeung, K.K.-W., Ko, J.K.-S., 2009. Coptis chinensis inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene activation. *International Journal of Molecular Medicine* 24, 571–577. <https://doi.org/10.3892/ijmm.00000267>

Baas, W., Gershburg, S., Dynda, D., Delfino, K., Robinson, K., Nie, D., Yearley, J.H., Alane, S., 2017. Immune Characterization of the Programmed Death Receptor Pathway in High Risk Prostate Cancer. *Clinical Genitourinary Cancer* 15, 577–581. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2017.04.002>

Bader Pia, Burkhard Fiona C., Markwalder Regula, Studer Urs E., 2002. Is a Limited Lymph Node Dissection An Adequate Staging Procedure for Prostate Cancer? *Journal of Urology* 168, 514–518. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)64670-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)64670-8)

Baek, K.E., Yoon, S.R., Kim, J.-T., Kim, K.S., Kang, S.H., Yang, Y., Lim, J.-S., Choi, I., Nam, M.S., Yoon, M., Lee, H.G., 2009. Upregulation and secretion of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in gastric cancers. *Clinica Chimica Acta* 401, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2008.12.008>

Baek, S.J., Okazaki, R., Lee, S.-H., Martinez, J., Kim, J.-S., Yamaguchi, K., Mishina, Y., Martin, D.W., Shoieb, A., Mcentee, M.F., Eling, T.E., 2006. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Activated Gene-1 Over Expression in Transgenic Mice Suppresses Intestinal Neoplasia. *Gastroenterology* 131, 1553–1560. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.09.015>

Baek, S.J., Wilson, L.C., Eling, T.E., 2002. Resveratrol enhances the expression of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) by increasing the expression of p53. *Carcinogenesis* 23, 425–432. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.3.425>

Balic, M., Williams, A., Dandachi, N., Cote, R.J., 2011. Micrometastasis: Detection methods and clinical importance. *CBM* 9, 397–419. <https://doi.org/10.3233/CBM-2011-0161>

Bardhan, K., Anagnostou, T., Boussiotis, V.A., 2016. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00550>

Bauskin, A.R., Zhang, H.-P., Fairlie, W.D., He, X.Y., Russell, P.K., Moore, A.G., Brown, D.A., Stanley, K.K., Breit, S.N., 2000. The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF- $\beta$  superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *EMBO J* 19, 2212–2220. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.10.2212>

Beyer, K., Moris, L., Lardas, M., Haire, A., Barletta, F., Scuderi, S., Vradi, E., Gandaglia, G., Omar, M.I., MacLennan, S., Zong, J., Farahmand, B., MacLennan, S.J., Devecseri, Z., Asimwe, A., Collette, L., Bjartell, A., Ndow, J., Briganti, A., Hemelrijck, M.V., Consortium, T.P., 2021. Diagnostic and prognostic factors in patients with prostate cancer: A systematic review protocol. *BMJ open* 11, e040531. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-040531>

Bishop, J.L., Sio, A., Angeles, A., Roberts, M.E., Azad, A.A., Chi, K.N., Zoubeidi, A., 2014. PD-L1 is highly expressed in Enzalutamide resistant prostate cancer. *Oncotarget* 6, 234–242.

Blanco-Calvo, M., Tarrío, N., Reboredo, M., Haz-Conde, M., García, J., Quindós, M., Figueroa, A., Antón-Aparicio, L., Calvo, L., Valladares-Ayerbes, M., 2014. Circulating levels of GDF15, MMP7 and miR-200c as a poor prognostic signature in gastric cancer. *Future Oncology* 10, 1187–1202. <https://doi.org/10.2217/fon.13.263>

Blobe, G.C., Schiemann, W.P., Lodish, H.F., 2000. ROLE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR  $\beta$  IN HUMAN DISEASE. *The New England Journal of Medicine* 9.

Boland, J.M., Kwon, E.D., Harrington, S.M., Wampfler, J.A., Tang, H., Yang, P., Aubry, M.C., 2013. Tumor B7-H1 and B7-H3 Expression in Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Clinical Lung Cancer* 14, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2012.05.006>

Bonaterra, G.A., Zügel, S., Thogersen, J., Walter, S.A., Haberkorn, U., Strelau, J., Kinscherf, R., 2012. Growth Differentiation Factor-15 Deficiency Inhibits Atherosclerosis Progression by Regulating Interleukin-6–Dependent Inflammatory Response to Vascular Injury. *JAHA* 1. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.002550>

Boon, T., Cerottini, J.-C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Van Pel, A., 1994. Tumor Antigens Recognized by T Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 337–365. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.002005>

Bootcov, M.R., Bauskin, A.R., Valenzuela, S.M., Moore, A.G., Bansal, M., He, X.Y., Zhang, H.P., Donnellan, M., Mahler, S., Pryor, K., Walsh, B.J., Nicholson, R.C., Fairlie, W.D., Por, S.B., Robbins, J.M., Breit, S.N., 1997. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF- $\beta$  superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11514–11519.

Böttner, M., Laaff, M., Schechinger, B., Rappold, G., Unsicker, K., Suter-Crazzolara, C., September 3, 1999a. Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1). *Gene* 237, 105–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00309-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00309-1)

Böttner, M., Suter-Crazzolara, C., Schober, A., Unsicker, K., 1999b-06-01. Expression of a novel member of the TGF- $\beta$  superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues. *Cell Tissue Res* 297, 103–110. <https://doi.org/10.1007/s004410051337>

Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q.M., Hwu, W.-J., Topalian, S.L., Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., Pitot, H.C., Hamid, O., Bhatia, S., Martins, R., Eaton, K., Chen, S., Salay, T.M., Alaparthi, S., Grosso, J.F., Korman, A.J., Parker, S.M., Agrawal, S., Goldberg, S.M., Pardoll, D.M., Gupta, A., Wigginton, J.M., 2012. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N Engl J Med* 366, 2455–2465. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200694>

Breit, S.N., Johnen, H., Cook, A.D., Tsai, V.W.W., Mohammad, M.G., Kuffner, T., Zhang, H.P., Marquis, C.P., Jiang, L., Lockwood, G., Lee-Ng, M., Husaini, Y., Wu, L., Hamilton, J.A., Brown, D.A., 2011. The TGF- $\beta$  superfamily cytokine, MIC-1/GDF15: A pleiotropic cytokine with roles in inflammation, cancer and metabolism. *Growth Factors* 29, 187–195. <https://doi.org/10.3109/08977194.2011.607137>

Brierley, J.D., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C., 2017. *TNM Classification of Malignant Tumours*. John Wiley & Sons.

Briganti, A., Chun, F.K.-H., Salonia, A., Zanni, G., Scattoni, V., Valiquette, L., Rigatti, P., Montorsi, F., Karakiewicz, P.I., 2006. Validation of a Nomogram Predicting the Probability of Lymph Node Invasion among Patients Undergoing Radical

Prostatectomy and an Extended Pelvic Lymphadenectomy. *European Urology* 49, 1019–1027. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.01.043>

Briganti, A., Karnes, J.R., Da Pozzo, L.F., Cozzarini, C., Gallina, A., Suardi, N., Bianchi, M., Freschi, M., Doglioni, C., Fazio, F., Rigatti, P., Montorsi, F., Blute, M.L., 2009. Two Positive Nodes Represent a Significant Cut-off Value for Cancer Specific Survival in Patients with Node Positive Prostate Cancer. A New Proposal Based on a Two-Institution Experience on 703 Consecutive N+ Patients Treated with Radical Prostatectomy, Extended Pelvic Lymph Node Dissection and Adjuvant Therapy. *European Urology* 55, 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.09.043>

Brown, D. a., Bauskin, A. r., Fairlie, W. d., Smith, M. d., Liu, T., Xu, N., Breit, S. n., 2002. Antibody-Based Approach to High-Volume Genotyping for MIC-1 Polymorphism. *BioTechniques* 33, 118–126. <https://doi.org/10.2144/02331rr03>

Brown, D.A., Lindmark, F., Stattin, P., Bälter, K., Adami, H.-O., Zheng, S.L., Xu, J., Isaacs, W.B., Grönberg, H., Breit, S.N., Wiklund, F.E., 2009. Macrophage Inhibitory Cytokine 1: A New Prognostic Marker in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 15, 6658–6664. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3126>

Brown, D.A., Stephan, C., Ward, R.L., Law, M., Hunter, M., Bauskin, A.R., Amin, J., Jung, K., Diamandis, E.P., Hampton, G.M., Russell, P.J., Giles, G.G., Breit, S.N., 2006. Measurement of Serum Levels of Macrophage Inhibitory Cytokine 1 Combined with Prostate-Specific Antigen Improves Prostate Cancer Diagnosis. *Clin Cancer Res* 12, 89–96. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1331>

Brown, D.A., Ward, R.L., Buckhaults, P., Liu, T., Romans, K.E., Hawkins, N.J., Bauskin, A.R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Breit, S.N., 2003a. MIC-1 Serum Level and Genotype: Associations with Progress and Prognosis of Colorectal Carcinoma. *Clin Cancer Res* 9, 2642–2650.

Brown, J.A., Dorfman, D.M., Ma, F.-R., Sullivan, E.L., Munoz, O., Wood, C.R., Greenfield, E.A., Freeman, G.J., 2003b. Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. *The Journal of Immunology* 170, 1257–1266. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1257>

Bruzzese, F., Hägglöf, C., Leone, A., Sjöberg, E., Roca, M.S., Kiflemariam, S., Sjöblom, T., Hammarsten, P., Egevad, L., Bergh, A., Ostman, A., Budillon, A., Augsten, M., 2014. Local and systemic protumorigenic effects of cancer-associated fibroblast-derived GDF15. *Cancer Res* 74, 3408–3417. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2259>

Calagua, C., Russo, J., Sun, Y., Schaefer, R., Lis, R., Zhang, Z., Mahoney, K., Bubley, G.J., Loda, M., Taplin, M.-E., Balk, S.P., Ye, H., 2017. Expression of PD-L1 in Hormone-naïve and Treated Prostate Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Abiraterone Acetate plus Prednisone and Leuprolide. *Clin Cancer Res* 23, 6812–6822. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0807>

Candas, B., Cusan, L., Gomez, J.L., Diamond, P., Suburu, R.E., Lévesque, J., Brousseau, G., Bélanger, A., Labrie, F., 2000. Evaluation of prostatic specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate cancer. *Prostate* 45, 19–35. [https://doi.org/10.1002/1097-0045\(20000915\)45:1<19::aid-pros3>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/1097-0045(20000915)45:1<19::aid-pros3>3.0.co;2-m)

Carmi, Y., Spitzer, M.H., Linde, I.L., Burt, B.M., Prestwood, T.R., Perlman, N., Davidson, M.G., Kenkel, J.A., Segal, E., Pusapati, G.V., Bhattacharya, N., Engleman, E.G., 2015. Allogeneic IgG combined with dendritic cell stimuli induce antitumour T-cell immunity. *Nature* 521, 99–104. <https://doi.org/10.1038/nature14424>

Ceeraz, S., Nowak, E.C., Noelle, R.J., 2013. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol* 34. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.07.003>

Cekanova, M., Lee, S.-H., Donnell, R.L., Sukhthankar, M., Eling, T.E., Fischer, S.M., Baek, S.J., 2009. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-Activated Gene-1 Expression Inhibits Urethane-Induced Pulmonary Tumorigenesis in Transgenic Mice. *Cancer Prev Res* 2, 450–458. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0057>

Chen, G., Wang, M., Liu, X., 2019. GDF15 promotes osteosarcoma cell migration and invasion by regulating the TGF- $\beta$  signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* 20, 4262–4270. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10664>

Chen, S.-J., Karan, D., Johansson, S.L., Lin, F.-F., Zeckser, J., Singh, A.P., Batra, S.K., Lin, M.-F., 2007. Prostate-derived factor as a paracrine and autocrine factor for the proliferation of androgen receptor-positive human prostate cancer cells. *Prostate* 67, 557–571. <https://doi.org/10.1002/pros.20551>

Cheng, J.-C., Chang, H.-M., Leung, P.C.K., 2011. Wild-Type p53 Attenuates Cancer Cell Motility by Inducing Growth Differentiation Factor-15 Expression. *Endocrinology* 152, 2987–2995. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0059>

Chrysovergis, K., Wang, X., Kosak, J., Lee, S.-H., Kim, J.S., Foley, J.F., Travlos, G., Singh, S., Baek, S.J., Eling, T.E., 2014. NAG-1/GDF15 prevents obesity by increasing



thermogenesis, lipolysis and oxidative metabolism. *Int J Obes (Lond)* 38, 1555–1564. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.27>

Codó, P., Weller, M., Kaulich, K., Schraivogel, D., Silginer, M., Reifenberger, G., Meister, G., Roth, P., 2016. Control of glioma cell migration and invasiveness by GDF-15. *Oncotarget* 7, 7732–7746. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6816>

Coll, A.P., Chen, M., Taskar, P., Rimmington, D., Patel, S., Tadross, J., Cimino, I., Yang, M., Welsh, P., Virtue, S., Goldspink, D.A., Miedzybrodzka, E.L., Konopka, A.R., Esponda, R.R., Huang, J.T.-J., Tung, Y.C.L., Rodriguez-Cuenca, S., Tomaz, R.A., Harding, H.P., Melvin, A., Yeo, G.S.H., Preiss, D., Vidal-Puig, A., Vallier, L., Nair, K.S., Wareham, N.J., Ron, D., Gribble, F.M., Reimann, F., Sattar, N., Savage, D.B., Allan, B.B., O’Rahilly, S., 2020. GDF15 mediates the effects of metformin on body weight and energy balance. *Nature* 578, 444–448. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1911-y>

