

Aus dem
CharitéCentrum für Chirurgische Medizin
Klinik für Urologie
Direktor: Prof. Dr. Kurt Miller

Habilitationsschrift

Die Kallikrein-verwandten Peptidasen 14 und 15 sowie der endogene Metalloproteinase-Inhibitor RECK als Biomarker für urologische Tumoren und die funktionelle Bedeutung des RECK-Proteins in Prostatakarzinomzellen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Translationale Biochemie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. Anja Rabien

Eingereicht: Juli 2014

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang A. Schulz

2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Margitta Retz

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	4
1.	Einleitung	5
2.	Biomarker in urologischen Tumoren	6
2.1	KLK14 als Biomarker beim Prostatakarzinom	6
	Sonderdruck	7
	Rabien A, Fritzsche F, Jung M, Diamandis EP, Loening SA, Dietel M, Jung K, Stephan C, Kristiansen G: High expression of KLK14 in prostatic adenocarcinoma is associated with elevated risk of prostate-specific antigen relapse. <i>Tumour Biol</i> 2008;29:1-8.	
2.2	KLK15 als Biomarker beim Prostatakarzinom	15
	Sonderdruck	16
	Rabien A, Fritzsche FR, Jung M, Tolle A, Diamandis EP, Miller K, Jung K, Kristiansen G, Stephan C: KLK15 is a prognostic marker for progression-free survival in patients with radical prostatectomy. <i>Int J Cancer</i> 2010;127:2386-2394.	
2.3	RECK als Biomarker beim Prostatakarzinom	25
	Sonderdruck	26
	Rabien A, Burkhardt M, Jung M, Fritzsche F, Ringsdorf M, Schicktanz H, Loening SA, Kristiansen G, Jung K: Decreased RECK expression indicating proteolytic imbalance in prostate cancer is associated with higher tumor aggressiveness and risk of prostate-specific antigen relapse after radical prostatectomy. <i>Eur Urol</i> 2007;51:1259-1266.	
2.4	RECK als Biomarker beim Harnblasenkarzinom	34
	Sonderdruck	35
	Wittschieber D, Stenzinger A, Klauschen F, Stephan C, Jung K, Erbersdobler A, Rabien A: Decreased RECK and Increased EMMPRIN Expression in Urothelial Carcinoma of the Bladder Are Associated with Tumor Aggressiveness. <i>Pathobiology</i> 2011;78:123-131.	
2.5	RECK als Biomarker beim Nierenzellkarzinom	44
	Sonderdruck	45
	Rabien A, Stephan C, Kilic E, Weichert W, Kristiansen G, Miller K, Jung K, Erbersdobler A: Renal cell neoplasias: reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs discriminates tumor subtypes, while extracellular matrix metalloproteinase inducer indicates prognosis. <i>J Transl Med</i> 2013;11:258.	
2.6	Funktionelle Relevanz des RECK-Proteins in Prostatakarzinomzellen	54
	Sonderdruck	55
	Rabien A, Ergun B, Erbersdobler A, Jung K, Stephan C: RECK overexpression decreases invasive potential in prostate cancer cells. <i>Prostate</i> 2012;72:948-954.	
3.	Diskussion	62

4.	Zusammenfassung	65
5.	Literaturangaben	66
	Danksagung	70
	Erklärungen	71

Abkürzungen

ADAM10	a disintegrin and metalloproteinase 10
ccRCC	clear cell renal cell carcinoma
CD13	cluster of differentiation 13
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
KLK	Kallikrein-ähnliche Peptidase
miR	microribonucleic acid
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
PIN	Prostata-intraepitheliale Neoplasie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
pT	pathologisches Tumorstadium
RECK	reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2
SNPs	single nucleotide polymorphisms
TMA	tissue microarray
TUR-B	transurethrale Resektion der Blase

1. Einleitung

In der Klinik für Urologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin wird über viele Jahre schon auf dem Gebiet der Biomarker für urologische Tumoren geforscht, da sowohl in der Diagnostik als auch in der Prognosestellung und individuellen Therapieadaptation für diese Tumoren ein großer Bedarf an Verbesserungen besteht. Ein Schwerpunkt ist die Forschung zu den Proteinasen der Familie der Kallikrein-verwandten Peptidasen (KLKs) und der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Unter den KLKs ist besonders KLK3, das prostataspezifische Antigen (PSA) als Marker für das Prostatakarzinom bekannt, das jedoch Schwächen in der diagnostischen Sensitivität und Spezifität aufweist [1]. Nach wie vor ist der Verlauf der Krankheit trotz intensiver Forschung auch zu verschiedenen Formen des PSA nur schwer einschätzbar – und damit auch der Behandlungsbedarf.

Auf dem Gebiet der MMPs wurden nicht nur Tumormarker, sondern auch schon Therapeutika in Form von MMP-Inhibitoren untersucht, da viele MMPs durch die Degradation extrazellulärer Matrix zum Prozess der Metastasierung beitragen. Bisher war der Einsatz aber nicht sehr erfolgreich, vermutlich durch Kompensation der unterdrückten Wirkmechanismen. Von daher rückte ein endogener MMP-Inhibitor, das reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) in den Vordergrund, das u.a. die Funktion gleich dreier MMPs hemmt und bis dato kaum bzw. gar nicht in den urologischen Tumorentitäten untersucht worden war. In der vorliegenden Habilitationsschrift wird die Forschung zu den jüngsten Mitgliedern der KLK-Familie, KLK14 und KLK15, und zum MMP-Inhibitor RECK beim Prostatakarzinom vorgestellt. Diese Ergebnisse werden durch Studien zum RECK beim Harnblasen- und Nierenzellkarzinom erweitert, da auch diese Tumorentitäten erheblichen Bedarf bei der Diagnostik und besonders der Prognostik und Therapieadaptation haben.

2. Biomarker in urologischen Tumoren

2.1 KLK14 als Biomarker beim Prostatakarzinom

Im Rahmen einer intensiven Zusammenarbeit der urologischen Forschungsabteilung der Charité mit Prof. Diamandis und seinen Mitarbeiterin in Toronto, Kanada wurde die Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen bereits langjährig erforscht. Der Schwerpunkt lag dabei auf dem Prostatakarzinom. Die kanadischen KLK-Experten entdeckten auch zeitgleich mit einer anderen Gruppe die neue Serin-Protease KLK14 [2,3], die Steroidhormon-abhängig [4,5] Proteine der extrazellulären Matrix wie z.B. Kollagen oder Laminin spaltet [6,7]. Da die Datenlage zu KLK14 beim Prostatakarzinom auf der Ebene der RNA uneinheitlich war [3,8] und ELISA-Untersuchungen des Proteins im Serum von Patienten [6,8] auf einen Tumorfördernden Effekt schließen ließen, sollte die vorliegende Arbeit an einem größeren Patientenkollektiv von 186 Fällen retrospektiv die KLK14-Proteinexpression direkt am Material aus radikalen Prostatektomien bestimmen. Diese immunhistochemische Studie wurde durch eine RNA-Analyse ergänzt, für die das Material per Laser-Mikrodissektion hochselektiv aus Tumorepithel und dem umliegenden normalen Epithel gewonnen wurde. Wie der unten gezeigten Veröffentlichung zu entnehmen ist, ergab der genaue Abgleich der RNA-Expression unter gewebespezifischer Normalisierung [9] keine relevanten Auffälligkeiten. Auch das KLK14-Protein konnte nicht zwischen Tumor- und umliegendem Normalgewebe differenzieren, war dafür aber von großem prognostischem Wert: Die KLK14-Expression korrelierte sowohl im Prostatakarzinom als auch in der Vorstufe der Prostata-intraepithelialen Neoplasie (PIN) mit dem pathologischen Tumorstadium (pT). KLK14 zeigte sich bei den 146 Fällen mit bekanntem Krankheitsverlauf nach der Prostatektomie (Follow-up) sogar als unabhängiger Prognosemarker.

Seite 7-14 Originalarbeit

Rabien A, Fritzsche F, Jung M, Diamandis EP, Loening SA, Dietel M, Jung K, Stephan C, Kristiansen G: High expression of KLK14 in prostatic adenocarcinoma is associated with elevated risk of prostate-specific antigen relapse. *Tumour Biol* 2008;29:1-8.

<http://dx.doi.org/10.1159/000132565>

2.2 KLK15 als Biomarker beim Prostatakarzinom

Auch das jüngste Mitglied der KLK-Familie, KLK15, wurde von der Gruppe um Prof. Diamandis zeitgleich mit einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben [10,11]. Die KLK15-Expression wird ebenfalls durch Steroidhormone stimuliert [11,12] und soll zur proteolytischen Aktivierung der Vorform des PSA (pro-PSA) führen [10]. Bisher war schon bekannt, dass einer hohen *KLK15* mRNA-Expression in Samenflüssigkeit und Prostata [11,13] nur geringe Mengen des Proteins, gemessen im ELISA [13,14], gegenüber stehen und Tumoren der Prostata einen Anstieg des mRNA-Niveaus mit steigenden Tumorstadien verzeichnen [11,15]. Die vorliegende retrospektive Studie nutzte ein Patientenkollektiv von 193 Fällen nach radikaler Prostatektomie, um KLK15 immunhistochemisch zu analysieren. Ergänzend wurde die *KLK15* mRNA-Expression der Fälle, die für die KLK14-Studie verwendet worden waren, mittels Laser-Mikrodissektion genau den Epithelzellen der Prostata mit den unterschiedlichen Morphologien des Normalgewebes und des Tumors zugeordnet. Tatsächlich wurde *KLK15* mRNA im Tumorepithel (und nicht im Stroma) höher exprimiert, die Menge an Protein war dagegen geringer als in den Drüsen mit normaler Morphologie. Beides korrelierte mit dem pT und dem Gleason-Grad. Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung konnte KLK15 als unabhängiger Prognosemarker identifiziert werden, der bei höherer KLK15-Expression ein höheres Risiko für einen PSA-Wiederanstieg nach radikaler Prostatektomie (biochemisches Rezidiv) anzeigte.