Corre, J., Hébraud, B., Bourin, P., 2013. Concise Review: Growth Differentiation Factor 15 in Pathology: A Clinical Role? *Stem Cells Transl Med* 2, 946–952. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0055>

D’Amico, A.V., Hui-Chen, M., Renshaw, A.A., Sussman, B., Roehl, K.A., Catalona, W.J., 2006. Identifying Men Diagnosed With Clinically Localized Prostate Cancer Who are at High Risk for Death From Prostate Cancer. *Journal of Urology* 176. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.06.075>

Dammeijer, F., van Gulijk, M., Mulder, E.E., Lukkes, M., Klaase, L., van den Bosch, T., van Nimwegen, M., Lau, S.P., Latupeirissa, K., Schetters, S., van Kooyk, Y., Boon, L., Moyaart, A., Mueller, Y.M., Katsikis, P.D., Eggermont, A.M., Vroman, H., Stadhouders, R., Hendriks, R.W., Thüsen, J. von der, Grünhagen, D.J., Verhoef, C., van Hall, T., Aerts, J.G., 2020. The PD-1/PD-L1-Checkpoint Restrains T cell Immunity in Tumor-Draining Lymph Nodes. *Cancer Cell* 38, 685–700.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.09.001>

David, C.J., Massagué, J., 2018. Contextual determinants of TGF $\beta$  action in development, immunity and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 419–435. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0007-0>

Decker, A.M., Jung, Y., Cackowski, F.C., Yumoto, K., Wang, J., Taichman, R.S., 2017. Sympathetic Signaling Reactivates Quiescent Disseminated Prostate Cancer Cells in the Bone Marrow. *Mol Cancer Res* 15, 1644–1655. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0132>

Desmedt, S., Desmedt, V., De Vos, L., Delanghe, J.R., Speeckaert, R., Speeckaert, M.M., 2019. Growth differentiation factor 15: A novel biomarker with high clinical potential. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 56, 333–350. <https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1615034>

Dijke, P.T., Goumans, M.-J., Itoh, F., Itoh, S., 2002. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *Journal of Cellular Physiology* 191, 1–16. <https://doi.org/10.1002/jcp.10066>

Ding, Q., Mracek, T., Gonzalez-Muniesa, P., Kos, K., Wilding, J., Trayhurn, P., Bing, C., 2009. Identification of Macrophage Inhibitory Cytokine-1 in Adipose Tissue and Its Secretion as an Adipokine by Human Adipocytes. *Endocrinology* 150, 1688–1696. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0952>

Dombrowski, Y., 2010. Charakterisierung von GDF-15 als Immunmodulator im Ovarialkarzinom.

Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E., Chen, L., 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8, 793–800. <https://doi.org/10.1038/nm730>

Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., Chen, L., 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine* 5, 1365–1369. <https://doi.org/10.1038/70932>

Donnelly, S.M., Paplomata, E., Peake, B.M., Sanabria, E., Chen, Z., Nahta, R., 2014. P38 MAPK contributes to resistance and invasiveness of HER2-overexpressing breast cancer. *Current medicinal chemistry* 21, 501.

Duan, L., Pang, H.-L., Chen, W.-J., Shen, W.-W., Cao, P.-P., Wang, S.-M., Liu, L.-L., Zhang, H.-L., 2019. The role of GDF15 in bone metastasis of lung adenocarcinoma cells. *Oncology Reports* 41, 2379–2388. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7024>

Edin, S., Wikberg, M.L., Dahlin, A.M., Rutegård, J., Öberg, Å., Oldenberg, P.-A., Palmqvist, R., 2012. The Distribution of Macrophages with a M1 or M2 Phenotype in Relation to Prognosis and the Molecular Characteristics of Colorectal Cancer. *PLOS ONE* 7, e47045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047045>

Emmerson, P.J., Duffin, K.L., Chintharlapalli, S., Wu, X., 2018. GDF15 and Growth Control. *Front. Physiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01712>

Emmerson, P.J., Wang, F., Du, Y., Liu, Q., Pickard, R.T., Gonciarz, M.D., Coskun, T., Hamang, M.J., Sindelar, D.K., Ballman, K.K., Foltz, L.A., Muppidi, A., Alsina-Fernandez, J., Barnard, G.C., Tang, J.X., Liu, X., Mao, X., Siegel, R., Sloan, J.H., Mitchell, P.J., Zhang, B.B., Gimeno, R.E., Shan, B., Wu, X., 2017. The metabolic effects of GDF15 are mediated by the orphan receptor GFRAL. *Nature Medicine* 23, 1215–1219. <https://doi.org/10.1038/nm.4393>

Engerud, H., Hope, K., Berg, H.F., Fasmer, K.E., Tangen, I.L., Haldorsen, I.S., Trovik, J., Krakstad, C., 2019. Plasma growth differentiation factor-15 is an independent marker for aggressive disease in endometrial cancer. *PLOS ONE* 14, e0210585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210585>

Epstein, J.I., Amin, M.B., Reuter, V.E., Humphrey, P.A., 2017. Contemporary Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: An Update With Discussion on Practical Issues to Implement the 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 41, e1–e7. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000820>

Epstein, J.I., Egevad, L., Srigley, J.R., Humphrey, P.A., 2016. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 40, 9.

Fairlie, W.D., Moore, A.G., Bauskin, A.R., Russell, P.K., Zhang, H.-P., Breit, S.N., 1999. MIC-1 is a novel TGF- $\beta$  superfamily cytokine associated with macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology* 65, 2–5. <https://doi.org/10.1002/jlb.65.1.2>

Fairlie, W.D., Zhang, H.-P., Wu, W.M., Pankhurst, S.L., Bauskin, A.R., Russell, P.K., Brown, P.K., Breit, S.N., 2001. The Propeptide of the Transforming Growth Factor- $\beta$  Superfamily Member, Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1), Is a Multifunctional Domain That Can Facilitate Protein Folding and Secretion. *J. Biol. Chem.* 276, 16911–16918. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010000200>

Fairweather, D., Cihakova, D., 2009. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J Autoimmun* 33, 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.09.012>

Fares, J., Fares, M.Y., Khachfe, H.H., Salhab, H.A., Fares, Y., 2020. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Sig Transduct Target Ther* 5, 28. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>

Fay, A.P., Antonarakis, E.S., 2019. Blocking the PD-1/PD-L1 axis in advanced prostate cancer: are we moving in the right direction? *Ann Transl Med* 7. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.01.37>

Federmann, J., 2019. S3-Leitlinie Prostatakarzinom 345.

Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R., Honjo, T., 2000. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* 192, 1027–1034.

Freeman, T.C., Lee, K., Richardson, P.J., 1999. Analysis of gene expression in single cells. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 579–582. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00036-1)

Frenel, J.-S., Le Tourneau, C., O’Neil, B., Ott, P.A., Piha-Paul, S.A., Gomez-Roca, C., van Brummelen, E.M.J., Rugo, H.S., Thomas, S., Saraf, S., Rangwala, R., Varga, A., 2017. Safety and Efficacy of Pembrolizumab in Advanced, Programmed Death Ligand 1-Positive Cervical Cancer: Results From the Phase Ib KEYNOTE-028 Trial. *J Clin Oncol* 35, 4035–4041. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.5471>

Fujimoto, N., Shiota, M., Tomisaki, I., Minato, A., Yahara, K., 2019. Reconsideration on Clinical Benefit of Pelvic Lymph Node Dissection during Radical Prostatectomy for Clinically Localized Prostate Cancer. *Urol Int* 103, 125–136. <https://doi.org/10.1159/000497280>

Gandaglia, G., Ploussard, G., Valerio, M., Mattei, A., Fiori, C., Fossati, N., Stabile, A., Beauval, J.-B., Malavaud, B., Roumiguié, M., Robesti, D., Dell’Oglio, P., Moschini, M., Zamboni, S., Rakauskas, A., De Cobelli, F., Porpiglia, F., Montorsi, F., Briganti, A., 2019. A Novel Nomogram to Identify Candidates for Extended Pelvic Lymph Node Dissection Among Patients with Clinically Localized Prostate Cancer Diagnosed with Magnetic Resonance Imaging-targeted and Systematic Biopsies. *European Urology* 75, 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.10.012>

Gebauer, G., Fehm, T., Merkle, E., Jaeger, W., Mitze, M., 2003. Micrometastases in axillary lymph nodes and bone marrow of lymph node-negative breast cancer patients--prognostic relevance after 10 years. *Anticancer Res* 23, 4319–4324.

Gevensleben, H., Dietrich, D., Golletz, C., Steiner, S., Jung, M., Thiesler, T., Majores, M., Stein, J., Uhl, B., Müller, S., Ellinger, J., Stephan, C., Jung, K., Brossart, P., Kristiansen, G., 2016. The Immune Checkpoint Regulator PD-L1 Is Highly Expressed in Aggressive Primary Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 22, 1969–1977. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2042>

Gkretsi, V., Louca, M., Stylianou, A., Minadakis, G., Spyrou, G.M., Stylianopoulos, T., 2019. Inhibition of Breast Cancer Cell Invasion by Ras Suppressor-1 (RSU-1) Silencing Is Reversed by Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15). *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20010163>

Gleason, D.F., 1966. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 50, 125–128.

Griner, S.E., Joshi, J.P., Nahta, R., 2013. Growth differentiation factor 15 stimulates rapamycin-sensitive ovarian cancer cell growth and invasion. *Biochem Pharmacol* 85, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.10.007>

Haffner, M.C., Guner, G., Taheri, D., Netto, G.J., Palsgrove, D.N., Zheng, Q., Guedes, L.B., Kim, K., Tsai, H., Esopi, D.M., Lotan, T.L., Sharma, R., Meeker, A.K., Chinnaiyan, A.M., Nelson, W.G., Yegnasubramanian, S., Luo, J., Mehra, R., Antonarakis, E.S., Drake, C.G., Marzo, A.M.D., 2018. Comprehensive Evaluation of Programmed Death-Ligand 1 Expression in Primary and Metastatic Prostate Cancer. *The American Journal of Pathology* 188, 1478–1485. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.02.014>

Han, M., Dai, D., Yousafzai, N.A., Wang, F., Wang, H., Zhou, Q., Lu, H., Xu, W., Feng, L., Jin, H., Wang, X., 2017. CXXC4 activates apoptosis through up-regulating GDF15 in gastric cancer. *Oncotarget* 8, 103557–103567. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21581>

Hao, N.-B., Lü, M.-H., Fan, Y.-H., Cao, Y.-L., Zhang, Z.-R., Yang, S.-M., 2012. Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. *Clinical and Developmental Immunology* 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/948098>  
Hautmann, R., Gschwend, J.E. (Eds.), 2014. *Urologie, Springer-Lehrbuch*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34319-3>

Hayes, V.M., Severi, G., Southey, M.C., Padilla, E.J.D., English, D.R., Hopper, J.L., Giles, G.G., Sutherland, R.L., 2006. Macrophage Inhibitory Cytokine-1 H6D Polymorphism, Prostate Cancer Risk, and Survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 1223–1225. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0063>

He, J., Hu, Y., Hu, M., Li, B., 2015. Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci Rep* 5, 13110. <https://doi.org/10.1038/srep13110>

Heusinkveld, M., van der Burg, S.H., 2011. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med* 9, 216. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-216>

Hino, R., Kabashima, K., Kato, Y., Yagi, H., Nakamura, M., Honjo, T., Okazaki, T., Tokura, Y., 2010. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 116, 1757–1766. <https://doi.org/10.1002/cncr.24899>

Hinoi, E., Ochi, H., Takarada, T., Nakatani, E., Iezaki, T., Nakajima, H., Fujita, H., Takahata, Y., Hidano, S., Kobayashi, T., Takeda, S., Yoneda, Y., 2012. Positive regulation of osteoclastic differentiation by growth differentiation factor 15 upregulated in osteocytic cells under hypoxia. *Journal of Bone and Mineral Research* 27, 938–949. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1538>

Hinsenveld, F.J., Wit, E.M.K., van Leeuwen, P.J., Brouwer, O.R., Donswijk, M.L., Tillier, C.N., Vegt, E., van Muilekom, E., van Oosterom, M.N., van Leeuwen, F.W.B., van der Poel, H.G., 2020. Prostate-Specific Membrane Antigen PET/CT Combined with Sentinel Node Biopsy for Primary Lymph Node Staging in Prostate Cancer. *J Nucl Med* 61, 540–545. <https://doi.org/10.2967/jnumed.119.232199>

Holzapfel, B., Wickert, L., 2007. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biol. Unserer Zeit* 37, 120–126. <https://doi.org/10.1002/biuz.200610332>

Hromas, R., Hufford, M., Sutton, J., Xu, D., Li, Y., Lu, L., 1997a. PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1354, 40–44. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(97\)00122-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(97)00122-X)

Hsu, J.-Y., Crawley, S., Chen, M., Ayupova, D.A., Lindhout, D.A., Higbee, J., Kutach, A., Joo, W., Gao, Z., Fu, D., To, C., Mondal, K., Li, B., Kekatpure, A., Wang, M., Laird,

T., Horner, G., Chan, J., McEntee, M., Lopez, M., Lakshminarasimhan, D., White, A., Wang, S.-P., Yao, J., Yie, J., Matern, H., Solloway, M., Haldankar, R., Parsons, T., Tang, J., Shen, W.D., Alice Chen, Y., Tian, H., Allan, B.B., 2017. Non-homeostatic body weight regulation through a brainstem-restricted receptor for GDF15. *Nature* 550, 255–259. <https://doi.org/10.1038/nature24042>

Huang, C.-Y., Beer, T.M., Higano, C.S., True, L.D., Vessella, R., Lange, P.H., Garzotto, M., Nelson, P.S., 2007. Molecular Alterations in Prostate Carcinomas that Associate with In vivo Exposure to Chemotherapy: Identification of a Cytoprotective Mechanism Involving Growth Differentiation Factor 15. *Clin Cancer Res* 13, 5825–5833. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1037>

Humphrey, P.A., 2017. Histopathology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030411>

Husaini, Y., Qiu, M.R., Lockwood, G.P., Luo, X.W., Shang, P., Kuffner, T., Tsai, V.W.-W., Jiang, L., Russell, P.J., Brown, D.A., Breit, S.N., 2012. Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1/GDF15) Slows Cancer Development but Increases Metastases in TRAMP Prostate Cancer Prone Mice. *PLOS ONE* 7, e43833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043833>

Hüsemann, Y., Geigl, J.B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmüller, G., Klein, C.A., 2008. Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer. *Cancer Cell* 13, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.12.003>

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., Honjo, T., 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11, 3887–3895.

Ishige, T., Nishimura, M., Satoh, M., Fujimoto, M., Fukuyo, M., Semba, T., Kado, S., Tsuchida, S., Sawai, S., Matsushita, K., Togawa, A., Matsubara, H., Kaneda, A., Nomura, F., 2016. Combined Secretomics and Transcriptomics Revealed Cancer-Derived GDF15 is Involved in Diffuse-Type Gastric Cancer Progression and Fibroblast Activation. *Scientific Reports* 6, 21681. <https://doi.org/10.1038/srep21681>

Jansohn, M., Rothhämel, S., Aigner, A. (Eds.), 2012. *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 5. Aufl. ed. Spektrum Akad. Verl, Heidelberg.

Jeremiasen, M., Borg, D., Hedner, C., Svensson, M., Nodin, B., Leandersson, K., Johansson, J., Jirstrom, K., 2020. Tumor-Associated CD68+, CD163+, and MARCO+



Macrophages as Prognostic Biomarkers in Patients With Treatment-Naïve Gastroesophageal Adenocarcinoma. *Front. Oncol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.534761>

Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Ge, J., Xiang, B., Wu, X., Ma, J., Zhou, M., Li, X., Li, Y., Li, G., Xiong, W., Guo, C., Zeng, Z., 2019. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol Cancer* 18. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0928-4>

Jin, H.-T., Ahmed, R., Okazaki, T., 2011. Role of PD-1 in Regulating T-Cell Immunity, in: Ahmed, R., Honjo, T. (Eds.), *Negative Co-Receptors and Ligands, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 17–37. [https://doi.org/10.1007/82\\_2010\\_116](https://doi.org/10.1007/82_2010_116)

Johnen, H., Kuffner, T., Brown, D.A., Wu, B.J., Stocker, R., Breit, S.N., 2012. Increased expression of the TGF- $\beta$  superfamily cytokine MIC-1/GDF15 protects ApoE $^{-/-}$  mice from the development of atherosclerosis. *Cardiovascular Pathology* 21, 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2012.02.003>

Johnen, H., Lin, S., Kuffner, T., Brown, D.A., Tsai, V.W.-W., Bauskin, A.R., Wu, L., Pankhurst, G., Jiang, L., Junankar, S., Hunter, M., Fairlie, W.D., Lee, N.J., Enriquez, R.F., Baldock, P.A., Corey, E., Apple, F.S., Murakami, M.M., Lin, E.-J., Wang, C., During, M.J., Sainsbury, A., Herzog, H., Breit, S.N., 2007. Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF- $\beta$  superfamily cytokine MIC-1. *Nature Medicine* 13, 1333–1340. <https://doi.org/10.1038/nm1677>

Johns, L.E., Houlston, R.S., 2003. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int.* 91, 789–794. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2003.04232.x>

Jones, M.F., Ling Li, X., Subramanian, M., Shabalina, S.A., Hara, T., Zhu, Y., Huang, J., Yang, Y., Wakefield, L.M., Prasanth, K.V., Lal, A., 2015. Growth differentiation factor-15 encodes a novel microRNA 3189 that functions as a potent regulator of cell death. *Cell Death Differ* 22, 1641–1653. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.9>

Joshi, J.P., Brown, N.E., Griner, S.E., Nahta, R., 2011. Growth differentiation factor 15 (GDF15)-mediated HER2 phosphorylation reduces trastuzumab sensitivity of HER2-overexpressing breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 82, 1090–1099. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.082>



Joslyn, S.A., Konety, B.R., 2006. Impact of extent of lymphadenectomy on survival after radical prostatectomy for prostate cancer. *Urology* 68, 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2006.01.055>

Kaitu'u-Lino, T.J., Bambang, K., Onwude, J., Hiscock, R., Konje, J., Tong, S., 2013. Plasma MIC-1 and PAPP-A Levels Are Decreased among Women Presenting to an Early Pregnancy Assessment Unit, Have Fetal Viability Confirmed but Later Miscarry. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072437>

Kalli, M., Minia, A., Pliaka, V., Fotis, C., Alexopoulos, L.G., Stylianopoulos, T., 2019. Solid stress-induced migration is mediated by GDF15 through Akt pathway activation in pancreatic cancer cells. *Scientific Reports* 9, 978. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37425-6>

Kamiya, S., Kato, J., Kamiya, T., Yamashita, T., Sumikawa, Y., Hida, T., Horimoto, K., Sato, S., Takahashi, H., Sawada, M., Kubo, T., Torigoe, T., Uhara, H., 2020. Association between PD-L1 expression and lymph node metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Asia Pac J Clin Oncol* 16, e108–e112. <https://doi.org/10.1111/ajco.13102>

Kang, S.U., Shin, Y.S., Hwang, H.S., Baek, S.J., Lee, S.-H., Kim, C.-H., 2012. Tolfenamic Acid Induces Apoptosis and Growth Inhibition in Head and Neck Cancer: Involvement of NAG-1 Expression. *PLOS ONE* 7, e34988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034988>

Kaur, S., Chakraborty, S., Baine, M.J., Mallya, K., Smith, L.M., Sasson, A., Brand, R., Guha, S., Jain, M., Wittel, U., Singh, S.K., Batra, S.K., 2013. Potentials of Plasma NGAL and MIC-1 as Biomarker(s) in the Diagnosis of Lethal Pancreatic Cancer. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055171>

Ke, B., Sr, Y., Jt, K., Ks, K., Sh, K., Y, Y., Js, L., I, C., Ms, N., M, Y., Hg, L., 2008. Upregulation and secretion of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in gastric cancers. *Clin Chim Acta* 401, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2008.12.008>

Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2008. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677–704. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>

Kempf, T., Eden, M., Strelau, J., Naguib, M., Willenbockel, C., Tongers, J., Heineke, J., Kotlarz, D., Xu, J., Molkentin, J.D., Niessen, H.W., Drexler, H., Wollert, K.C., 2006. The Transforming Growth Factor- $\beta$  Superfamily Member Growth-Differentiation Factor-15

Protects the Heart From Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation Research* 98, 351–360. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000202805.73038.48>

Kempf, T., Zarbock, A., Widera, C., Butz, S., Stadtmann, A., Rossaint, J., Bolomini-Vittori, M., Korf-Klingebiel, M., Napp, L.C., Hansen, B., Kanwischer, A., Bavendiek, U., Beutel, G., Hapke, M., Sauer, M.G., Laudanna, C., Hogg, N., Vestweber, D., Wollert, K.C., 2011. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nature Medicine* 17, 581–588. <https://doi.org/10.1038/nm.2354>

Khaled, Y.S., Elkord, E., Ammori, B.J., 2012. Macrophage Inhibitory Cytokine-1: A review of its pleiotropic actions in cancer. *CBM* 11, 183–190. <https://doi.org/10.3233/CBM-2012-00287>

Kilian, L.S., 2016. Immunzellen und Innervation im humanen Prostatakarzinom und benigner Prostatahyperplasie.

Kim, C.H., Kim, M.Y., Moon, J.Y., Hwang, J.W., Lee, S.Y., Joo, Y.M., Han, S.I., Park, H.G., Kang, H.S., 2008a. Implication of NAG-1 in synergistic induction of apoptosis by combined treatment of sodium salicylate and PI3K/MEK1/2 inhibitors in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Biochemical Pharmacology* 75, 1751–1760. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.02.002>

Kim, K.-K., Lee, J.J., Yang, Y., You, K.-H., Lee, J.-H., 2008b. Macrophage inhibitory cytokine-1 activates AKT and ERK-1/2 via the transactivation of ErbB2 in human breast and gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 29, 704–712. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn031>

Kim, Y., Wen, X., Bae, J.M., Kim, J.H., Cho, N.-Y., Kang, G.H., 2018. The distribution of intratumoral macrophages correlates with molecular phenotypes and impacts prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology* 73, 663–671. <https://doi.org/10.1111/his.13674>

Kluger, H.M., Hoyt, K., Bacchiocchi, A., Mayer, T., Kirsch, J., Kluger, Y., Sznol, M., Ariyan, S., Molinaro, A., Halaban, R., 2011. Plasma Markers for Identifying Patients with Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* 17, 2417–2425. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2402>

Kläsener, K., Jellusova, J., Andrieux, G., Salzer, U., Böhrer, C., Steiner, S.N., Albinus, J.B., Cavallari, M., Süß, B., Voll, R.E., Boerries, M., Wollscheid, B., Reth, M., 2021.

CD20 as a gatekeeper of the resting state of human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2021342118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021342118>

Komohara, Y., Fujiwara, Y., Ohnishi, K., Takeya, M., 2016. Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Insights into heterogeneity in tumor microenvironment for drug development 99, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.009>

Kondo, A., Yamashita, T., Tamura, H., Zhao, W., Tsuji, T., Shimizu, M., Shinya, E., Takahashi, H., Tamada, K., Chen, L., Dan, K., Ogata, K., 2010. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor- $\kappa$ B activation in blasts in myelodysplastic syndromes. *Blood* 116, 1124–1131. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-255125>

Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., Sevcikova, S., 2012. TGF- $\beta$  – an excellent servant but a bad master. *J Transl Med* 10, 183. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-183>

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>

Kunder, C.A., St. John, A.L., Li, G., Leong, K.W., Berwin, B., Staats, H.F., Abraham, S.N., 2009. Mast cell-derived particles deliver peripheral signals to remote lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine* 206, 2455–2467. <https://doi.org/10.1084/jem.20090805>

Lambert, J.R., Whitson, R.J., Iczkowski, K.A., Rosa, F.G.L., Smith, M.L., Wilson, R.S., Smith, E.E., Torkko, K.C., Gari, H.H., Lucia, M.S., 2015. Reduced expression of GDF-15 is associated with atrophic inflammatory lesions of the prostate. *The Prostate* 75, 255–265. <https://doi.org/10.1002/pros.22911>

Largeot, A., Pagano, G., Gonder, S., Moussay, E., Paggetti, J., 2019. The B-Side of Cancer Immunity: The Underrated Tune. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8050449>

Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., Greenfield, E.A., Bourque, K., Bousset, V.A., Carter, L.L., Carreno, B.M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology* 2, 261–268. <https://doi.org/10.1038/85330>

Lawton, L.N., Bonaldo, M. de F., Jelenc, P.C., Qiu, L., Baumes, S.A., Marcelino, R.A., de Jesus, G.M., Wellington, S., Knowles, J.A., Warburton, D., Brown, S., Soares, M.B., 1997. Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. *Gene* 203, 17–26. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00485-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00485-X)

Lee, C., Jeong, S., Jang, C., Bae, H., Kim, Y.H., Park, I., Kim, S.K., Koh, G.Y., 2019. Tumor metastasis to lymph nodes requires YAP-dependent metabolic adaptation. *Science* 363, 644–649. <https://doi.org/10.1126/science.aav0173>

Lee, Y., Ms, G., D, J., Jg, C., C, L., Ly, Y.-L., Ge, G., Sn, M., Sh, L., 2014. Secretome analysis of an osteogenic prostate tumor identifies complex signaling networks mediating cross-talk of cancer and stromal cells within the tumor microenvironment. *Mol Cell Proteomics* 14, 471–483. <https://doi.org/10.1074/mcp.m114.039909>

Leiblich, A., Cross, S.S., Catto, J.W.F., Pesce, G., Hamdy, F.C., Rehman, I., 2007. Human prostate cancer cells express neuroendocrine cell markers PGP 9.5 and chromogranin A. *The Prostate* 67, 1761–1769. <https://doi.org/10.1002/pros.20654>

Lerner, L., Gyuris, J., Nicoletti, R., Gifford, J., Krieger, B., Jatoi, A., 2016a. Growth differentiating factor-15 (GDF-15): A potential biomarker and therapeutic target for cancer-associated weight loss. *Oncol Lett* 12, 4219–4223. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5183>

Lerner, L., Tao, J., Liu, Q., Nicoletti, R., Feng, B., Krieger, B., Mazsa, E., Siddiquee, Z., Wang, R., Huang, L., Shen, L., Lin, J., Vigano, A., Chiu, M.I., Weng, Z., Winston, W., Weiler, S., Gyuris, J., 2016b. MAP3K11/GDF15 axis is a critical driver of cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 7, 467–482. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12077>

Li, C., Wang, J., Kong, J., Tang, J., Wu, Y., Xu, E., Zhang, H., Lai, M., 2015. GDF15 promotes EMT and metastasis in colorectal cancer. *Oncotarget* 7, 860–872.