Seite 16-24 Originalarbeit

Rabien A, Fritzsche FR, Jung M, Tölle A, Diamandis EP, Miller K, Jung K, Kristiansen G, Stephan C: KLK15 is a prognostic marker for progression-free survival in patients with radical prostatectomy. *Int J Cancer* 2010;127:2386-2394.

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.25435>

2.3 RECK als Biomarker beim Prostatakarzinom

Neben den Peptidasen der KLK-Familie spielen auch die Peptidasen der MMP-Familie eine wichtige Rolle bei Tumoren bzw. deren Metastasierung. Sie sind in der Lage, Proteine der extrazellulären Matrix zu spalten und können so zur Auswanderung der Karzinomzellen beitragen. Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 waren bereits im Fokus der urologischen Forschungsabteilung, besonders als Marker für das Prostatakarzinom. Daher wurde auch RECK, das als Inhibitor dieser beiden MMPs und des Membran-ständigen MMP-2-Aktivators MMP-14 (MT1-MMP) [16,17], aber auch der „ α disintegrin and metalloproteinase 10“ (ADAM10) [18] und der Aminopeptidase N (CD13) [19] fungiert, näher untersucht. Zu Beginn unserer Studie war zu RECK in urologischen Tumoren nichts bekannt. Eine erste Arbeit zeigte dann, dass *RECK* mRNA im Prostatakarzinom im Vergleich zur benignen Hyperplasie der Prostata vermindert exprimiert wurde und negativ mit dem Gleason-Grad korrelierte [20]. Ergänzend dazu konnten wir an mikrodissezierten Gewebepaaren zeigen, dass die Expression der *RECK* mRNA im Prostatakarzinom auch im Vergleich zum umliegenden Normalgewebe vermindert war. Unsere Studie umfasste außerdem immunhistochemische Untersuchungen mit 247 Fällen nach radikaler Prostatektomie. Dabei verringerte sich die RECK-Expression signifikant absteigend von benigner Hyperplasie über Normalgewebe und PIN bis zum Prostatakarzinom. Kongruent dazu war die geringere RECK-Expression im Tumor mit höherem Gleason-Grad und pT assoziiert. Wie KLK15 stellte sich RECK als unabhängiger Prognosemarker heraus, der aber bei verminderter RECK-Expression ein höheres Risiko für ein biochemisches Rezidiv anzeigte. Hier beschränkte sich dies auf die Gruppe der Gleason-Grade ab sieben, die für die Entscheidungsfindung für eine eventuelle zusätzliche Therapie nach der Prostatektomie von besonderer Bedeutung sind.

Seite 26-33 Originalarbeit

Rabien A, Burkhardt M, Jung M, Fritzsche F, Ringsdorf M, Schick Tanz H, Loening SA, Kristiansen G, Jung K: Decreased RECK expression indicating proteolytic imbalance in prostate cancer is associated with higher tumor aggressiveness and risk of prostate-specific antigen relapse after radical prostatectomy. Eur Urol 2007;51:1259-1266.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2006.05.050>

2.4 RECK als Biomarker beim Harnblasenkarzinom

Auch für das Harnblasenkarzinom war RECK als potenzieller Biomarker interessant, da zum einen keine Daten existierten und zum anderen kaum immunhistochemische Marker (hauptsächlich p53) Eingang in die Routine gefunden hatten [21,22]. Bei dieser Tumorart ist jedoch die Fragestellung anders als beim Prostatakarzinom. Urothelkarzinome werden per transurethraler Resektion der Blase (TUR-B) abgetragen oder durch Zystektomie entfernt. Bei TUR-B-Präparaten ist oft schon die Bestimmung des Tumorstadiums und –grades schwierig. Die Unterscheidung zwischen nicht-invasiven pTa- und invasiven pT1-Stadien bzw. nicht-muskelinvasiven (bis pT1) und muskelinvasiven (ab pT2) Stadien erfordert neue Marker zur Einordnung des Tumors hinsichtlich des Risikopotentials und möglicher therapeutischer Ansätze. In unserer Studie, die sich am laufenden Eingang der Präparate in die Pathologie und an der Qualität des Materials orientierte, wurde die RECK-Expression an 127 Gewebeschnitten (103 Patienten) von Urothelkarzinomen untersucht. Zusätzlich wurden die Zielproteine des MMP-Inhibitors RECK, MMP-2, -9 und -14 und als Gegenspieler ein MMP-Aktivator, EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer), mit einbezogen. Alle potenziellen Marker wurden im Normalgewebe und in der invasiven Front der Tumoren bewertet, denn in dem letztgenannten Bereich zeigte sich RECK eindeutig reguliert. RECK wurde mit steigender Invasivität der Tumoren vermindert exprimiert, während die EMMPRIN-Expression entgegengesetzt anstieg. So konnten beide Marker sowohl die pTa- als auch die pTa/pT1-Tumoren gut von den höheren Stadien abgrenzen.

Seite 35-43 Originalarbeit

Wittschieber D, Stenzinger A, Klauschen F, Stephan C, Jung K, Erbersdobler A, Rabien A: Decreased RECK and Increased EMMPRIN expression in urothelial carcinoma of the bladder are associated with tumor aggressiveness. Pathobiology 2011;78:123-131.

<http://dx.doi.org/10.1159/000323563>

2.5 RECK als Biomarker beim Nierenzellkarzinom

„Das Nierenzellkarzinom“ teilt sich in mehrere Untergruppen auf, die sich nicht nur in der Morphologie, sondern auch im genetischen Hintergrund, dem Aggressivitätsverhalten und dem medikamentösen Therapieansprechen stark unterscheiden. Von daher sind sie als eigenständige Tumorentitäten zu sehen [23]. Biomarker werden zur Abgrenzung der Subgruppen in Zweifelsfällen benötigt, aber auch zur Prognosestellung, für die bisher kein Marker im Routine-Einsatz ist. Zur Analyse des RECK-Proteins in Nierentumoren wurde ein Tissue Microarray (TMA) herangezogen, der Tumor- und umliegendes Normalgewebe von 395 radikalen oder partiellen Nephrektomien enthält. Die RECK- und EMMPRIN-Expressionen wurden mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht. Einer kräftigen RECK-Expression im Normalgewebe stand eine sehr geringe bis negative Expression des Proteins im klarzelligen Nierenzellkarzinom (ccRCC) gegenüber, das mit ca. 80% den Großteil der Nierenzellkarzinome stellt [24] und daher im TMA am stärksten vertreten war. Die Menge des RECK-Proteins stieg vom ccRCC über das papilläre bis zum chromophoben Nierenzellkarzinom an und war im gutartigen Onkozytom am höchsten und damit vergleichbar mit der Menge im Normalgewebe. Unterschiede bezüglich der Aggressivität der Tumoren gab es jedoch nicht. Von daher lässt diese erste Studie zu RECK in Nierentumoren vermuten, dass die tumorspezifische RECK-Regulation initial in der Tumorigenese eine Rolle spielt.

RESEARCH

Open Access

Renal cell neoplasias: reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs discriminates tumor subtypes, while extracellular matrix metalloproteinase inducer indicates prognosis

Anja Rabien^{1*}, Carsten Stephan^{1,2}, Ergin Kilic³, Wilko Weichert⁴, Glen Kristiansen⁵, Kurt Miller¹, Klaus Jung^{1,2} and Andreas Erbersdobler⁶

Abstract

Background: Matrix metalloproteinases can promote invasion and metastasis, which are very frequent in renal cell carcinoma even at the time of diagnosis. Knowing the reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) as an inhibitor of matrix metalloproteinases and the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) protein as inducer, we aimed to determine their expression, localization and possible antagonistic action in the pathogenesis and progression of renal cell tumors in a retrospective study.

Methods: Tumor and adjacent normal tissues of 395 nephrectomized patients were immunostained for RECK and EMMPRIN on a tissue microarray.

Results: RECK strongly decreased in renal cell carcinoma compared to normal counterparts (Wilcoxon signed rank test, $P < 0.001$), and it discriminated tumor entities showing the highest expression in oncocytomas. EMMPRIN, however, could be significantly correlated to pT stage and Fuhrman grading (Spearman's correlation coefficient $r_s = 0.289$ and $r_s = 0.382$, respectively). Higher expression of EMMPRIN was associated with decreased overall survival in Kaplan-Meier analysis ($P < 0.001$), and the EMMPRIN level could independently predict survival for cases without metastasis and involvement of lymph nodes. Decreased RECK expression was confirmed by Western blotting in tissue of eight normal/tumor matches of patients after radical nephrectomy, whereas the EMMPRIN pattern appeared to be heterogeneous.

Conclusions: We propose RECK down regulation in renal cell carcinoma to be an early event that facilitates tumor formation and progression. EMMPRIN, however, as a prognostic tumor marker, increases only when aggressiveness is proceeding and could add an additional step to invasive properties of renal cell carcinoma.