Li, H., Dakour, J., Guilbert, L.J., Winkler-Lowen, B., Lyall, F., Morrish, D.W., 2005. PL74, a Novel Member of the Transforming Growth Factor- $\beta$  Superfamily, Is Overexpressed in Preeclampsia and Causes Apoptosis in Trophoblast Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 3045–3053. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0808>

Li, J., Veltri, R.W., Yuan, Z., Christudass, C.S., Mandecki, W., 2015. Macrophage Inhibitory Cytokine 1 Biomarker Serum Immunoassay in Combination with PSA Is a

More Specific Diagnostic Tool for Detection of Prostate Cancer. PLOS ONE 10, e0122249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122249>

Li, Y.-L., Chang, J.T., Lee, L.-Y., Fan, K.-H., Lu, Y.-C., Li, Y.-C., Chiang, C.-H., You, G.-R., Chen, H.-Y., Cheng, A.-J., 2017. GDF15 contributes to radioresistance and cancer stemness of head and neck cancer by regulating cellular reactive oxygen species via a SMAD-associated signaling pathway. *Oncotarget* 8, 1508. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13649>

Li, Y.-L., Chen, C.-H., Chen, J.-Y., Lai, Y.-S., Wang, S.-C., Jiang, S.-S., Hung, W.-C., 2020. Single-cell analysis reveals immune modulation and metabolic switch in tumor-draining lymph nodes. *Oncoimmunology* 9, 1830513. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1830513>

Liebig, C., Ayala, G., Wilks, J.A., Berger, D.H., Albo, D., 2009. Perineural invasion in cancer. *Cancer* 115, 3379–3391. <https://doi.org/10.1002/cncr.24396>

Lindmark, F., Zheng, S.L., Wiklund, F., Bensen, J., Bälter, K.A., Chang, B., Hedelin, M., Clark, J., Stattin, P., Meyers, D.A., Adami, H.-O., Isaacs, W., Grönberg, H., Xu, J., 2004. H6D Polymorphism in Macrophage-Inhibitory Cytokine-1 Gene Associated With Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* 96, 1248–1254. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh227>

Lindner, S., Dahlke, K., Sontheimer, K., Hagn, M., Kaltenmeier, C., Barth, T.F.E., Beyer, T., Reister, F., Fabricius, D., Lotfi, R., Lunov, O., Nienhaus, G.U., Simmet, T., Kreienberg, R., Möller, P., Schrezenmeier, H., Jahrsdörfer, B., 2013. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res* 73, 2468–2479. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3450>

Litjens, G., Bandi, P., Ehteshami Bejnordi, B., Geessink, O., Balkenhol, M., Bult, P., Halilovic, A., Hermsen, M., van de Loo, R., Vogels, R., Manson, Q.F., Stathonikos, N., Baidoshvili, A., van Diest, P., Wauters, C., van Dijk, M., van der Laak, J., 2018. 1399 H&E-stained sentinel lymph node sections of breast cancer patients: the CAMELYON dataset. *GigaScience* 7. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy065>

Liu, J., Dong, X., Lu, J., Zhang, Y., Liu, K., Liu, L., E, Q., Lu, X., Yin, J., Shen, Y., 2019. Utility of GDF-15 as a diagnostic biomarker in gastric cancer: an investigation combining GEO, TCGA and meta-analysis. *FEBS Open Bio* 9, 35–42. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12537>

Liu, X., Chi, Xiumei, Gong, Q., Gao, L., Niu, Y., Chi, Xiaojing, Cheng, M., Si, Y., Wang, M., Zhong, J., Niu, J., Yang, W., 2015. Association of Serum Level of Growth

Differentiation Factor 15 with Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. PLOS ONE 10, e0127518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127518>

Liu, Y., Wang, X., Wang, T., Zhang, C., Zhang, K., ZANG, R., ZHI, X., ZHANG, W., SUN, K., 2016. Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1) as A Biomarker for Diagnosis and Prognosis of Stage I-II Non-small Cell Lung Cancer. Chin J Lung Cancer 19, 207–215. <https://doi.org/10.3779/10.3779/j.issn.1009-3419.2016.04.05>

Louie, D.A.P., Liao, S., 2019. Lymph Node Subcapsular Sinus Macrophages as the Frontline of Lymphatic Immune Defense. Front Immunol 10, 347. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00347>

Lüllmann-Rauch, R., 2019. Taschenlehrbuch Histologie, 6. ed. Georg Thieme Verlag.

„Machery-Nagel“ (2018): User Manual: Total RNA isolation from FFPE Samples. Online verfügbar unter: <https://www.mn-net.com/media/pdf/ac/bf/a7/Instruction-NucleoSpin-totalRNA-FFPE-XS.pdf>, zuletzt aktualisiert: 04/2018, zuletzt geprüft am 02.07.2020

Macia, L., Tsai, V.W.-W., Nguyen, A.D., Johnen, H., Kuffner, T., Shi, Y.-C., Lin, S., Herzog, H., Brown, D.A., Breit, S.N., Sainsbury, A., 2012. Macrophage Inhibitory Cytokine 1 (MIC-1/GDF15) Decreases Food Intake, Body Weight and Improves Glucose Tolerance in Mice on Normal & Obesogenic Diets. PLoS One 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034868>

Magadoux, L., Isambert, N., Plenchette, S., Jeannin, J.F., Laurens, V., 2014. Emerging targets to monitor and overcome docetaxel resistance in castration resistant prostate cancer (Review). International Journal of Oncology 45, 919–928. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2517>

Mandelker, D.L., Yamashita, K., Tokumaru, Y., Mimori, K., Howard, D.L., Tanaka, Y., Carvalho, A.L., Jiang, W.-W., Park, H.L., Kim, M.S., Osada, M., Mori, M., Sidransky, D., 2005. PGP9.5 Promoter Methylation Is an Independent Prognostic Factor for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Cancer Res 65, 4963–4968.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends in Immunology 25, 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>

March, B., Faulkner, S., Jobling, P., Steigler, A., Blatt, A., Denham, J., Hondermarck, H., 2020. Tumour innervation and neurosignalling in prostate cancer. Nat Rev Urol 17, 119–130. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0274-3>

Martin, A.M., Nirschl, T.R., Nirschl, C.J., Francica, B.J., Kochel, C.M., van Bokhoven, A., Meeker, A.K., Lucia, M.S., Anders, R.A., DeMarzo, A.M., Drake, C.G., 2015. Paucity of PD-L1 Expression in Prostate Cancer: Innate and Adaptive Immune Resistance. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 18, 325–332. <https://doi.org/10.1038/pcan.2015.39>

Martinez, F.O., Helming, L., Gordon, S., 2009. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132532>

Massagué, J., 2000. How cells read TGF- $\beta$  signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 169–178. <https://doi.org/10.1038/35043051>

Massagué, J., 1998. TGF- $\beta$  SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Biochemistry* 67, 753–791. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.753>

Massagué, J., Obenauf, A.C., 2016. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* 529, 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature17038>

Maurer, T., Gschwend, J.E., Rauscher, I., Souvatzoglou, M., Haller, B., Weirich, G., Wester, H.-J., Heck, M., Kübler, H., Beer, A.J., Schwaiger, M., Eiber, M., 2016. Diagnostic Efficacy of (68)Gallium-PSMA Positron Emission Tomography Compared to Conventional Imaging for Lymph Node Staging of 130 Consecutive Patients with Intermediate to High Risk Prostate Cancer. *J Urol* 195, 1436–1443. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.12.025>

May, K.F., Gulley, J.L., Drake, C.G., Dranoff, G., Kantoff, P.W., 2011. Prostate Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17, 5233–5238. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3402>

Mehta, R.S., Chong, D.Q., Song, M., Meyerhardt, J.A., Ng, K., Nishihara, R., Qian, Z., Morikawa, T., Wu, K., Giovannucci, E.L., Fuchs, C.S., Ogino, S., Chan, A.T., 2015. Association Between Plasma Levels of Macrophage Inhibitory Cytokine-1 Before Diagnosis of Colorectal Cancer and Mortality. *Gastroenterology* 149, 614–622. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.038>

Mehta, R.S., Song, M., Bezawada, N., Wu, K., Garcia-Albeniz, X., Morikawa, T., Fuchs, C.S., Ogino, S., Giovannucci, E.L., Chan, A.T., 2014. A Prospective Study of Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1/GDF15) and Risk of Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 106. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju016>



Meijers, W.C., van der Velde, A.R., de Boer, R.A., 2016. Biomarkers in heart failure with preserved ejection fraction. *Neth Heart J* 24, 252–258. <https://doi.org/10.1007/s12471-016-0817-7>

Min, K.-W., Liggett, J., Silva, G., Wu, W., Wang, R., Shen, R.-F., Eling, T., Baek, S., 2016. NAG-1/GDF15 Accumulates in the nucleus and modulates transcriptional regulation of the Smad pathway. *Oncogene* 35, 377–388. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.95>

Modi, A., Dwivedi, S., Roy, D., Khokhar, M., Purohit, P., Vishnoi, J., Pareek, P., Sharma, S., Sharma, P., Misra, S., 2019. Growth differentiation factor 15 and its role in carcinogenesis: an update 19.

Modolell, M., Corraliza, I.M., Link, F., Soler, G., Eichmann, K., 1995. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH 1 and TH 2 cytokines. *European Journal of Immunology* 25, 1101–1104. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250436>

Mori, R., Wang, Q., Danenberg, K.D., Pinski, J.K., Danenberg, P.V., 2008. Both  $\beta$ -actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *The Prostate* 68, 1555–1560. <https://doi.org/10.1002/pros.20815>

Mottet, N., Bellmunt, J., Bolla, M., Briers, E., Cumberbatch, M.G., De Santis, M., Fossati, N., Gross, T., Henry, A.M., Joniau, S., Lam, T.B., Mason, M.D., Matveev, V.B., Moldovan, P.C., van den Bergh, R.C.N., Van den Broeck, T., van der Poel, H.G., van der Kwast, T.H., Rouvière, O., Schoots, I.G., Wiegel, T., Cornford, P., 2017. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *European Urology* 71, 618–629. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.08.003>

Mulisch, M., Aescht, E., Romeis, B., 2015. Romeis Mikroskopische Technik, 19. ed. Springer Spektrum, Berlin.

Mullican, S.E., Lin-Schmidt, X., Chin, C.-N., Chavez, J.A., Furman, J.L., Armstrong, A.A., Beck, S.C., South, V.J., Dinh, T.Q., Cash-Mason, T.D., Cavanaugh, C.R., Nelson, S., Huang, C., Hunter, M.J., Rangwala, S.M., 2017. GFRAL is the receptor for GDF15 and the ligand promotes weight loss in mice and nonhuman primates. *Nature Medicine* 23, 1150–1157. <https://doi.org/10.1038/nm.4392>



Mullican, S.E., Rangwala, S.M., 2018. Uniting GDF15 and GFRAL: Therapeutic Opportunities in Obesity and Beyond. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 29, 560–570. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.05.002>

Nazarova, N., Qiao, S., Golovko, O., Lou, Y.-R., Tuohimaa, P., 2004. Calcitriol-induced prostate-derived factor: Autocrine control of prostate cancer cell growth. *International Journal of Cancer* 112, 951–958. <https://doi.org/10.1002/ijc.20510>

Nolte, M., Margadant, C., 2020. Controlling Immunity and Inflammation through Integrin-Dependent Regulation of TGF- $\beta$ . *Trends in Cell Biology* 30, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.10.002>

Ohaegbulam, K.C., Assal, A., Lazar-Molnar, E., Yao, Y., Zang, X., 2015. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends in Molecular Medicine* 21, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.10.009>

Ohigashi, Y., Sho, M., Yamada, Y., Tsurui, Y., Hamada, K., Ikeda, N., Mizuno, T., Yoriki, R., Kashizuka, H., Yane, K., Tsushima, F., Otsuki, N., Yagita, H., Azuma, M., Nakajima, Y., 2005. Clinical Significance of Programmed Death-1 Ligand-1 and Programmed Death-1 Ligand-2 Expression in Human Esophageal Cancer. *Clin Cancer Res* 11, 2947–2953. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1469>

Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T., Honjo, T., 2001. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13866–13871. <https://doi.org/10.1073/pnas.231486598>

Ozasa, K., Nakao, M., Watanabe, Y., Hayashi, K., Miki, T., Mikami, K., Mori, M., Sakauchi, F., Washio, M., Ito, Y., Suzuki, K., Wakai, K., Tamakoshi, A., 2004. Serum phytoestrogens and prostate cancer risk in a nested case-control study among Japanese men. *Cancer Science* 95, 65–71. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03172.x>

Pantel, K., Brakenhoff, R.H., 2004. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4, 448–456. <https://doi.org/10.1038/nrc1370>

Pantel, K., Brakenhoff, R.H., Brandt, B., 2008. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 8, 329–340. <https://doi.org/10.1038/nrc2375>

Paralkar, V.M., Vail, A.L., Grasser, W.A., Brown, T.A., Xu, H., Vukicevic, S., Ke, H.Z., Qi, H., Owen, T.A., Thompson, D.D., 1998. Cloning and Characterization of a Novel Member of the Transforming Growth Factor- $\beta$ /Bone Morphogenetic Protein Family. *J. Biol. Chem.* 273, 13760–13767. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13760>

Pardoll, D.M., 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 12, 252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>

Partin, A.W., Kattan, M.W., Subong, E.N.P., Walsh, P.C., Wojno, K.J., Oesterling, J.E., Scardino, P.T., Pearson, J.D., 1997. Combination of Prostate-Specific Antigen, Clinical Stage, and Gleason Score to Predict Pathological Stage of Localized Prostate Cancer: A Multi-institutional Update. *JAMA* 277, 1445–1451. <https://doi.org/10.1001/jama.1997.03540420041027>

Partin, A.W., Mangold, L.A., Lamm, D.M., Walsh, P.C., Epstein, J.I., Pearson, J.D., 2001. Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. *Urology* 58, 843–848. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(01\)01441-8](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(01)01441-8)

Peake, B.F., Eze, S.M., Yang, L., Castellino, R.C., Nahta, R., 2017. Growth differentiation factor 15 mediates epithelial mesenchymal transition and invasion of breast cancers through IGF-1R-FoxM1 signaling. *Oncotarget* 8, 94393–94406. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21765>

Peng, H., Li, Z., Fu, J., Zhou, R., 2019. Growth and differentiation factor 15 regulates PD-L1 expression in glioblastoma. *Cancer Manag Res* 11, 2653–2661. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S192095>

Poggio, M., Hu, T., Pai, C.-C., Chu, B., Belair, C.D., Chang, A., Montabana, E., Lang, U.E., Fu, Q., Fong, L., Billelloch, R., 2019. Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. *Cell* 177, 414-427.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.016>

Potter, S.R., Mangold, L.A., Shue, M.J., Taylor, D.C., Lecksell, K.L., Epstein, J.I., Walsh, P.C., Partin, A.W., 2000. Molecular and immunohistochemical staging of men with seminal vesicle invasion and negative pelvic lymph nodes at radical prostatectomy. *Cancer* 89, 2577–2586. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20001215\)89:12<2577::AID-CNCR10>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20001215)89:12<2577::AID-CNCR10>3.0.CO;2-V)

Qing, W., Fang, W.-Y., Ye, L., Shen, L.-Y., Zhang, X.-F., Fei, X.-C., Chen, X., Wang, W.-Q., Li, X.-Y., Xiao, J.-C., Ning, G., 2012. Density of tumor-associated macrophages correlates with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 22, 905–910. <https://doi.org/10.1089/thy.2011.0452>

Ramirez, J.-M., Schaad, O., Durual, S., Cossali, D., Docquier, M., Beris, P., Descombes, P., Matthes, T., 2009. Growth differentiation factor 15 production is necessary for normal erythroid differentiation and is increased in refractory anaemia with ring-sideroblasts. *British Journal of Haematology* 144, 251–262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07441.x>

Reeves, F.A., Battye, S., Roth, H., Peters, J.S., Hovens, C., Costello, A.J., Corcoran, N.M., 2019. Prostatic nerve subtypes independently predict biochemical recurrence in prostate cancer. *J Clin Neurosci* 63, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.01.052>

Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M., Wentzensen, N., 2009. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol Immunother* 58, 1535. <https://doi.org/10.1007/s00262-009-0733-4>

Ribas, A., 2015. Releasing the Brakes on Cancer Immunotherapy. *N Engl J Med* 373, 1490–1492. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1510079>

Robert Koch-Institut, 2019. Krebs in Deutschland | 2015/2016.

Roya, N., Fatemeh, T., Faramarz, M.-A., Milad, S.-G., Mohammad-Javad, S., Najmeh, S.-V., Yousef, M., Nader, B., 2020. Frequency of IL-10+CD19+ B cells in patients with prostate cancer compared to patients with benign prostatic hyperplasia. *Afr Health Sci* 20, 1264–1272. <https://doi.org/10.4314/ahs.v20i3.31>

Sadasivan, S.M., Chen, Y., Gupta, N.S., Han, X., Bobbitt, K.R., Chitale, D.A., Williamson, S.R., Rundle, A.G., Tang, D., Rybicki, B.A., 2020. The interplay of growth differentiation factor 15 (GDF15) expression and M2 macrophages during prostate carcinogenesis. *Carcinogenesis* 41, 1074–1082. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa065>

Salmaninejad, A., Valilou, S.F., Soltani, A., Ahmadi, S., Abarghan, Y.J., Rosengren, R.J., Sahebkar, A., 2019. Tumor-associated macrophages: role in cancer development and therapeutic implications. *Cell Oncol.* 42, 591–608. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00453-z>

Sarvaria, A., Madrigal, J.A., Saudemont, A., 2017. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cellular & Molecular Immunology* 14, 662–674. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.35>

Scheuermann, R.H., Racila, E., 1995. CD19 Antigen in Leukemia and Lymphoma Diagnosis and Immunotherapy. *Leukemia & Lymphoma* 18, 385–397. <https://doi.org/10.3109/10428199509059636>

Schiegnitz, E., Kämmerer, P.W., Koch, F.P., Krüger, M., Berres, M., Al-Nawas, B., 2012. GDF 15 as an anti-apoptotic, diagnostic and prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 48, 608–614. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.01.020>

Schiegnitz, E., Kämmerer, P.W., Rode, K., Schorn, T., Brieger, J., Al-Nawas, B., 2016. Growth differentiation factor 15 as a radiation-induced marker in oral carcinoma increasing radiation resistance. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 45, 63–69. <https://doi.org/10.1111/jop.12323>

Schilling-Tóth, B., Sándor, N., Walter, F., Bocsik, A., Sáfrány, G., Hegyesi, H., 2014. Role of GDF15 in radiosensitivity of breast cancer cells. *Open Life Sciences* 9, 982–992. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0328-8>

Schlomm, T., Sauter, G., 2016. Beurteilung des Prostatakarzinoms: Gleason-Score – Status 2016 [WWW Document]. URL <https://www.aerzteblatt.de/archiv/181220> (accessed 9.17.20).

Schmelz, H.-U., Sparwasser, C., Weidner, W. (Eds.), 2014. *Facharztwissen Urologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-44942-0>

Schulte, E., Schumacher, U., Schünke, M., 2018. *PROMETHEUS Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem: LernAtlas der Anatomie*. Georg Thieme Verlag.

Schwartz, M., Zhang, Y., Rosenblatt, J.D., 2016. B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis. *J Immunother Cancer* 4. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0145-x>

Selander, K.S., Brown, D.A., Sequeiros, G.B., Hunter, M., Desmond, R., Parpala, T., Risteli, J., Breit, S.N., Jukkola-Vuorinen, A., 2007. Serum Macrophage Inhibitory Cytokine-1 Concentrations Correlate with the Presence of Prostate Cancer Bone

Metastases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 532–537. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0841>

Senapati, S., Rachagani, S., Chaudhary, K., Johansson, S.L., Singh, R.K., Batra, S.K., 2010. Overexpression of macrophage inhibitory cytokine-1 induces metastasis of human prostate cancer cells through the FAK-RhoA signaling pathway. *Oncogene* 29, 1293–1302. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.420>

Sfanos, K.S., Hempel, H.A., De Marzo, A.M., 2014. The role of inflammation in prostate cancer. *Adv Exp Med Biol* 816, 153–181. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0837-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0837-8_7)

Shalapour, S., Lin, X.-J., Bastian, I.N., Brain, J., Burt, A.D., Aksenov, A.A., Vrbanac, A.F., Li, W., Perkins, A., Matsutani, T., Zhong, Z., Dhar, D., Navas-Molina, J.A., Xu, J., Loomba, R., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., Dorrestein, P.C., Knight, R., Benner, C., Anstee, Q.M., Karin, M., 2017. Inflammation-induced IgA<sup>+</sup> cells dismantle anti-liver cancer immunity. *Nature* 551, 340–345. <https://doi.org/10.1038/nature24302>

Shimura, S., Yang, G., Ebara, S., Wheeler, T.M., Frolov, A., Thompson, T.C., 2000. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer Res* 60, 5857–5861.

Shin, D.Y., Kim, G.Y., Kim, N.D., Jung, J.H., Kim, S.-K., Kang, H.S., Choi, Y.H., 2008. Induction of apoptosis by pectenotoxin-2 is mediated with the induction of DR4/DR5, Egr-1 and NAG-1, activation of caspases and modulation of the Bcl-2 family in p53-deficient Hep3B hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Reports* 19, 517–526. <https://doi.org/10.3892/or.19.2.517>

Shnaper, S., Desbaillets, I., Brown, D.A., Murat, A., Migliavacca, E., Schluep, M., Ostermann, S., Hamou, M.-F., Stupp, R., Breit, S.N., de Tribolet, N., Hegi, M.E., 2009. Elevated levels of MIC-1/GDF15 in the cerebrospinal fluid of patients are associated with glioblastoma and worse outcome. *Int J Cancer* 125, 2624–2630. <https://doi.org/10.1002/ijc.24639>

Shou, J., Zhang, Q., Wang, S., Zhang, D., 2018. The prognosis of different distant metastases pattern in prostate cancer: A population based retrospective study. *The Prostate* 78, 491–497. <https://doi.org/10.1002/pros.23492>

Sindrilaru, A., Peters, T., Wieschalka, S., Baican, C., Baican, A., Peter, H., Hainzl, A., Schatz, S., Qi, Y., Schlecht, A., Weiss, J.M., Wlaschek, M., Sunderkötter, C., Scharffetter-Kochanek, K., 2011. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage

population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest* 121, 985–997. <https://doi.org/10.1172/JCI44490>

Sleeman, J.P., Thiele, W., 2009. Tumor metastasis and the lymphatic vasculature. *Int. J. Cancer* 125, 2747–2756. <https://doi.org/10.1002/ijc.24702>

Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., Allavena, P., 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 86, 1065–1073. <https://doi.org/10.1189/jlb.0609385>

Spanopoulou, A., Gkretsi, V., 2020. Growth differentiation factor 15 (GDF15) in cancer cell metastasis: from the cells to the patients. *Clin Exp Metastasis* 37, 451–464. <https://doi.org/10.1007/s10585-020-10041-3>

Spranger, S., Spaapen, R.M., Zha, Y., Williams, J., Meng, Y., Ha, T.T., Gajewski, T.F., 2013. Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells. *Sci Transl Med* 5, 200ra116. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006504>

Staff, A.C., Trovik, J., Zahl, E.A.G., Wik, E., Wollert, K.C., Kempf, T., Salvesen, H.B., 2011. Elevated Plasma Growth Differentiation Factor-15 Correlates with Lymph Node Metastases and Poor Survival in Endometrial Cancer. *Clin Cancer Res* 17, 4825–4833. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0715>

Steeg, P.S., 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 12, 895–904. <https://doi.org/10.1038/nm1469>

Suesskind, D., Schatz, A., Schnichels, S., Coupland, S.E., Lake, S.L., Wissinger, B., Bartz-Schmidt, K.U., Henke-Fahle, S., 2012. GDF-15: a novel serum marker for metastases in uveal melanoma patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 250, 887–895. <https://doi.org/10.1007/s00417-011-1786-6>

Sunshine, J., Taube, J.M., 2015. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 23, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.011>

Swanson, G.P., Thompson, I.M., Basler, J., 2006. Treatment options in lymph node-positive prostate cancer. *Cancer* 106, 2531–2539. <https://doi.org/10.1002/cncr.21947>

Sznol, M., Chen, L., 2013. Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer. *Clin Cancer Res* 19, 1021–1034. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2063>

Tanno, T., Lim, Y., Wang, Q., Chesi, M., Bergsagel, P.L., Matthews, G., Johnstone, R.W., Ghosh, N., Borrello, I., Huff, C.A., Matsui, W., 2014. Growth differentiating factor 15 enhances the tumor-initiating and self-renewal potential of multiple myeloma cells. *Blood* 123, 725–733. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-524025>

Tanno, T., Noel, P., Miller, J.L., 2010. Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr Opin Hematol* 17, 184–190. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283337b52f>

Tanrikulu, O., Saryıldız, M.A., Batmaz, İ., Yazmalar, L., Polat, N., Kaplan, İ., Çevik, R., 2017. Serum GDF-15 level in rheumatoid arthritis: relationship with disease activity and subclinical atherosclerosis. *Acta Reumatol Port* 42, 66–72.