Keywords: RECK, EMMPRIN, Renal cell carcinoma, TMA

Background

Kidney cancer is not the most common malignancy, but with a five-year survival rate of 70% in the United States [1] the outcome is often poor. In renal cell carcinoma (RCC) which represent the majority of 85-90% of kidney neoplasms [2,3], survival is mostly determined by distal metastases detected in 30% of the patients even at the

time of diagnosis [2]. Usually, RCC can be recognized by sonography, but as symptoms are lacking until late stages of the disease, metastasis of RCC is the main problem in therapeutic approaches [2,3]. Due to the resistance of RCC to radio- and chemotherapy, only surgery can be curative if RCC is diagnosed at an early stage [2,3]. Current so-called "targeted therapies" using tyrosine kinase inhibitors, mTOR inhibitors or antiangiogenic antibodies alone or in combinations are able to slightly extend progression-free survival [2,3], but further therapeutic improvements are needed. Decisions for treatment are based on tumor stage and the

* Correspondence: anja.rabien@charite.de

¹Department of Urology, Research Division, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, Berlin 10117, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

Table 1 RECK and EMMPRIN staining in renal cell tumors related to clinicopathological parameters

Variable	Cases (n / %)	RECK expression (number of cases / %)				P value*	
		0	1	2	3		
Age	≤60 years	197 (49.9)	161 (81.7)	27 (13.7)	8 (4.1)	1 (0.5)	0.580
	>60 years	198 (50.1)	164 (82.8)	22 (11.1)	5 (2.5)	7 (3.5)	
Sex	male	264 (66.8)	212 (80.3)	36 (13.6)	11 (4.2)	5 (1.9)	0.234
	female	131 (33.2)	113 (86.3)	13 (9.9)	2 (1.5)	3 (2.3)	
pT status	pT1-2	265 (67.1)	216 (81.5)	32 (12.1)	10 (3.8)	7 (2.6)	0.250
	pT3-4	130 (32.9)	109 (83.8)	17 (13.1)	3 (2.3)	1 (0.8)	
Fuhrman grade	1-2	348 (88.1)	285 (81.9)	43 (12.4)	12 (3.4)	8 (2.3)	0.338
	3-4	47 (11.9)	40 (85.1)	6 (12.8)	1 (2.1)	0 (0.0)	
Nodal status**	pN0	214 (89.9)	182 (85.0)	25 (11.7)	5 (2.3)	2 (0.9)	0.878
	pN+	24 (10.1)	20 (83.3)	3 (12.5)	1 (4.2)	0 (0.0)	
Metastases***	M0	338 (90.6)	278 (82.2)	41 (12.1)	12 (3.6)	7 (2.1)	0.300
	M1	35 (9.4)	31 (88.6)	3 (8.6)	1 (2.9)	0 (0.0)	
Margin status****	R0	357 (94.4)	291 (81.5)	46 (12.9)	12 (3.4)	8 (2.2)	0.603
	R+	21 (5.6)	18 (85.7)	2 (9.5)	1 (4.8)	0 (0.0)	
Tumor subtype							
	Clear cell RCC	322 (81.5)	291 (90.4)	27 (8.4)	3 (0.9)	1 (0.3)	<0.001
	Papillary RCC	43 (10.9)	23 (53.5)	11 (25.6)	8 (18.6)	1 (2.3)	
	Chromophobe RCC	22 (5.6)	10 (45.5)	7 (31.8)	1 (4.5)	4 (18.2)	
	Oncocytoma	8 (2.0)	1 (12.5)	4 (50.0)	1 (12.5)	2 (25.0)	
			EMMPRIN expression (number of cases / %)				
			0	1	2	3	
Age	≤60 years	196 (49.7)	7 (3.6)	57 (29.1)	70 (35.7)	62 (31.6)	0.479
	>60 years	198 (50.3)	8 (4.0)	54 (27.3)	87 (43.9)	49 (24.7)	
Sex	male	263 (66.8)	13 (4.9)	70 (26.6)	102 (38.8)	78 (29.7)	0.797
	Female	131 (33.2)	2 (1.5)	41 (31.3)	55 (42.0)	33 (25.2)	
pT status	pT1-2	265 (67.3)	14 (5.3)	86 (32.5)	112 (42.3)	53 (20.0)	<0.001
	pT3-4	129 (32.7)	1 (0.8)	25 (19.4)	45 (34.9)	58 (45.0)	
Fuhrman grade	1-2	347 (88.1)	15 (4.3)	109 (31.4)	141 (40.6)	82 (23.6)	<0.001
	3-4	47 (11.9)	0 (0.0)	2 (4.3)	16 (34.0)	29 (61.7)	
Nodal status**	pN0	213 (89.9)	6 (2.8)	63 (29.6)	78 (36.6)	66 (31.0)	0.003
	pN+	24 (10.1)	1 (4.2)	1 (4.2)	7 (29.2)	15 (62.5)	
Metastases***	M0	337 (90.6)	15 (4.5)	101 (30.0)	138 (40.9)	83 (24.6)	<0.001
	M1	35 (9.4)	0 (0.0)	6 (17.1)	9 (25.7)	20 (57.1)	
Margin status****	R0	356 (94.4)	15 (4.2)	105 (29.5)	145 (40.7)	91 (25.6)	0.004
	R+	21 (5.6)	0 (0.0)	3 (14.3)	6 (28.6)	12 (57.1)	
Tumor subtype							
	Clear cell RCC	322 (81.7)	9 (2.8)	91 (28.3)	128 (39.8)	94 (29.2)	0.813
	Papillary RCC	42 (10.7)	6 (14.3)	14 (33.3)	16 (38.1)	6 (14.3)	
	Chromophobe RCC	22 (5.6)	0 (0.0)	5 (22.7)	9 (40.9)	8 (36.4)	
	Oncocytoma	8 (2.0)	0 (0.0)	1 (12.5)	4 (50.0)	3 (37.5)	

*Chi-square test using linear-by-linear association, significant P values <0.05 are given in bold. **157 cases were pNx or not assessed, pN+ includes all N-positive cases. ***22 cases were Mx or not assessed. ****17 cases were Rx.

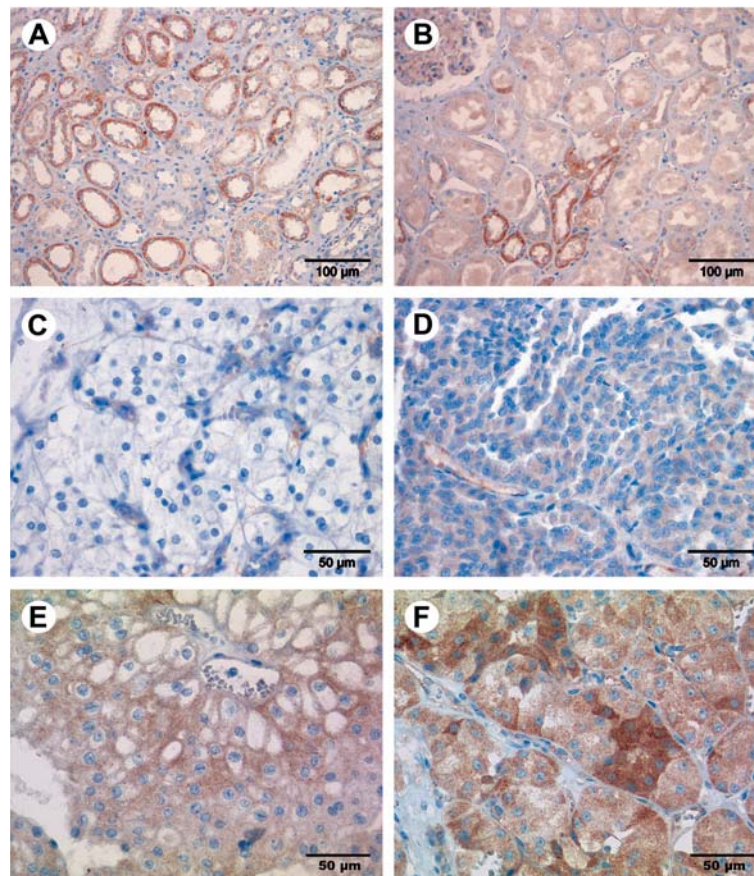


Figure 1 Immunostaining of RECK in renal cell tissue. RECK expression was mainly seen in the tubuli and in the capillaries of the glomeruli shown here in the medulla of non-malignant kidney tissue (A) and in the non-malignant renal cortex (B). RECK expression increased from clear cell carcinoma (C) over papillary (D) and chromophobe (E) carcinoma to oncocytoma (F). Magnification: 200× (A, B), 400× (C-F).

histological grade [3,4]. For diagnosis of RCC and its subtypes, several immunohistochemical markers have been suggested, but until now, no biomarker is in routine clinical use for prognostic purposes [5].

In search for new, more useful biomarkers to diagnose RCC or to improve prognosis we aimed to determine the (dys-)balance of an endogenous inhibitor of matrix metalloproteinases (MMPs) and an inducer of MMPs, namely reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN, CD147), which we have shown to be responsible for a dysbalance in urothelial carcinoma of the bladder [6]. Hitherto, nothing is known for RECK in kidney cancer, but several studies exist indicating EMMPRIN as a prognostic marker or overexpressed in RCC [7-10]. Here we assessed RECK and EMMPRIN in Western blot assays and in immunohistochemical staining in 395 matches (394 for EMMPRIN) of renal cell tumor tissue and adjacent normal renal tissue on a tissue microarray (TMA) and related them to each other and to clinicopathological parameters of the patients.

Methods

Patients

Tissue of 395 patients which had been radically or partially nephrectomized at the Department of Urology, Charité University Hospital between 1992 and 2004 was used for the TMA study with the permission of the local ethics committee (Ethikausschuss 1 Campus Charité – Mitte, document no. EA1/134/12). Tumor stages were determined according to the latest version of the TNM classification by the International Union against Cancer [11] and tumor grades were reviewed by a single pathologist (A.E.) according to the Fuhrman system. Clinicopathological patient characteristics are listed in Table 1. The median age was 60 years at nephrectomy (range 21–86), 257 (65.1%) patients survived and 138 (34.9%) died within follow-up times from 0 to 194 months (median 112 months). All cases were selected according to availability of the tissue as well as of follow-up data and were not stratified in any way. Additional eight pairs of tissue with the above mentioned conditions were used for Western blots, but from nephrectomies of the years 2009 and 2010.

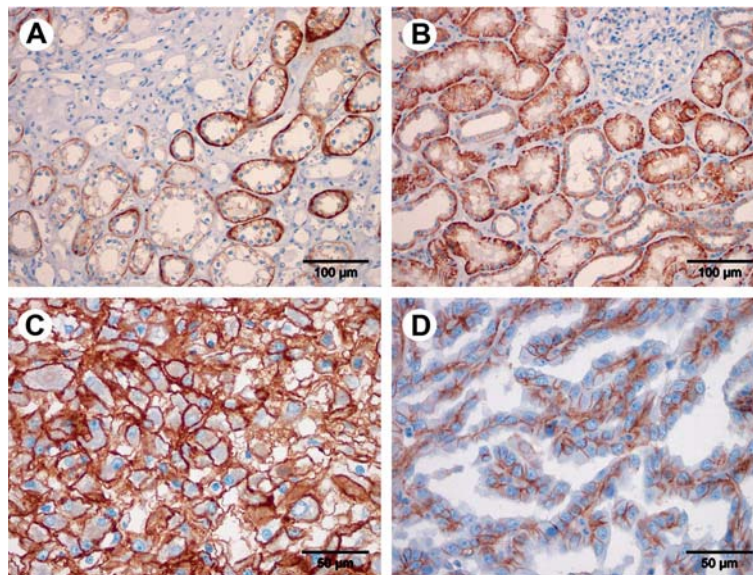


Figure 2 Immunostaining of EMMPRIN in renal cell tissue. EMMPRIN expression was detected in the tubuli of non-malignant renal tissue as shown in the medulla (A) and in the cortex of the kidney (B). Clear cell (C) and papillary (D) carcinoma tissues are shown exemplary for tumor staining. Magnification: 200× (A, B), 400× (C, D).

Tissue microarray

Areas of renal cell tumors and adjacent normal tissue were marked on 3 μ m HE stained sections by a board certified pathologist (G.K.). Three tumor and two normal tissue cores per case (1.0 mm diameter) were punched out of the tissue blocks according to marked areas and embedded into a new paraffin block as TMA with up to 37 cases per block. Punching was done with a tissue arrayer (Beecher Instruments, Woodland, CA, USA).

Immunohistochemistry

TMA sections of 2–3 μ m were deparaffinized with xylene, gradually hydrated and cooked in 0.01 M citrate buffer for 5 minutes. EnVision + Dual Link System-HRP (DAB+), Cat. No. K4065 (DAKO, Hamburg, Germany) was used for the staining procedure. Endogenous peroxidase activity and non-specific binding were blocked with the Dual Endogenous Enzyme Block reagent (DAKO) for 10 minutes at room temperature. Primary antibody was incubated for 40 minutes at room temperature using RECK rabbit monoclonal antibody [6,12] 1:250 (clone D8C7, Cat. No. 3433, Cell Signaling Technology Inc., Boston, MA, USA) or EMMPRIN rabbit polyclonal antibody [6,13] 1:500 (Cat. No. 34–5600, Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase labelled polymer (DAKO) were applied for 40 minutes at room temperature, followed by staining with 3,3'-diaminobenzidine (DAB+) substrate chromogen (DAKO) and counterstaining with hematoxylin. The optimal concentration of primary

antibody had been determined in dilution series on test sections of larger tissue areas. Positive and negative controls guaranteed persistent quality of the immunostaining. RECK and EMMPRIN staining were examined within a range of negative (0) over weak (1) and moderate (2) to strong (3) by a pathologist and a scientist who were blinded for patient outcome as an average for spots of the same case and morphology. Equivocal cases were discussed at a double-headed microscope to reach consent.

Western blots

Western blots were performed as described before [6]. Briefly, protein concentration of tissue lysates was determined using the Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Twenty μ g of protein each were separated on a 7.5% (RECK) or 10% (EMMPRIIN) sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Primary antibodies were the same as mentioned above (immunohistochemistry) and used 1:1,000 (RECK) or 1:5,000 (EMMPRIIN) for 1 h at room temperature. The secondary antibody was horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (DAKO), diluted 1:2,000. Enhanced chemiluminescence marked bands were detected in a Fluor-S MultiImager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). After stripping, beta-actin controls were done as follows: primary monoclonal mouse antibody to beta-actin (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) 1:50,000 and as secondary antibody horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin G (DAKO), diluted 1:5,000.

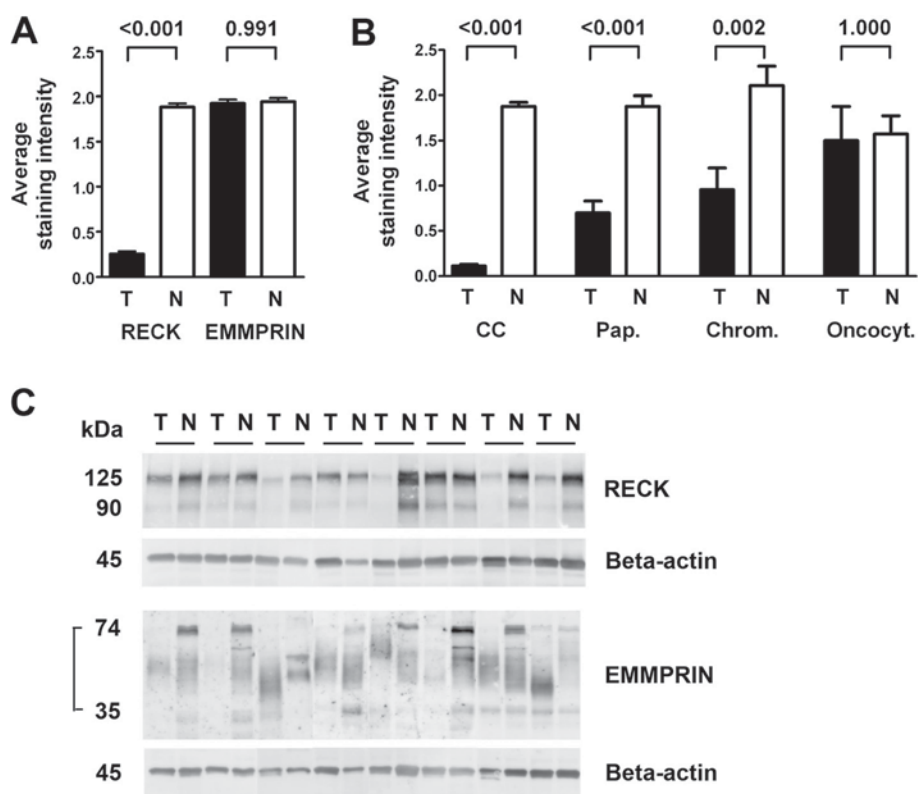


Figure 3 RECK expression is tumor-specific. The average staining intensity for RECK decreased to 13% in tumor tissue compared to normal tissue, whereas EMMPRIN staining remained unchanged (A). Mean RECK staining intensities for the tumor subtypes \pm standard error of the mean are shown in (B). In comparison to their normal counterparts, RECK values increased gradually from 6% in clear cell carcinomas (CC) over 38% in papillary carcinomas (Pap.) and 45% in chromophobe carcinomas (Chrom.) to 96% in oncocytomas (Oncocyt.). P values are given above the pairs of columns (A, B). RECK and EMMPRIN antibodies were checked in Western blots (C). RECK bands at 125 kDa and 90 kDa were detected in protein lysates of 8 pairs of tumor and adjacent normal renal tissue (control: beta-actin). These samples were also used to show the panel of EMMPRIN bands, in our blot migrating between 35 and 74 kDa (control: beta-actin).

Statistical analysis

Calculations were performed using SPSS for Windows 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Associations were determined in bivariate correlation according to Spearman and in chi-square tests using linear-by-linear association. Differences between tumor and adjacent normal tissue were analyzed by the Wilcoxon signed rank test for paired data and the power of discrimination between malignant and non-malignant was calculated in logistic regression analysis. Overall survival analysis was done using Kaplan-Meier analysis and the log-rank test. The tests were two-sided, significance was defined as $P < 0.05$.

Results

Expression of RECK and EMMPRIN in renal cell carcinoma

RECK expression was assessed in 395 cases and EMMPRIN expression in 394 cases of renal neoplasms on the TMA. Clinicopathological data of the patients are given in Table 1 combined with staining intensities of the targets. RECK staining was found in tumor-surrounding

normal tissue in the medulla (Figure 1A) as well as in the renal cortex (Figure 1B). Distal tubuli were stained stronger than proximal tubuli, and in the glomeruli only capillaries were stained. RECK expression in normal and tumor cells appeared mainly granularly in the cytoplasm. Interestingly, the average staining intensity increased from clear cell carcinomas over papillary and chromophobe carcinomas to oncocytomas (Figure 1C-F) as proved by linear-by-linear association in a chi-square test (Table 1). This was the only significant association for RECK to clinicopathological parameters. EMMPRIN expression, however, was mainly membranous (Figure 2) and did not discriminate tumor subtypes (Table 1). It was also detected in both, the medulla (Figure 2A) and cortex of the kidney (Figure 2B), but with stronger staining in the proximal tubuli than in the distal ones and absent staining in the glomeruli. Positive and negative controls for immunohistochemical staining are given in an additional figure (Additional file 1).