Tao, H., Lu, L., Xia, Y., Dai, F., Wang, Y., Bao, Y., Lundy, S.K., Ito, F., Pan, Q., Zhang, X., Zheng, F., Shu, G., Fang, B., Jiang, J., Xia, J., Huang, S., Li, Q., Chang, A.E., 2015. Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL-10. *Eur J Immunol* 45, 999–1009. <https://doi.org/10.1002/eji.201444625>

Taube, J.M., Anders, R.A., Young, G.D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T.L., Chen, S., Klein, A.P., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., Chen, L., 2012. Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Sci Transl Med* 4, 127ra37. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003689>

Teng, F., Meng, X., Kong, L., Yu, J., 2018. Progress and challenges of predictive biomarkers of anti PD-1/PD-L1 immunotherapy: A systematic review. *Cancer Letters* 414, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.014>

Thibult, M.-L., Mamessier, E., Gertner-Dardenne, J., Pastor, S., Just-Landi, S., Xerri, L., Chetaille, B., Olive, D., 2013. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *International Immunology* 25, 129–137. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxs098>

Thompson, R.H., Gillett, M.D., Cheville, J.C., Lohse, C.M., Dong, H., Webster, W.S., Chen, L., Zincke, H., Blute, M.L., Leibovich, B.C., Kwon, E.D., 2005. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 104, 2084–2091. <https://doi.org/10.1002/cncr.21470>

Thompson, R.H., Gillett, M.D., Cheville, J.C., Lohse, C.M., Dong, H., Webster, W.S., Krejci, K.G., Lobo, J.R., Sengupta, S., Chen, L., Zincke, H., Blute, M.L., Strome, S.E.,



Leibovich, B.C., Kwon, E.D., 2004. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17174–17179. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406351101>

Thüroff, J., 2016. Operative Anatomie der Prostata, in: Michel, M.S., Thüroff, J.W., Janetschek, G., Wirth, M. (Eds.), *Die Urologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1119–1131. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39940-4\\_132](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39940-4_132)

Tong, S., Marjono, B., Brown, D.A., Mulvey, S., Breit, S.N., Manuelpillai, U., Wallace, E.M., 2004. Serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC 1) as a predictor of miscarriage. *The Lancet* 363, 129–130. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15265-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15265-8)

Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., Leming, P.D., Spigel, D.R., Antonia, S.J., Horn, L., Drake, C.G., Pardoll, D.M., Chen, L., Sharfman, W.H., Anders, R.A., Taube, J.M., McMiller, T.L., Xu, H., Korman, A.J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G.D., Gupta, A., Wigginton, J.M., Sznol, M., 2012. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med* 366, 2443–2454. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>

Topalian, S.L., Taube, J.M., Anders, R.A., Pardoll, D.M., 2016. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 16, 275–287. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.36>

Touijer Karim, Rabbani Farhang, Otero Javier Romero, Secin Fernando P., Eastham James A., Scardino Peter T., Guillonneau Bertrand, 2007. Standard Versus Limited Pelvic Lymph Node Dissection for Prostate Cancer in Patients With a Predicted Probability of Nodal Metastasis Greater Than 1%. *Journal of Urology* 178, 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.03.018>

Traeger, L., Ellermann, I., Wiethoff, H., Ihbe, J., Gallitz, I., Eveslage, M., Moritz, R., Herrmann, E., Schrader, A.J., Steinbicker, A.U., 2019. Serum Hecpidin and GDF-15 levels as prognostic markers in urothelial carcinoma of the upper urinary tract and renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 19, 74. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5278-0>

Través, P.G., Luque, A., Hortelano, S., 2012. Macrophages, Inflammation, and Tumor Suppressors: ARF, a New Player in the Game. *Mediators of Inflammation* 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/568783>

Troiano, G., Caponio, V.C.A., Adipietro, I., Tepedino, M., Santoro, R., Laino, L., Lo Russo, L., Cirillo, N., Lo Muzio, L., 2019. Prognostic significance of CD68+ and



CD163+ tumor associated macrophages in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 93, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.04.019>

Trovik, J., Salvesen, H.B., Cuppens, T., Amant, F., Staff, A.C., 2014. Growth Differentiation Factor-15 as Biomarker in Uterine Sarcomas. *Int J Gynecol Cancer* 24, 252–259. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000037>

TSA for immunohistochemistry, [https://www.youtube.com/watch?v=wMcYNN9\\_4HQ](https://www.youtube.com/watch?v=wMcYNN9_4HQ), zuletzt geprüft am 15.04.2021)

Tsai, V.W.W., Husaini, Y., Sainsbury, A., Brown, D.A., Breit, S.N., 2018. The MIC-1/GDF15-GFRAL Pathway in Energy Homeostasis: Implications for Obesity, Cachexia, and Other Associated Diseases. *Cell Metabolism* 28, 353–368. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.018>

Tsaur, I., Renninger, M., Hennenlotter, J., Oppermann, E., Munz, M., Kuehs, U., Stenzl, A., Schilling, D., 2013. Reliable Housekeeping Gene Combination for Quantitative PCR of Lymph Nodes in Patients with Prostate Cancer. *ANTICANCER RESEARCH* 6.

Tseng, S.Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J.E., Pai, S.I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D.M., Tsuchiya, H., 2001. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 193, 839–846. <https://doi.org/10.1084/jem.193.7.839>

Tsui, K.-H., Chang, Y.-L., Feng, T.-H., Chung, L.-C., Lee, T.-Y., Chang, P.-L., Juang, H.-H., 2012. Growth differentiation factor-15 upregulates interleukin-6 to promote tumorigenesis of prostate carcinoma PC-3 cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 49, 153–163. <https://doi.org/10.1530/JME-11-0149>

Ünal, B., Alan, S., Başsorgun, C.İ., Karakaş, A.A., Elpek, G.Ö., Çiftçioğlu, M.A., 2015. The divergent roles of growth differentiation factor-15 (GDF-15) in benign and malignant skin pathologies. *Arch Dermatol Res* 307, 551–557. <https://doi.org/10.1007/s00403-015-1546-2>

Unsicker, K., Spittau, B., Krieglstein, K., 2013. The multiple facets of the TGF- $\beta$  family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 24, 373–384. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.05.003>

Urakawa, N., Utsunomiya, S., Nishio, M., Shigeoka, M., Takase, N., Arai, N., Kakeji, Y., Koma, Y., Yokozaki, H., 2015. GDF15 derived from both tumor-associated

macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression via Akt and Erk pathways. *Laboratory Investigation* 95, 491–503. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.36>

Vaňhara, P., Lincová, E., Kozubík, A., Jurdic, P., Souček, K., Šmarda, J., 2009. Growth/differentiation factor-15 inhibits differentiation into osteoclasts—A novel factor involved in control of osteoclast differentiation. *Differentiation* 78, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2009.07.008>

Velcheti, V., Schalper, K.A., Carvajal, D.E., Anagnostou, V.K., Syrigos, K.N., Sznol, M., Herbst, R.S., Gettinger, S.N., Chen, L., Rimm, D.L., 2014. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Laboratory Investigation* 94, 107–116. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.130>

Velho, P.I., Antonarakis, E.S., 2018. PD-1/PD-L1 Pathway Inhibitors in Advanced Prostate Cancer. *Expert Rev Clin Pharmacol* 11, 475–486. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1464388>

Visser, K.E. de, Korets, L.V., Coussens, L.M., 2005. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 7, 411–423. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.014>

Wang, K., Wei, G., Liu, D., 2012. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental Hematology & Oncology* 1, 36. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-1-36>

Wang, L., Liu, Y., Li, W., Song, Z., 2017a. Growth differentiation factor 15 promotes cell viability, invasion, migration, and angiogenesis in human liver carcinoma cell line HepG2. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 41, 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2016.12.009>

Wang, T., Mao, B., Cheng, C., Zou, Z., Gao, J., Yang, Y., Lei, T., Qi, X., Yuan, Z., Xu, W., Lu, Z., 2018. YAP promotes breast cancer metastasis by repressing growth differentiation factor-15. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1864, 1744–1753. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.02.020>

Wang, W., Yang, X., Dai, J., Lu, Y., Zhang, J., Keller, E.T., 2019. Prostate cancer promotes a vicious cycle of bone metastasis progression through inducing osteocytes to secrete GDF15 that stimulates prostate cancer growth and invasion. *Oncogene* 38, 4540–4559. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0736-3>

Wang, X., Yang, Z., Tian, H., Li, Y., Li, M., Zhao, W., Zhang, C., Wang, T., Liu, J., Zhang, A., Shen, D., Zheng, C., Qi, J., Zhao, D., Shi, J., Jin, L., Rao, J., Zhang, W., 2017b. Circulating MIC-1/GDF15 is a complementary screening biomarker with CEA and correlates with liver metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Oncotarget* 8, 24892–24901. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15279>

Wang, X.-B., Jiang, X.-R., Yu, X.-Y., Wang, L., He, S., Feng, F.-Y., Guo, L.-P., Jiang, W., Lu, S.-H., 2014. Macrophage inhibitory factor 1 acts as a potential biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma and is a target for antibody-based therapy. *Cancer Sci* 105, 176–185. <https://doi.org/10.1111/cas.12331>

Weckermann Dorothea, Dorn Robert, Trefz M., Wagner Theodor, Wawroschek Friedhelm, Harzmann Rolf, 2007. Sentinel Lymph Node Dissection for Prostate Cancer: Experience With More Than 1,000 Patients. *Journal of Urology* 177, 916–920. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.10.074>

Weide, B., Schäfer, T., Martens, A., Kuzkina, A., Uder, L., Noor, S., Garbe, C., Harter, P.N., Mittelbronn, M., Wischhusen, J., 2016. High GDF-15 Serum Levels Independently Correlate with Poorer Overall Survival of Patients with Tumor-Free Stage III and Unresectable Stage IV Melanoma. *J Invest Dermatol* 136, 2444–2452. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.07.016>

Welsch, U., Kummer, W., Deller, T., 2018. *Histologie - Das Lehrbuch*. Elsevier Health Sciences.

Welsh, J.B., Sapinoso, L.M., Kern, S.G., Brown, D.A., Liu, T., Bauskin, A.R., Ward, R.L., Hawkins, N.J., Quinn, D.I., Russell, P.J., Sutherland, R.L., Breit, S.N., Moskaluk, C.A., Frierson, H.F., Hampton, G.M., 2003. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3410–3415. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530278100>

Wertz, K., Siler, U., Goralczyk, R., 2004. Lycopene: modes of action to promote prostate health. *Arch. Biochem. Biophys.* 430, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.04.023>

Westhrin, M., Moen, S.H., Holien, T., Mylin, A.K., Heickendorff, L., Olsen, O.E., Sundan, A., Turesson, I., Gimsing, P., Waage, A., Standal, T., 2015. Growth differentiation factor 15 (GDF15) promotes osteoclast differentiation and inhibits osteoblast differentiation and high serum GDF15 levels are associated with multiple myeloma bone disease. *Haematologica, Supplement* 100, E511–E514. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.124511>

Wiklund, F.E., Bennet, A.M., Magnusson, P.K.E., Eriksson, U.K., Lindmark, F., Wu, L., Yaghoutifam, N., Marquis, C.P., Stattin, P., Pedersen, N.L., Adami, H.-O., Grönberg, H., Breit, S.N., Brown, D.A., 2010. Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15): a new marker of all-cause mortality. *Aging Cell* 9, 1057–1064. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00629.x>

Windrichova, J., Fuchsova, R., Kucera, R., Topolcan, O., Fiala, O., Finek, J., Slipkova, D., 2017. MIC1/GDF15 as a Bone Metastatic Disease Biomarker. *Anticancer Res* 37, 1501–1505.

Winter, A., Kneib, T., Wasylow, C., Reinhardt, L., Henke, R.-P., Engels, S., Gerullis, H., Wawroschek, F., 2017. Updated Nomogram Incorporating Percentage of Positive Cores to Predict Probability of Lymph Node Invasion in Prostate Cancer Patients Undergoing Sentinel Lymph Node Dissection. *J Cancer* 8, 2692–2698. <https://doi.org/10.7150/jca.20409>

Wischhusen, J., Melero, I., Fridman, W.H., 2020. Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15): From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint. *Front. Immunol.* 11, 951. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00951>

Xu Jian, Kimball Thomas R., Lorenz John N., Brown David A., Bauskin Asne R., Klevitsky Raisa, Hewett Timothy E., Breit Samuel N., Molkentin Jeffery D., 2006. GDF15/MIC-1 Functions As a Protective and Antihypertrophic Factor Released From the Myocardium in Association With SMAD Protein Activation. *Circulation Research* 98, 342–350. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000202804.84885.d0>

Xu, Q., Xu, H.-X., Li, J.-P., Wang, S., Fu, Z., Jia, J., Wang, L., Zhu, Z.-F., Lu, R., Yao, Z., 2017. Growth differentiation factor 15 induces growth and metastasis of human liver cancer stem-like cells via AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling. *Oncotarget* 8, 16972–16987. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15216>

Yamaguchi, K., Lee, S.-H., Eling, T.E., Baek, S.J., 2004. Identification of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-activated Gene (NAG-1) as a Novel Downstream Target of Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/GSK-3 $\beta$  Pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 49617–49623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408796200>

Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Okumura, K., Azuma, M., Yagita, H., 2002. Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *The Journal of Immunology* 169, 5538–5545. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5538>

Yang, C.Z., Ma, J., Zhu, D.W., Liu, Y., Montgomery, B., Wang, L.Z., Li, J., Zhang, Z.Y., Zhang, C.P., Zhong, L.P., 2014. GDF15 is a potential predictive biomarker for TPF induction chemotherapy and promotes tumorigenesis and progression in oral squamous cell carcinoma. *Annals of Oncology* 25, 1215–1222. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu120>

Yang, H., Filipovic, Z., Brown, D., Breit, S.N., Vassilev, L.T., 2003. Macrophage inhibitory cytokine-1: A novel biomarker for p53 pathway activation. *Mol Cancer Ther* 2, 1023–1029.