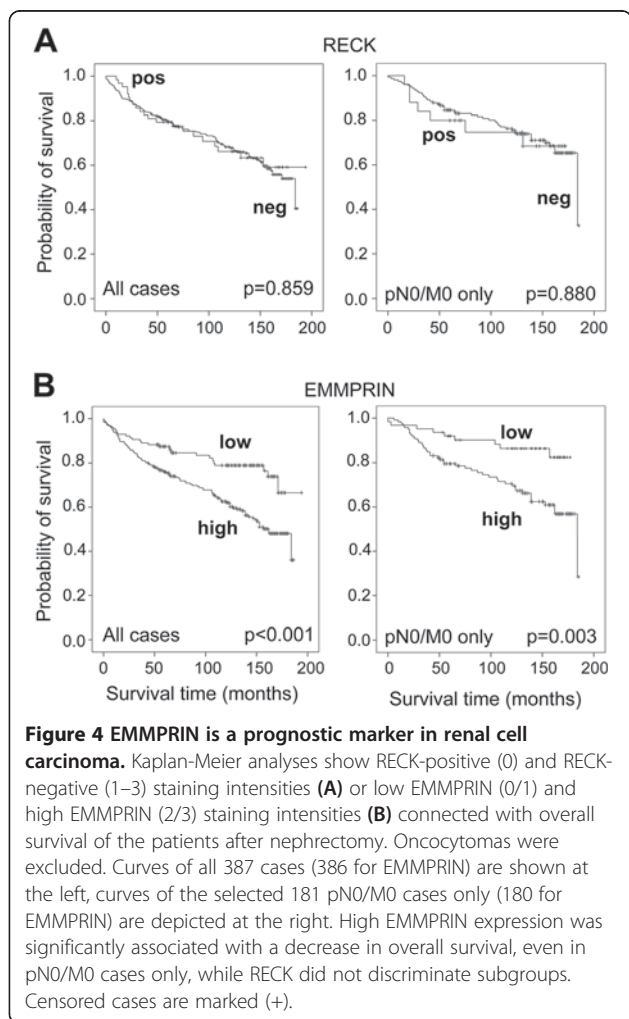
Table 2 RECK and EMMPRIN staining in renal tumors

RECK staining score	Tumor		Adjacent normal		EMMPRIN staining score	Tumor		Adjacent normal	
	Cases (%)	Cases (%)	Cases (%)	Cases (%)		Cases (%)	Cases (%)	Cases (%)	Cases (%)
0	325 (82.3)	17 (4.5)	0	15 (3.8)	6 (1.7)	1	111 (28.2)	93 (25.7)	
1	49 (12.4)	92 (24.5)		157 (39.8)	179 (49.4)	2	111 (28.2)	84 (23.2)	
2	13 (3.3)	82 (21.8)		394 (100)	362 (100)	3			
3	8 (2.0)	376 (100)		Mean value	1.9	Mean value	1.9	Median	2.0
Total	395 (100)	376 (100)		Median	2.0	Median	2.0		

Association of EMMPRIN staining with clinicopathological data

EMMPRIN expression in 394 renal neoplasms was bivariately correlated to clinicopathological parameters (listed in Table 1) according to Spearman, Spearman's rank correlation coefficient $r_s > 0.200$ was considered relevant. EMMPRIN correlated significantly ($P < 0.001$)

with pT staging ($r_s = 0.289$) and with Fuhrman grading ($r_s = 0.382$). Associations of the data in chi-square tests confirmed these interrelations (Table 1). Moreover, positive associations were found to lymph node involvement (pN0 versus pN+, $P = 0.003$), metastasis (M0 versus M1, $P < 0.001$) and margin status (R0 versus R+, $P = 0.004$; Table 1).



Tumor-specificity of RECK

Comparison of tumor and adjacent normal tissue pairs revealed a significant decrease of RECK expression in the tumor areas (Wilcoxon matched-pairs signed rank test, $P < 0.001$), whereas expression of EMMPRIN remained unchanged ($P = 0.991$, Figure 3A). A vast majority of 82% of the carcinomas was assessed to be RECK-negative so that further analyses concerning associations and survival analyses failed to become significant. All staining results for RECK and EMMPRIN are shown in Table 2. Logistic regression was performed to further determine the power of RECK to discriminate between tumor and normal renal tissue. With an overall correct classification value of 88.7% RECK discriminated the two groups very well, which was also reflected in the receiver operating curve analysis (curve not shown). The area under the curve (AUC) was calculated as 0.925 with a confidence interval from 0.904 to 0.945.

RECK staining intensity discriminated the tumor subtypes as mentioned above, increasing gradually from clear cell carcinoma to oncocytoma (see also Table 1), but with constantly high levels in the normal tissue (Figure 3B). All carcinoma subtypes, except for oncocytoma, showed significant differences in RECK expression between tumor and matched normal tissues (Wilcoxon matched-pairs signed rank test; $P < 0.001$ for clear cell and papillary carcinoma; $P = 0.002$ for chromophobe carcinoma; $P = 1.000$ for oncocytoma). Western blots also presented less amounts of RECK in the tumor tissue (Figure 3C). Eight pairs of renal cell carcinoma and adjacent normal tissue presented the active glycosylated form of RECK migrating at 125 kDa [12] and a lower RECK band of about 90 kDa.

Table 3 Cox regression analyses of clinicopathological factors, RECK and EMMPRIN in 181 cases* of pN0/M0 renal carcinoma

Variable	Univariate analyses		Multivariate analyses (RECK)				Multivariate analyses (EMMPRIN)			
	HR (95% CI)	P	Inclusion HR (95% CI)	P	Backward** HR (95% CI)	P	Inclusion HR (95% CI)	P	Backward** HR (95% CI)	P
Sex	0.764	0.361	0.766	0.405			0.745	0.356		
Male / female	(0.429-1.362)		(0.409-1.434)				(0.398-1.393)			
Age	1.047	0.006	1.047	0.008	1.048	0.006	1.049	0.006	1.046	0.009
continuous	(1.013-1.081)		(1.012-1.083)		(1.013-1.083)		(1.014-1.086)		(1.011-1.082)	
pT stage	2.800	<0.001	2.595	0.001	2.958	<0.001	2.521	0.002	2.581	0.002
pT1-2 / pT3-4	(1.628-4.817)		(1.443-4.669)		(1.690-5.175)		(1.397-4.548)		(1.434-4.643)	
Fuhrman grade	1.569	0.242	1.467	0.365			1.130	0.779		
G1-2 / G3-4	(0.738-3.333)		(0.640-3.363)				(0.481-2.656)			
Surgical margin status***	5.818	0.001	2.342	0.143			2.825	0.078	2.879	0.068
R negative / positive	(2.006-16.879)		(0.750-7.308)				(0.891-8.953)		(0.926-8.950)	
RECK expression	1.063	0.880	1.040	0.930						
negative / positive	(0.479-2.358)		(0.431-2.510)							
EMMPRIN expression*	2.815	0.005					2.538	0.014	2.546	0.012
low (0,1) / high (2/3)	(1.372-5.776)						(1.208-5.333)		(1.229-5.277)	

*EMMPRIN expression in 180 cases: 153 clear cell, 17 papillary (18 for RECK), 10 chromophobe renal cell carcinomas. Oncocytomas were excluded due to benignity. **Reduced model following backward Likelihood elimination ($P=0.05$ for entry and $P=0.10$ for removal). ***175 cases, 6 cases were Rx. Abbreviations: HR Hazard ratio, CI Confidence interval, P P value.

EMMPRIN was detected with bands of different molecular weight between about 74 kDa and 35 kDa which represent differentially glycosylated forms of EMMPRIN.

Survival analysis with RECK and EMMPRIN

Univariate overall survival analysis according to Kaplan-Meier confirmed the study cohort to be representative, because the important tumor parameters pT stage, Fuhrman grade, nodal status (pN), metastases before surgery (M), and surgical margin status (R) significantly differentiated low risk cases with an advantage in survival from high risk cases with shorter survival times ($P < 0.001$ for all parameters). Oncocytomas (8 cases) had been excluded from survival analyses to avoid a possible bias due to benignity. Data were dichotomized as mentioned above or as negative/positive (pN, M, R). RECK expression in renal carcinoma did not differentiate according to survival time, either in the whole group of 387 cases or in the subgroup of 181 pN0/M0 cases (Figure 4A). EMMPRIN expression, however, clearly discriminated cases with low EMMPRIN expression and an advantage in survival (127 cases, 27 events) from cases with high EMMPRIN expression and shorter survival times (259 cases, 109 events, $P < 0.001$, Figure 4B left). The five-year survival rate decreased accordingly from 87.4% to 75.9%. Using 180 cases of pN0/M0 only, we obtained similar results with 62 cases of low expression (9 events) and 118 cases of high expression

(44 events, $P = 0.003$, Figure 4B right) and five-year survival rates of 91.9% and 79.5%, respectively. Kaplan-Meier analyses for non-dichotomized EMMPRIN data show the gradual decrease of survival time with increasing EMMPRIN levels for all cases as well as for the pN0/M0 cases, but they should be considered with reservation due to partially small subgroups (Additional file 2). Even for the pN0/M0 cases multivariate analyses using the Cox proportional hazards regression model emphasized EMMPRIN as an independent predictor of survival (Table 3). Univariate analyses of RECK, EMMPRIN and the clinicopathological parameters sex, age, pT stage, Fuhrman grade and surgical margin status R resulted in the four significant factors age, pT, R and EMMPRIN, which remained significant in the multivariate inclusion model as well as in the backward likelihood calculation, besides R (Table 3). RECK expression again remained irrelevant for survival prognosis as already shown in the Kaplan-Meier analyses. Even considering RECK in adjacent normal renal tissue or in the difference tumor/normal tissue, there was no relevant association. All results were comparable if only the major subgroup of clear cell RCC was selected.

Discussion

To our knowledge, nothing is known about the tumor suppressor RECK in renal cell carcinoma. Due to our findings of RECK/EMMPRIN imbalance in urothelial

bladder carcinoma [6], which could promote invasion processes, we decided to look not only at RECK, but also at the EMMPRIN counterpart in renal cell carcinoma. RECK and EMMPRIN were mostly localized as expected. RECK was found with cytoplasmic granular staining as shown for prostate carcinoma [14], urothelial bladder carcinoma [6] and colorectal carcinoma [15], although membranous staining described for the other tumor entities was not prominent. EMMPRIN, however, was mainly localized at the plasma membrane, consistent with our findings for urothelial bladder carcinoma [6] and colorectal carcinoma [16] and consistent with other studies, among them studies on human kidney tissue [9,17] and RCC [7,8,10,18].

We did not find any difference in staining intensities of EMMPRIN between tumor and adjacent normal tissue. This is in contrast to previous studies on RCC which presented low or undetectable levels of EMMPRIN in normal renal epithelia [7,8,10,18], possibly due to the use of antibodies with different epitopes. Nevertheless, our findings are supported by Shimada et al. [17] who detected EMMPRIN in tubular renal cells, but not in glomeruli. Furthermore, our EMMPRIN antibody proved to be specific, as shown in our Western blot experiments and in the literature [13] so that we could not confirm the diagnostic potential for EMMPRIN in kidney cancer research. RECK, however, contains diagnostic potential as we could demonstrate a strong decrease in RCC as compared to adjacent normal tissue. This decrease was more pronounced than in prostate carcinoma [14,19] and fits also well to findings for colorectal cancer [15] and other tumor entities (reviewed in [20,21]).

We found increasing RECK levels in different renal neoplasms, from clear cell carcinoma over papillary to chromophobe carcinoma and oncocytoma, in which RECK expression became similar for tumor and normal tissue. A possible explanation could be different points of origin, because clear cell and papillary carcinoma are supposed to originate from proximal tubules [22] (but perhaps distal tubules, too [4]) and chromophobe carcinoma and oncocytoma from intercalated cells of the collecting duct [4,23]. Higher RECK levels could also contribute to decreasing malignancy up to the benign oncocytoma, but it would be considered as an early marker for malignancy due to the high percentage of RECK-negative tumors in our study.

Several studies on EMMPRIN in RCC indicate a positive correlation with pT stage [7,8,10,18] and Fuhrman grade [7,8,10,18]. Decreased survival rates were shown with higher EMMPRIN levels in Kaplan-Meier analyses [7,8,10,18]. We confirmed these EMMPRIN characteristics for RCC in our work with a larger number of cases (386 versus 52–100) and furthermore, we found EMMPRIN as an independent predictive marker for

pN0/M0 cases. Independence in prognosis was shown before for up to 53 patients regarding EMMPRIN alone in all stages of RCC [7,8,10,18] or in combination with vascular endothelial growth factor in advanced RCC [7,8,10,18]. Therefore, our study gives additional information on the clinically interesting group of cases without evident progression which could benefit from a new marker independent from clinicopathological characteristics.

Conclusions

In summary, we propose RECK as a diagnostic marker for RCC and the subtypes of RCC suggesting that RECK decrease is an early step in tumorigenesis, whereas EMMPRIN as a prognostic marker is a later event associated with increasing aggressiveness.

Additional files

Additional file 1: Quality control for immunohistochemical staining.

Negative and positive controls for RECK and EMMPRIN staining are shown.

Additional file 2: Overall survival time gradually decreases with increasing EMMPRIN expression in renal cell carcinoma.

Kaplan-Meier analyses give additional information on EMMPRIN stepwise discriminating survival groups, even in the pN0/M0 category.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AR and CS designed the study, AR also did writing of the manuscript, analysis and interpretation of the data, and assessed staining intensities. EK captured images of the staining. WW supervised TMA generation and revised the manuscript. GK marked tissue areas for punching. KM revised the manuscript in a clinical point of view. KJ supervised the study, participated in statistical analysis and interpretation of the data and revised the manuscript. AE supervised the study especially for pathological concerns, ranged the tumors in Fuhrman grading, assessed staining intensities, captured staining images and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Bettina Ergün and Siegrun Blauhut for excellent technical assistance.

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, grant number STE 996/2-1 (CS) and ER 550/1-1 (AE), and by the Sonnenfeld-Stiftung (KJ).

Author details

¹Department of Urology, Research Division, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, Berlin 10117, Germany. ²Berlin Institute for Urologic Research, Berlin, Germany. ³Institute of Pathology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ⁴Institute of Pathology, University of Heidelberg and National Center of Tumor Diseases (NCT), Heidelberg, Germany. ⁵Institute of Pathology, University Hospital of Bonn, Bonn, Germany. ⁶Institute of Pathology, University of Rostock, Rostock, Germany.

Received: 30 May 2013 Accepted: 3 October 2013

Published: 16 October 2013

References

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A: **Cancer statistics, 2012.** *CA Cancer J Clin* 2012, **62**:10–29.
2. Fornara P, Hoda MR: **[Renal cell carcinoma].** *Urologe A* 2011, **50**(Suppl 1):219–222.

3. Ljungberg B, Cowan NC, Hanbury DC, Hora M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Patard JJ, Mulders PF, Sinescu IC: **EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update.** *Eur Urol* 2010, **58**:398–406.
4. Moch H: **An overview of renal cell cancer: pathology and genetics.** *Semin Cancer Biol* 2013, **23**:3–9.
5. Shen SS, Truong LD, Scarpelli M, Lopez-Beltran A: **Role of immunohistochemistry in diagnosing renal neoplasms: when is it really useful?** *Arch Pathol Lab Med* 2012, **136**:410–417.
6. Wittschieber D, Stenzinger A, Klauschen F, Stephan C, Jung K, Erbersdobler A, Rabien A: **Decreased RECK and increased EMMPRIN expression in urothelial carcinoma of the bladder Are associated with tumor aggressiveness.** *Pathobiology* 2011, **78**:123–131.
7. Han ZD, He HC, Bi XC, Qin WJ, Dai QS, Zou J, Ye YK, Liang YX, Zeng GH, Zhu G, *et al*: **Expression and clinical significance of CD147 in genitourinary carcinomas.** *J Surg Res* 2010, **160**:260–267.
8. Jin JS, Hsieh DS, Lin YF, Wang JY, Sheu LF, Lee WH: **Increasing expression of extracellular matrix metalloprotease inducer in renal cell carcinoma: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters.** *Int J Urol* 2006, **13**:573–580.
9. Riethdorf S, Reimers N, Assmann V, Kornfeld JW, Terracciano L, Sauter G, Pantel K: **High incidence of EMMPRIN expression in human tumors.** *Int J Cancer* 2006, **119**:1800–1810.
10. Tsai WC, Sheu LF, Nieh S, Yu CP, Sun GH, Lin YF, Chen A, Jin JS: **Association of EMMPRIN and fascin expression in renal cell carcinoma: correlation with clinicopathological parameters.** *World J Urol* 2007, **25**:73–80.
11. Wittekind C, Meyer HJ: *TNM classification of malignant tumours, 7th.* New York: Wiley-Liss; 2010.
12. Simizu S, Takagi S, Tamura Y, Osada H: **RECK-mediated suppression of tumor cell invasion is regulated by glycosylation in human tumor cell lines.** *Cancer Res* 2005, **65**:7455–7461.
13. Madigan MC, Kingsley EA, Cozzi PJ, Delprado WJ, Russell PJ, Li Y: **The role of extracellular matrix metalloproteinase inducer protein in prostate cancer progression.** *Cancer Immunol Immunother* 2008, **57**:1367–1379.
14. Rabien A, Burkhardt M, Jung M, Fritzsche F, Ringsdorf M, Schick Tanz H, Loening SA, Kristiansen G, Jung K: **Decreased RECK expression indicating proteolytic imbalance in prostate cancer is associated with higher tumor aggressiveness and risk of prostate-specific antigen relapse after radical prostatectomy.** *Eur Urol* 2007, **51**:1259–1266.
15. Stenzinger A, von Winterfeld M, Rabien A, Warth A, Kamphues C, Dietel M, Weichert W, Klauschen F, Wittschieber D: **Reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motif (RECK) expression: an independent prognostic marker of survival in colorectal cancer.** *Hum Pathol* 2012, **43**:1314–1321.
16. Stenzinger A, Wittschieber D, von Winterfeld M, Goepfert B, Kamphues C, Weichert W, Dietel M, Rabien A, Klauschen F: **High extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 expression is strongly and independently associated with poor prognosis in colorectal cancer.** *Hum Pathol* 2012, **43**:1471–1481.
17. Shimada M, Yamabe H, Osawa H, Nakamura N, Kumasaka R, Murakami R, Fujita T, Osanai T, Okumura K: **Extracellular matrix metalloproteinase inducer is expressed in the proximal tubular epithelial cells of the human kidney.** *Nephrol (Carlton)* 2009, **14**:171–178.
18. Liang YX, He HC, Han ZD, Bi XC, Dai QS, Ye YK, Qin WJ, Zeng GH, Zhu GX, Xu CL, *et al*: **CD147 and VEGF expression in advanced renal cell carcinoma and their prognostic value.** *Cancer Invest* 2009, **27**:788–793.
19. Rabien A, Ergun B, Erbersdobler A, Jung K, Stephan C: **RECK overexpression decreases invasive potential in prostate cancer cells.** *Prostate* 2012, **72**:948–954.
20. Clark JC, Thomas DM, Choong PF, Dass CR: **RECK—a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer.** *Cancer Metastasis Rev* 2007, **26**:675–683.
21. Noda M, Takahashi C: **Recklessness as a hallmark of aggressive cancer.** *Cancer Sci* 2007, **98**:1659–1665.
22. Cohen HT, McGovern FJ: **Renal-cell carcinoma.** *N Engl J Med* 2005, **353**:2477–2490.
23. Storkel S, Steart PV, Drenckhahn D, Thoenes W: **The human chromophobe cell renal carcinoma: its probable relation to intercalated cells of the collecting duct.** *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1989, **56**:237–245.

doi:10.1186/1479-5876-11-258

Cite this article as: Rabien *et al.*: Renal cell neoplasias: reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs discriminates tumor subtypes, while extracellular matrix metalloproteinase inducer indicates prognosis. *Journal of Translational Medicine* 2013 **11**:258.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



2.6 Funktionelle Relevanz des RECK-Proteins in Prostatakarzinomzellen

Ergänzend zur Biomarkerstudie für das Prostatakarzinom wurden erste funktionelle Untersuchungen an etablierten Prostatakarzinomzelllinien durchgeführt, da das RECK-Protein Invasion und Metastasierung hemmen sollte [16,17], seine Bedeutung für urologische Tumoren aber unbekannt war. Humanes RECK wurde durch stabile Transfektion in DU-145 Prostatakarzinomzellen überexprimiert. Die Effekte der Überexpression wurden sowohl in Mischpopulationen als auch in selektionierten Zellklonen analysiert. Während die Proliferation der Zellen unbeeinflusst blieb, reduzierte sich die Invasivität durch RECK-Überexpression drastisch um bis zu 80%. Gleichzeitig verringerte sich das MMP-Potenzial der MMPs-2, -9 und -14, die durch RECK inhibiert werden. Dies konnte durch Analyse von Zellkulturüberständen in der Zymografie für sezerniertes MMP-2 und MMP-9 und durch Analyse der Pro- und aktiven Form von MMP-14 mit einem kommerziell erhältlichen Kit gezeigt werden. Diese Arbeit weist also auf eine erhebliche Bedeutung des RECK für die Progression des Prostatakarzinoms hin.