Yang, L., Chang, C.-C., Sun, Z., Madsen, D., Zhu, H., Padkjær, S.B., Wu, X., Huang, T., Hultman, K., Paulsen, S.J., Wang, J., Bugge, A., Frantzen, J.B., Nørgaard, P., Jeppesen, J.F., Yang, Z., Secher, A., Chen, H., Li, X., John, L.M., Shan, B., He, Z., Gao, X., Su, J., Hansen, K.T., Yang, W., Jørgensen, S.B., 2017. GFRAL is the receptor for GDF15 and is required for the anti-obesity effects of the ligand. *Nature Medicine* 23, 1158–1166. <https://doi.org/10.1038/nm.4394>

Yuan, C., Liu, Z., Yu, Q., Wang, X., Bian, M., Yu, Z., Yu, J., 2019. Expression of PD-1/PD-L1 in primary breast tumours and metastatic axillary lymph nodes and its correlation with clinicopathological parameters. *Scientific Reports* 9, 14356. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50898-3>

Yuen, G.J., Demissie, E., Pillai, S., 2016. B Lymphocytes and Cancer: A Love–Hate Relationship. *Trends in Cancer* 2, 747–757. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.10.010>

Yuri, P., Shigemura, K., Kitagawa, K., Hadibrata, E., Risan, M., Zulfiqqar, A., Soeroharjo, I., Hendri, A.Z., Danarto, R., Ishii, A., Yamasaki, S., Yan, Y., Heriyanto, D.S., Fujisawa, M., 2020. Increased tumor-associated macrophages in the prostate cancer microenvironment predicted patients' survival and responses to androgen deprivation therapies in Indonesian patients cohort. *Prostate Int* 8, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.pnil.2019.12.001>

Zeegers, M.P.A., Jellema, A., Ostrer, H., 2003. Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis. *Cancer* 97, 1894–1903. <https://doi.org/10.1002/cncr.11262>

Zhang, X., Kang, Y., Huo, T., Tao, R., Wang, X., Li, Z., Guo, Q., Zhao, L., 2017. GL-V9 induced upregulation and mitochondrial localization of NAG-1 associates with ROS

generation and cell death in hepatocellular carcinoma cells. *Free Radical Biology and Medicine* 112, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.011>

Zhang, X., Schwartz, J.-C.D., Guo, X., Bhatia, S., Cao, E., Chen, L., Zhang, Z.-Y., Edidin, M.A., Nathenson, S.G., Almo, S.C., 2004. Structural and Functional Analysis of the Costimulatory Receptor Programmed Death-1. *Immunity* 20, 337–347. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00051-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00051-2)

Zhang, Y., Wang, X., Zhang, M., Zhang, Z., Jiang, L., Li, L., 2018. GDF15 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 46, 652–658. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1466146>

Zhang, Ying, Hua, W., Niu, L., Li, S., Wang, Y., Shang, L., Zhang, C., Li, W., Wang, R., Chen, B., Xin, X., Zhang, Ying-qi, Wang, J., 2016. Elevated growth differentiation factor 15 expression predicts poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Tumor Biol.* 37, 9423–9431. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4699-x>

Zhao, D., Wang, X., Zhang, W., 2018. GDF15 predict platinum response during first-line chemotherapy and can act as a complementary diagnostic serum biomarker with CA125 in epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 18, 328. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4246-4>

Zhao, L., Lee, B.Y., Brown, D.A., Molloy, M.P., Marx, G.M., Pavlakis, N., Boyer, M.J., Stockler, M.R., Kaplan, W., Breit, S.N., Sutherland, R.L., Henshall, S.M., Horvath, L.G., 2009. Identification of Candidate Biomarkers of Therapeutic Response to Docetaxel by Proteomic Profiling. *Cancer Res* 69, 7696–7703. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4901>

Zhong, X., Tumang, J.R., Gao, W., Bai, C., Rothstein, T.L., 2007. PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for VH11/VH12 and phosphatidylcholine binding. *European Journal of Immunology* 37, 2405–2410. <https://doi.org/10.1002/eji.200737461>

Zirakzadeh, A.A., Marits, P., Sherif, A., Winqvist, O., 2013. Multiplex B Cell Characterization in Blood, Lymph Nodes, and Tumors from Patients with Malignancies. *The Journal of Immunology* 190, 5847–5855. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203279>

Zou, W., 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Reviews Cancer* 5, 263–274. <https://doi.org/10.1038/nrc1586>



## 7. Anhang

### 7.1 Ergänzende Abbildungen, Tabellen und Diagramme

#### 7.1.1 TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms

Tabelle 20: TNM-Klassifikation des PCa

T - Primärtumor (Stadiumeinteilung erfolgt anhand digital rektaler Untersuchung [DRU])	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer <u>Tumor</u> : Weder tast- noch sichtbar
	T1a Prostatakarzinom in <5% des untersuchten Präparats, zufälliger histologischer Befund
	T1b Prostatakarzinom in >5% des untersuchten Präparats, zufälliger histologischer Befund
	T1c Prostatakarzinom in Stanzbiopsie bei nicht-tastbarem <u>Tumor</u>
T2	Primärtumor ist tastbar, Primärtumor ist tastbar und auf die Prostatakapsel beschränkt
	T2a Befall von <50% eines Seitenlappens
	T2b Befall von >50% eines Seitenlappens
	T2c Befall beider Seitenlappen
T3	Extraprostatisches Tumorwachstum, <u>Tumor</u> durchbricht Prostatakapsel
	T3a Extrakapsuläre Ausbreitung (unilateral oder bilateral)
	T3b Samenblaseninfiltration
T4	Tumor ist fixiert oder infiltrierte andere benachbarte Strukturen als Samenblasen: z.B. Sphincter externus und/oder Rektum und/oder Levatormuskel und/oder Beckenwand
N - Regionäre Lymphknoten*	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionäre Lymphknotenmetastase
N1	Regionäre Lymphknotenmetastase
M - Fernmetastasen**	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
	M1a Nichtregionärer Lymphknoten
	M1b Knochen
	M1c Andere Lokalisationen

\* Metastasen >0,2cm werden als Nmi eingestuft

\*\* Sind mehrere Organe/Gewebe von Metastasen betroffen, wird die höchste Kategorie verwendet. Die höchste Kategorie ist (p)M1c.



Die pTNM-Klassifikation erfolgt nach histopathologischer Untersuchung des Gewebes (Brierley et al., 2017).

### 7.1.2 Risikoklassen des Prostatakarzinoms

Risikostratifizierung der Patienten mit klinisch lokalisiertem PCa für die Wahrscheinlichkeit eines biochemischen Rezidivs nach Strahlentherapie

#### niedriges Risikoprofil (Low Risk):

- T1a–T2a N0 M0 und
- PSA <10 ng/ml und
- Gleason-Score ≤6

#### mittleres Risikoprofil (Intermediate Risk):

- T2 b oder
- PSA 10–20 ng/ml oder
- Gleason-Score 7

#### hohes Risikoprofil (High Risk):

- T2c oder
- PSA >20 ng/ml oder
- Gleason-Score ≥ 8

(D'Amico et al., 2006)

### 7.1.3 Partin-Tabellen

Die Partin-Tabellen zeigen die Wahrscheinlichkeiten (in %) der pathologischen Stadien.  
Tabelle

Tabelle 21: Partin-Tabelle für PSA-Werte zwischen 0 und 2,5 µg/ml

Gleason-Score	Klinisches Stadium				Pathologisches Stadium
	T1c	T2a	T2b	T2c	
2–4	95	91	88	86	Organbegrenzt
	5	9	12	14	Extrakapsuläre Ausbreitung
	–	–	–	–	Befall der Samenblasen
	–	–	–	–	Positive Lymphknoten
5–6	90	81	75	73	Organbegrenzt
	9	17	22	24	Extrakapsuläre Ausbreitung

	0	1	2	1	Befall der Samenblasen
	-	0	1	1	Positive Lymphknoten
3+4=7	79	64	54	51	Organbegrenzt
	17	29	35	36	Extrakapsuläre Ausbreitung
	2	5	6	5	Befall der Samenblasen
	1	2	4	6	Positive Lymphknoten
4+3=7	71	53	43	39	Organbegrenzt
	25	40	45	45	Extrakapsuläre Ausbreitung
	2	4	5	5	Befall der Samenblasen
	1	3	6	9	Positive Lymphknoten
8-10	66	47	37	34	Organbegrenzt
	28	42	46	47	Extrakapsuläre Ausbreitung
	4	7	9	8	Befall der Samenblasen
	1	3	6	10	Positive Lymphknoten

(Partin et al., 2001)

Tabelle 22: Partin-Tabelle für PSA-Werte zwischen 2,6 und 4,0 µg/ml

Gleason-Score	Klinisches Stadium				Pathologisches Stadium
	T1c	T2a	T2b	T2c	
2-4	92	85	80	78	Organbegrenzt
	8	15	20	22	Extrakapsuläre Ausbreitung
	-	-	-	-	Befall der Samenblasen
	-	-	-	-	Positive Lymphknoten
5-6	84	71	63	61	Organbegrenzt
	15	27	34	36	Extrakapsuläre Ausbreitung
	1	2	2	2	Befall der Samenblasen
	-	0	1	1	Positive Lymphknoten
3+4=7	68	50	41	38	Organbegrenzt
	27	41	47	48	Extrakapsuläre Ausbreitung
	4	7	9	8	Befall der Samenblasen
	1	2	3	5	Positive Lymphknoten
4+3=7	58	39	30	27	Organbegrenzt
	37	52	57	57	Extrakapsuläre Ausbreitung

	4	6	7	6	Befall der Samenblasen
	1	2	4	7	Positive Lymphknoten
8-10	52	33	25	23	Organbegrenzt
	40	53	57	57	Extrakapsuläre Ausbreitung
	6	10	12	10	Befall der Samenblasen
	1	3	5	8	Positive Lymphknoten

(Partin et al., 2001)

Tabelle 23: Partin-Tabelle für PSA-Werte zwischen 4,1 und 6,0 µg/ml

Gleason-Score	Klinisches Stadium				Pathologisches Stadium
	T1c	T2a	T2b	T2c	
2-4	90	81	75	73	Organbegrenzt
	10	19	25	27	Extrakapsuläre Ausbreitung
	-	-	-	-	Befall der Samenblasen
	-	-	-	-	Positive Lymphknoten
5-6	80	66	57	55	Organbegrenzt
	19	32	39	40	Extrakapsuläre Ausbreitung
	1	1	2	2	Befall der Samenblasen
	0	1	2	3	Positive Lymphknoten
3+4=7	63	44	35	31	Organbegrenzt
	32	46	51	50	Extrakapsuläre Ausbreitung
	3	5	7	6	Befall der Samenblasen
	2	4	7	12	Positive Lymphknoten
4+3=7	52	33	25	21	Organbegrenzt
	42	56	60	57	Extrakapsuläre Ausbreitung
	3	5	5	4	Befall der Samenblasen
	3	6	10	16	Positive Lymphknoten
8-10	46	28	21	18	Organbegrenzt
	45	58	59	57	Extrakapsuläre Ausbreitung
	5	8	9	7	Befall der Samenblasen
	3	6	10	16	Positive Lymphknoten

(Partin et al., 2001)

## 7.1.4 Briganti-Nomogram

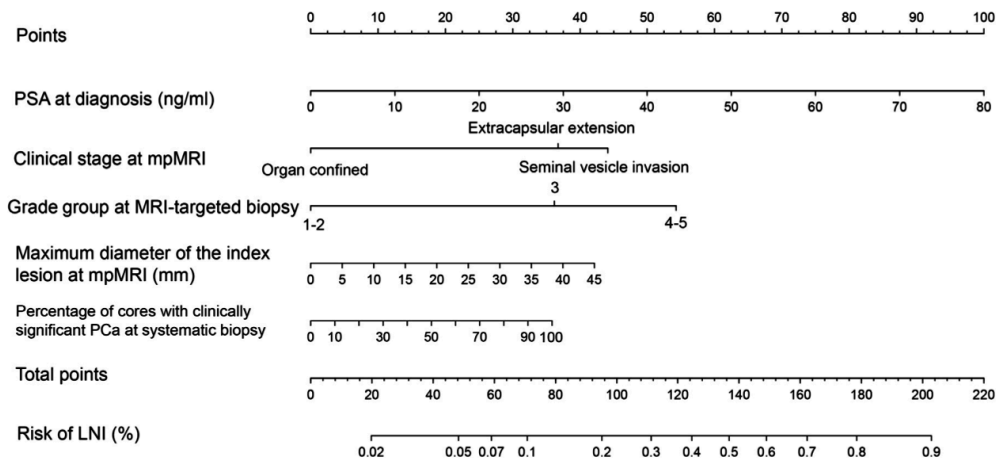


Abbildung 49: Briganti-Nomogramm

Nomogramm zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit der Lymphknoteninvasion für Prostatakrebspatienten, welche mittels gezielter Biopsien während radikaler Prostatektomie und ePLND behandelt wurden. (mpMRI: multiparametric magnetic resonance imaging; multiparametrische Magnetresonanztomographie). (Gandaglia et al., 2019)

## 7.1.5 Lymphknoten-Präparate

Tabelle 24: Lymphknoten-Präparate mit zugehöriger Präparats-Nummer und zugehörigen Prostata-Präparat

Blöcke		T	Gleason-Score	Gewebe
11669/10 11670/10	E2b 1a	3a	6	Prostata Lymphknoten
7096/10 7097/10	D2b	2a	6	Prostata Lymphknoten
7233/10 7232/10	E1a 1a	2c	6	Prostata Lymphknoten
12448/10 12449/10	F1b	3a	7	Prostata Lymphknoten
9508/07 9507/07	O2b 3a	2c	7	Prostata Lymphknoten
7747/10 7746/10	F1b 4b	3b	9	Prostata Lymphknoten
11586/13 11585/13	D1b 2a	3b	9	Prostata Lymphknoten

## 7.1.6 Positiv- und Negativkontrollen

Tabelle 25: Gewebe und Präparatnummern der Positiv- und Negativkontrollen, welche zur Etablierung der Antikörper verwendet wurden

Gewebe	Präparatnummer
Prostata	11586/13 D1b 242/13 F2b
Plazenta	Decidua basalis (mütterlicher Anteil): 1331d Chorion frondosum (kindlicher Anteil): 1331b

## 7.1.7 Bestimmung der RNA-Konzentration, -Qualität und -Quantität

Tabellarisch aufgelistet sind die RNA-Eluate der Lymphknotenproben, PCa- und BPH-Präparate sowie der Plazentaprobe. Die RNA-Konzentration sowie die Extinktionswerte wurden mittels NanoDrop 2100 ermittelt. Daraus konnten folglich die benötigte Menge an RNA berechnet werden, welche für die cDNA-Synthese eingesetzt wurde.