Seite 55-61 Originalarbeit

Rabien A, Ergün B, Erbersdobler A, Jung K, Stephan C: RECK overexpression decreases invasive potential in prostate cancer cells. *Prostate* 2012;72:948-954.

<http://dx.doi.org/10.1002/pros.21498>

3. Diskussion

Die vorliegenden Arbeiten zeigen, dass durchaus vielversprechende Zielmoleküle, auch mit prognostischem Biomarkerpotenzial, für urologische Tumoren zu finden sind. Auf dem Weg in den Routinegebrauch in der Klinik müssen Biomarker jedoch verschiedene Kriterien wie z.B. sehr gute analytische Validität und prädiktive Diskriminierung, die Anwendung in größerem Maßstab und klinische Effizienz erfüllen, so dass nur ein minimaler Prozentsatz bis zur Anwendung kommt [25]. KLK14, KLK15 und RECK sollten daher unter anderem in größeren Kohorten und multizentrischen Studien bzw. auch in prospektiven Ansätzen untersucht werden, denn die beschriebenen Ergebnisse wurden retrospektiv an Material erbracht, das nach Verfügbarkeit (z.T. auch von postoperativen Verlaufsdaten) und Qualität ausgewählt worden war.

Biomarker-Studien umfassen zumeist wie hier bei der Analyse von Zielgenen bzw. -proteinen den Vergleich der Expression in Tumor- und Kontrollgewebe (idealerweise umliegendes morphologisch als „normal“ eingestuftes Gewebe desselben Patienten), den Abgleich mit klinisch-pathologischen Patientendaten und, wenn verfügbar, die Relation zu Überleben oder Progression. Dabei zeigt sich schon, dass organspezifische Untersuchungen essenziell sind. Beim Prostatakarzinom mit oft relativ langem Überleben der Patienten nach dem Eingriff empfiehlt sich meist die Relation zum biochemischen Rezidiv, da hier die Todesursache häufig unabhängig vom Karzinom ist. Beim Nierenzellkarzinom hingegen wird üblicherweise das Gesamtüberleben gewählt. Idealerweise ist das krankheitsspezifische Überleben zu berücksichtigen, jedoch meist nicht eindeutig festzustellen, so dass das Gesamtüberleben bei Tumoren mit begrenzten Lebenserwartungen eine gute Näherung darstellt. Auch die Rolle des Zielmoleküls kann je nach Organ und Tumor unterschiedlich sein, wie hier am Beispiel des RECK-Proteins gezeigt. RECK zeigte für das Prostatakarzinom prognostisches Potenzial, für Nierentumoren hingegen ein ausgeprägtes diagnostisches Potenzial.

Die vorliegenden Studien hatten ihren Schwerpunkt auf immunhistochemischen Untersuchungen der potenziellen Marker, um auf der Ebene der Endprodukte, der Proteine, die Expression und Lokalisation zu erfassen. Dies sind Vorteile der Immunhistochemie gegenüber RNA-Analysen, denn durch posttranskriptionelle Regulationen stimmt das Verhältnis von RNA zu Protein oft nicht überein, wie es hier mit der entgegengesetzten Regulation von RNA und Protein für KLK15 im

Prostatakarzinom gesehen wurde. Nachteilig kann sich die subjektive Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen durch den Betrachter auswirken, so dass bei diesen Auswertungen immer mit einem viel größeren Fehler als bei quantitativen RNA-Analysen gerechnet werden muss. Die Expertise der beteiligten Pathologen und die Fallzahlen von weit mehr als 100 Patienten führten jedoch zu validen Ergebnissen.

Neuere Forschung konnte unsere Ergebnisse bestätigen und erweitern. KLK14 wurde gleichfalls als prognostischer Marker für das Prostatakarzinom eingestuft, jedoch auf Variationen sogenannter „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) bezogen [26]. Interessanterweise wurde KLK14 im Gegensatz zu den meisten anderen Kallikrein-ähnlichen Peptidasen als invers Androgen-reguliert beschrieben [26]. Auch für KLK15 zeigte eine Studie, dass Veränderungen in SNPs mit dem Risiko für das Prostatakarzinom assoziiert waren [27]. Kürzlich wurde von einer signifikanten Relation der *KLK15*-mRNA-Expression zum pT-Stadium des Prostatakarzinoms berichtet [28,29]. Die erste Studie fand darüber hinaus auch eine negative Assoziation mit dem rezidivfreien Überleben und identifizierte *KLK15* als unabhängigen Marker [28]. Somit ist gerade bei diesen beiden jüngsten Mitgliedern der KLK-Familie noch erhebliches Anwendungspotenzial zu erwarten, das weitere Untersuchungen vielversprechend erscheinen lässt.

Neuere Arbeiten zum Tumorsuppressor RECK gehen eher in die funktionelle Richtung. Dabei gibt es für Nierentumoren bisher keine neuen Erkenntnisse. Für Urothel- und Prostatakarzinome wurde eine inverse Regulation von MMP-9 und RECK mittels RNA-Analyse gezeigt [30,31] wie für den Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor und eines seiner Zielmoleküle [16,17] zu vermuten. Das Verhältnis von RECK zu einer Komponente des Proteinabbau-Systems, „S-phase kinase-associated protein 2“ (SKP2) war im Urothelkarzinom vermindert [32]. Da RECK über die Negativregulation von SKP2 und die resultierende Positivregulation des Zellzyklus-Inhibitors p27 eine neue Funktion der Zellzyklus-Inhibition in Kolonkarzinom-Zellen zugeschrieben wurde [32], könnte das veränderte Verhältnis von RECK zu SKP2 ein erster Hinweis auf eine entsprechende Funktion beim Urothelkarzinom sein. In unserem Modell der Prostatakarzinomzellen schien dieser neue Signalweg jedoch keine Rolle zu spielen. Wir konnten zwar eine drastische Reduktion der Invasion durch RECK-Überexpression, nicht aber eine Änderung im Proliferationsverhalten zeigen. Dies könnte an dem unterschiedlichen genetischen / epigenetischen

Hintergrund der Zellen bzw. Ursprungsorgane liegen. Gemeinsamkeiten zeigten sich hingegen in der Regulation des RECK durch die inhibitorische microRNA miR-182-5p [33,34], die sowohl im Prostatakarzinom [35] als auch im Urothelkarzinom (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe) überexprimiert ist. Das RECK-Protein in seinem regulatorischen Umfeld und den betroffenen Signalwegen einzuordnen ist Gegenstand reger Forschung, in der urologischen Tumorforschung aber auf Tumorzellen der Prostata und der Blase beschränkt. Von daher wäre es besonders wichtig, auch für Nierentumoren neue Erkenntnisse zu gewinnen, um neue therapeutische Ansätze gerade im Bereich der Metastasierung zu finden, die von RECK schon in Zellen anderer Tumorentitäten so eindrucksvoll gehemmt werden konnte (Übersicht in [36]). Unsere funktionelle Studie im Bereich der Prostatakarzinomforschung liefert einen ersten Beitrag dazu.

4. Zusammenfassung

Der Schwerpunkt unserer Forschung in der Klinik für Urologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin liegt auf dem Gebiet der Biomarker für Tumoren der Prostata, der Harnblase und der Niere. Aufgrund langjähriger Erfahrungen der Forschungsabteilung im Bereich der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (speziell beim Prostatakarzinom) und der Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren waren die neuesten Vertreter der KLK-Familie und der endogenen MMP-Inhibitoren Gegenstand der Untersuchungen in der hier vorliegenden Habilitationsschrift. Alle drei Zielmoleküle, KLK14, KLK15 und RECK zeigten ihr Potenzial als unabhängige Prognosemarker für das Prostatakarzinom, die KLKs dabei mit positiver und RECK mit negativer Assoziation für ein biochemisches Rezidiv. Beim Harnblasenkarzinom war die verminderte RECK-Expression mit der steigenden Invasivität der Tumoren assoziiert. In Nierenzelltumoren zeigte sich ein anderes Bild, hier konnte RECK auf diagnostischer Ebene sehr gut zwischen Karzinom (mit geringer RECK-Expression) und umliegendem Normalgewebe unterscheiden und die Tumorentitäten differenzieren. Die Biomarker-Arbeiten zu RECK wiesen stets auf den tumorsuppressiven Charakter des Markers hin, der dann in der funktionellen Studie an Prostatakarzinomzellen erstmals für urologische Tumorzellen nachgewiesen wurde. RECK-Überexpression konnte die Invasivität der Zellen drastisch verringern. Die vorgestellten Studien liefern einen wesentlichen Beitrag zur urologischen Tumorforschung, in der geeignete Biomarker sowohl im diagnostischen, vor allem aber im prognostischen Bereich dringend benötigt werden, um betroffene Patienten realistischer und individueller behandeln zu können.

5. Literaturangaben

- 1 Stephan C, Jung K, Lein M, Diamandis EP: PSA and other tissue kallikreins for prostate cancer detection. *Eur J Cancer* 2007;43:1918-1926.
- 2 Hooper JD, Bui LT, Rae FK, Harvey TJ, Myers SA, Ashworth LK, Clements JA: Identification and characterization of KLK14, a novel kallikrein serine protease gene located on human chromosome 19q13.4 and expressed in prostate and skeletal muscle. *Genomics* 2001;73:117-122.
- 3 Yousef GM, Magklara A, Chang A, Jung K, Katsaros D, Diamandis EP: Cloning of a new member of the human kallikrein gene family, KLK14, which is down-regulated in different malignancies. *Cancer Res* 2001;61:3425-3431.
- 4 Borgono CA, Grass L, Soosaipillai A, Yousef GM, Petraki CD, Howarth DH, Fracchioli S, Katsaros D, Diamandis EP: Human kallikrein 14: a new potential biomarker for ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2003;63:9032-9041.
- 5 Yousef GM, Fracchioli S, Scorilas A, Borgono CA, Iskander L, Puopolo M, Massobrio M, Diamandis EP, Katsaros D: Steroid hormone regulation and prognostic value of the human kallikrein gene 14 in ovarian cancer. *Am J Clin Pathol* 2003;119:346-355.
- 6 Borgono CA, Michael IP, Shaw JL, Luo LY, Ghosh MC, Soosaipillai A, Grass L, Katsaros D, Diamandis EP: Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14. *J Biol Chem* 2007;282:2405-2422.
- 7 Felber LM, Borgono CA, Cloutier SM, Kundig C, Kishi T, Ribeiro CJ, Jichlinski P, Gygi CM, Leisinger HJ, Diamandis EP, Deperthes D: Enzymatic profiling of human kallikrein 14 using phage-display substrate technology. *Biol Chem* 2005;386:291-298.
- 8 Yousef GM, Stephan C, Scorilas A, Ellatif MA, Jung K, Kristiansen G, Jung M, Polymeris ME, Diamandis EP: Differential expression of the human kallikrein gene 14 (KLK14) in normal and cancerous prostatic tissues. *Prostate* 2003;56:287-292.
- 9 Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, Kristiansen G, Loening SA, Radonic A, Jung K: Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med* 2005;83:1014-1024.
- 10 Takayama TK, Carter CA, Deng T: Activation of prostate-specific antigen precursor (pro-PSA) by prostin, a novel human prostatic serine protease identified by degenerate PCR. *Biochemistry* 2001;40:1679-1687.
- 11 Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Ashworth LK, Diamandis EP: Molecular cloning of the human kallikrein 15 gene (KLK15). Up-regulation in prostate cancer. *J Biol Chem* 2001;276:53-61.

- 12 Yousef GM, Scorilas A, Magklara A, Memari N, Ponzzone R, Sismondi P, Biglia N, Abd EM, Diamandis EP: The androgen-regulated gene human kallikrein 15 (KLK15) is an independent and favourable prognostic marker for breast cancer. *Br J Cancer* 2002;87:1294-1300.
- 13 Shaw JL, Diamandis EP: Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem* 2007;53:1423-1432.
- 14 Shaw JL, Grass L, Sotiropoulou G, Diamandis EP: Development of an immunofluorometric assay for human kallikrein 15 (KLK15) and identification of KLK15 in tissues and biological fluids. *Clin Biochem* 2007;40:104-110.
- 15 Stephan C, Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Jung M, Kristiansen G, Hauptmann S, Bharaj BS, Nakamura T, Loening SA, Diamandis EP: Quantitative analysis of kallikrein 15 gene expression in prostate tissue. *J Urol* 2003;169:361-364.
- 16 Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C, Noda M: The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 2001;107:789-800.
- 17 Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M: Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13221-13226.
- 18 Muraguchi T, Takegami Y, Ohtsuka T, Kitajima S, Chandana EP, Omura A, Miki T, Takahashi R, Matsumoto N, Ludwig A, Noda M, Takahashi C: RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity. *Nat Neurosci* 2007;10:838-845.
- 19 Miki T, Takegami Y, Okawa K, Muraguchi T, Noda M, Takahashi C: The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. *J Biol Chem* 2007;282:12341-12352.
- 20 Riddick AC, Shukla CJ, Pennington CJ, Bass R, Nuttall RK, Hogan A, Sethia KK, Ellis V, Collins AT, Maitland NJ, Ball RY, Edwards DR: Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. *Br J Cancer* 2005;92:2171-2180.
- 21 Hodges KB, Lopez-Beltran A, Davidson DD, Montironi R, Cheng L: Urothelial dysplasia and other flat lesions of the urinary bladder: clinicopathologic and molecular features. *Hum Pathol* 2010;41:155-162.
- 22 Schrier BP, Vriesema JL, Witjes JA, Kiemeny LA, Schalken JA: The predictive value of p53, p27(kip1), and alpha-catenin for progression in superficial bladder carcinoma. *Eur Urol* 2006;50:76-82.

- 23 Moch H: An overview of renal cell cancer: pathology and genetics. *Semin Cancer Biol* 2013;23:3-9.
- 24 Cheng L, Zhang S, Maclennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R: Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms. *Hum Pathol* 2009;40:10-29.
- 25 Ioannidis JP: Biomarker failures. *Clin Chem* 2013;59:202-204.
- 26 Lose F, Lawrence MG, Srinivasan S, O'Mara T, Marquart L, Chambers S, Gardiner RA, Aitken JF, Spurdle AB, Batra J, Clements JA: The kallikrein 14 gene is down-regulated by androgen receptor signalling and harbours genetic variation that is associated with prostate tumour aggressiveness. *Biol Chem* 2012;393:403-412.
- 27 Batra J, Lose F, O'Mara T, Marquart L, Stephens C, Alexander K, Srinivasan S, Eeles RA, Easton DF, Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Guy M, Muir K, Lophatananon A, Rahman AA, Neal DE, Hamdy FC, Donovan JL, Chambers S, Gardiner RA, Aitken J, Yaxley J, Kedda MA, Clements JA, Spurdle AB: Association between Prostateinogen (KLK15) genetic variants and prostate cancer risk and aggressiveness in Australia and a meta-analysis of GWAS data. *PLoS One* 2011;6:e26527.
- 28 Mavridis K, Stravodimos K, Scorilas A: Quantified KLK15 gene expression levels discriminate prostate cancer from benign tumors and constitute a novel independent predictor of disease progression. *Prostate* 2013;73:1191-1201.
- 29 Vaananen RM, Lilja H, Cronin A, Kauko L, Rissanen M, Kauko O, Kekki H, Vidback S, Nurmi M, Alanen K, Pettersson K: Association of transcript levels of 10 established or candidate-biomarker gene targets with cancerous versus non-cancerous prostate tissue from radical prostatectomy specimens. *Clin Biochem* 2013;46:670-674.
- 30 Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, de Sousa-Canavez JM, Dall'oglio MF, Passerotti CC, Abe DK, Crippa A, da Cruz JA, Timoszczuk LM, Srougi M, Leite KR: MMP-9 overexpression due to TIMP-1 and RECK underexpression is associated with prognosis in prostate cancer. *Int J Biol Markers* 2011;26:255-261.
- 31 Reis ST, Leite KR, Piovesan LF, Pontes-Junior J, Viana NI, Abe DK, Crippa A, Moura CM, Adonias SP, Srougi M, Dall'oglio MF: Increased expression of MMP-9 and IL-8 are correlated with poor prognosis of Bladder Cancer. *BMC Urol* 2012;12:18.
- 32 Yoshida Y, Ninomiya K, Hamada H, Noda M: Involvement of the SKP2-p27(KIP1) pathway in suppression of cancer cell proliferation by RECK. *Oncogene* 2012;31:4128-4138.
- 33 Hirata H, Ueno K, Shahryari V, Tanaka Y, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R: Oncogenic miRNA-182-5p targets Smad4 and RECK in human bladder cancer. *PLoS One* 2012;7:e51056.

- 34 Hirata H, Ueno K, Shahryari V, Deng G, Tanaka Y, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R: MicroRNA-182-5p promotes cell invasion and proliferation by down regulating FOXF2, RECK and MTSS1 genes in human prostate cancer. PLoS One 2013;8:e55502.
- 35 Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Jung K: Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. Int J Cancer 2010;126:1166-1176.
- 36 Nagini S: RECKing MMP: relevance of reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs as a prognostic marker and therapeutic target for cancer (a review). Anticancer Agents Med Chem 2012;12:718-725.

Danksagung

Zuallererst danke ich herzlichst Prof. Dr. Klaus Jung, der mich nicht nur sehr unterstützt, sondern auch erst dazu bewegt hat, das Habilitationsverfahren zu beginnen. Ich danke auch Prof. Dr. Kurt Miller für die hervorragenden Möglichkeiten zur Habilitation, die er mir in der Forschungsabteilung seiner Klinik gewährt hat. Dr. Hans Krause als Leiter der Forschungsabteilung danke ich gleichfalls für die Gegebenheiten vor Ort, viel fleißiges technisches Personal und die gute Ausstattung mit Räumen, Geräten und Material.

Für die sehr engagierte Mitarbeit an den Projekten danke ich Dr. Angelika Tölle, Dr. Monika Jung, Bettina Ergün, Siegrun Blauhut, Britta Beyer und allen anderen Kollegen und Koautoren der Publikationen.

In der intensiven Zusammenarbeit mit den Kollegen des Instituts für Pathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin schicke ich meinen Dank besonders an Prof. Glen Kristiansen (seit 09/2011 Direktor des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn) und Prof. Andreas Erbersdobler (seit 04/2010 Direktor des Instituts für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock).

Mein Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Sonnenfeld-Stiftung und der Stiftung Urologische Forschung mit dem Berliner Forschungsinstitut für Urologie, die mich finanziell unterstützt haben. Persönlich bedanke ich mich sehr bei Prof. Dr. Hansjürgen Freiherr von Villiez (Sonnenfeld-Stiftung), Prof. Dr. Stefan A. Loening und Prof. Dr. Dietmar Schnorr (Stiftung Urologische Forschung) und den Geschäftsführern des Berliner Forschungsinstituts für Urologie, Prof. Dr. Michael Lein und PD Dr. Carsten Stephan.

Nicht zuletzt, sondern am allerwichtigsten war mir der Rückhalt in meiner Familie, bei meinen Eltern Ariane und Hans-Jochen Rabien, meinem Freund Dr. Amir M. Hossini und meinem liebsten Schatz, meiner Tochter Melina.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern / Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und die Habilitationsschrift unter Beachtung der dort enthaltenen Grundsätze erstellt wurde.

.....
Datum

.....
Unterschrift