Tabelle 26: Übersicht über die RNA-Eluate, RNA-Konzentration, und Extinktionswerte der jeweiligen Probe

Präparat	Probe	Gewebe	G S	RNA- Konzentr ation	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/280</sub> 30	V (200n g RNA)
11670/10/1a	11670	LK	6	53,1 ng/µl	1,328	0,7	1,9	1,27	3,8µl
7232/10/1a	7232	LK	6	57,6 ng/µl	1,441	0,772	1,87	1,117	3,5µl
7097/10	-	LK	6	7,7 ng/µl	0,192	0,12	1,6	0,39	-
12449/10	12449	LK	7	12,1 ng/µl	0,301	0,165	1,83	0,57	11,7µl
9507/07/3a	9507	LK	7	27,4 ng/µl	0,684	0,381	1,8	0,78	7,3µl
7746/10/4b	7746	LK	9	51,5 ng/µl	1,288	0,684	1,88	1,21	3,9µl
11585/13/2a	-	LK	9	8,8 ng/µl	0,216	0,124	1,74	0,44	-
9508/07/02b	Prost 9508	Prostata	7	60,1 ng/µl	1,503	0,844	1,78	1,16	3,4µl
7447/10/F1b	Prost 7747	Prostata	9	70,2 ng/µl	1,756	0,919	1,91	1,44	2,8µl

Präparat	Probe	Gewebe	G S	RNA- Konzentr ation	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/280</sub> 30	V (200ng RNA)
581/11/2a	BPH8	Prostata	-	188,4 ng/ µl	4,711	2,412	1,95	1,89	1,1µl
21932/11/ 1Ab	BPH9	Prostata	-	251,2 ng/ µl	6,28	3,243	1,94	1,87	0,8µl
1331d	pos Ko Mutt	Plazenta	-	32,9 ng/µl	0,824	0,443	1,86	1,14	6,1µl
1331b	pos Ko Kind	Plazenta	-	19,2ng/µl	0,481	0,259	1,85	0,80	10,4µl

### 7.1.8 Gelelektrophorese-Agarosegele der GAPDH RT-qPCR Produkte

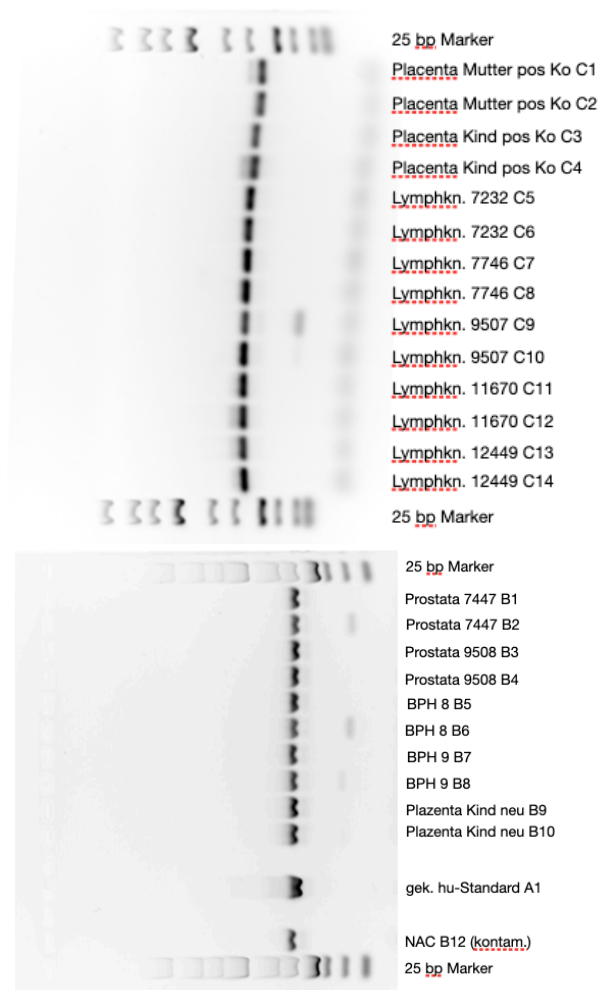


Abbildung 50: Aufnahmen des 2,5%igen Agarosegels der GAPDH PCR Produkte

### 7.1.9 Gelelektrophorese-Agarosegele der GDF-15 RT-qPCR Produkte

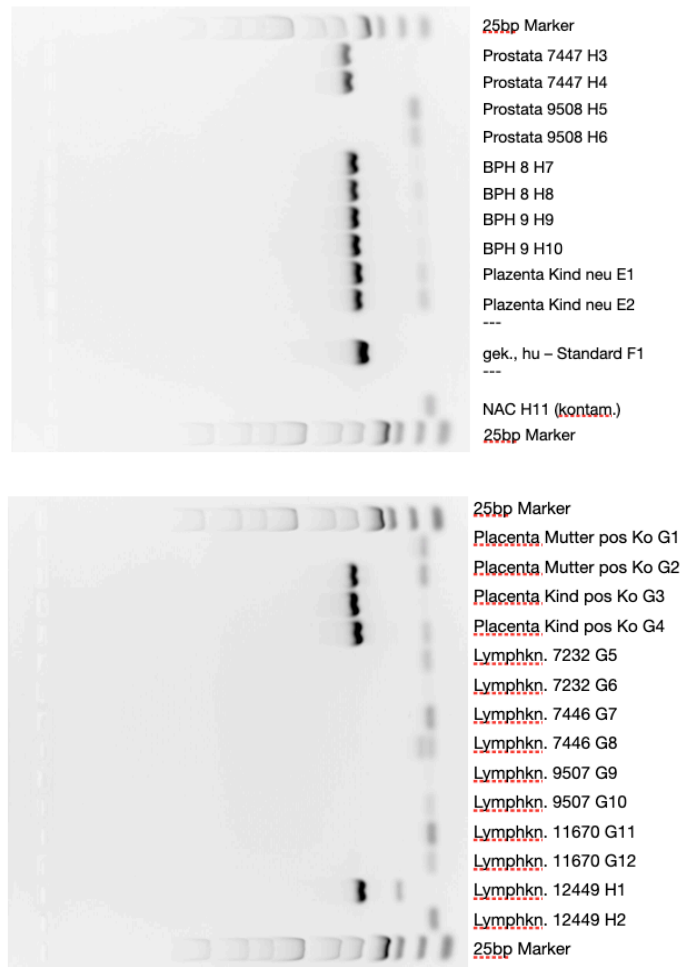


Abbildung 51: Aufnahmen der 2,5%igen Agarosegele der GDF-15 PCR Produkte

## 7.1.10 Gelelektrophorese-Agarosegele der PD-L1 RT-qPCR Produkte

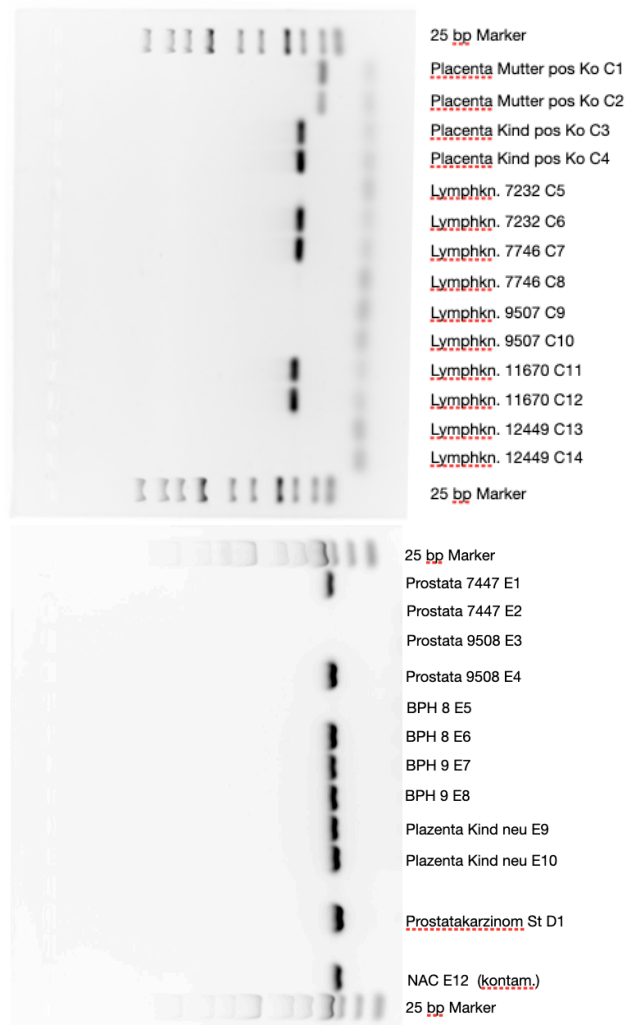


Abbildung 52: Aufnahme des 2,5%igen Agarosegels der PD-L1 PCR Produkte



### 7.1.11 Gelelektrophorese-Agarosegele der PGP 9.5 RT-qPCR Produkte

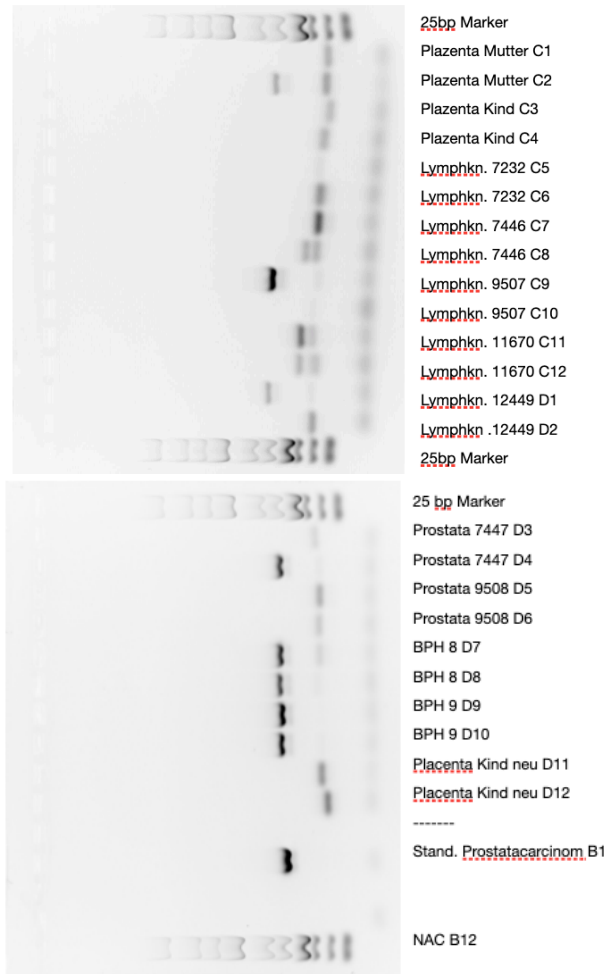


Abbildung 53: Aufnahmen der 2,5%igen Agarosegele der PGP 9.5 PCR Produkte

## 7.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Arweiler	Mengel
Auschill	Milani
Bette	Mittag
Braun	Moll
Brink	Neff
Eubel	Neumüller
Feuser	Nonnenmacher
Fischer	Oliver
Frankenberger	Pieper
Gente	Plant
Gloerfeld	Ramaswamy
Höffken	Roggendorf
Jablonski-Momeni	Weber
Jerrentrup	Weihe
Kinscherf	Westermann
Korbmacher-Steiner	Winter
Lill	Wrocklage
Lotzmann	Ziebart
Mandic	

### **7.3 Danksagung**

Zum Abschluss meiner Dissertation möchte ich allen Personen meinen Dank aussprechen, die mich während dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Ralf Kinscherf dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und für sein großes Engagement als Betreuer.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Gabriel Bonaterra für sein großes Engagement und seine Geduld bei Rückfragen, der kritischen Betrachtung der Methodik sowie der Erörterung immer neuer Schnitte. Außerdem für die Korrektur des Entwurfes und die vielen weiteren wegweisenden Ratschläge und Tipps. Neben der freundschaftlichen, fachlichen Betreuung möchte ich mich sehr für das unterstützende und ermutigende Arbeitsklima bedanken.

Bei allen Mitarbeitern der AG Kinscherf, insbesondere Michael Dreher, Barbara Wiegand, Elke Völck-Badouin und Marion Zibuschka möchte ich mich für die Unterstützung in methodischen und fachlichen Belangen sowie das freundliche Miteinander bedanken. Hans Schwarzbach danke ich für die technischen Einweisungen in die Mikroskopie und die Informatik.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und Freunden danken, die mir während meiner Promotion stets motivierend zur Seite standen. Meinem Bruder Steffen sowie meiner Freundin Carolin und Stiefschwiegervater in spe Gunter danke ich für die Korrekturen an meiner Arbeit. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Partner Tobias Weirauch, für seine unermüdliche Motivation.