

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Immunhistochemische Untersuchung differentiell exprimierter
Gene des Prostata- und Nierenzellkarzinoms und ihre
prognostische Bedeutung“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kirsten Wassermann

aus Georgsmarienhütte

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. G. Kristiansen

2. Prof. Dr. med. K. Miller

3. Prof. Dr. med. S. Hauptmann

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1- 2
Einleitung und Zielstellung	3- 4
Material und Methoden	5- 7
Ergebnisse	8-10
Diskussion	11-13
Literaturverzeichnis	14-17
Anteilerklärung	18
Ausgewählte Publikationen:	19
1: “ADAM9 Expression is a Significant and Independent Prognostic Marker of PSA Relapse in Prostate Cancer”	
2: “ADAM9 is highly expressed in renal cell cancer and is associated with tumour progression”	
3: “CD146Protein in Prostate Cancer- revisited with two different antibodies”	
Lebenslauf	20
Komplette Publikationsliste	21
Eidesstattliche Erklärung	22
Danksagung	23

Zusammenfassung

Ziel:

Ziel der durchgeführten Studien war die Evaluation der Expression von ADAM9 (A Disintegrin And Metalloprotease 9) im Prostata- und Nierenzellkarzinom auf Protein- und Transkriptionsebene sowie der Expression des Zelladhäsionsmoleküls CD146 im Prostatakarzinom. Die Expressionsdaten wurden zusammen mit den klinisch-pathologischen Parametern der Patientenkollektive statistisch ausgewertet und insbesondere auf ihre Bedeutung hinsichtlich des progressionsfreien- und des Gesamt-Überlebens analysiert.

Methodik:

Paraffineingebettetes Material von klinisch und pathologisch umfassend charakterisierten Prostatakarzinomen (ADAM9 und CD146) und Nierenzellkarzinomen (ADAM9) wurde immunhistochemisch untersucht. Zusätzlich wurde ADAM9 mRNA in Tumor- und Normalgewebe mittels quantitativer reverser-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion analysiert.

Im Rahmen der Untersuchungen von CD146 im Prostatakarzinom wurden zwei kommerziell erhältliche Antikörper (polyklonal und monoklonal) immunhistologisch und im Western Blot miteinander verglichen.

Für die statistischen Analysen verwendeten wir SPSS. Als statistische Tests wurden der Wilcoxon Test, bivariate Korrelationen nach Spearman, Kreuztabellen, Kaplan Meier Kurven mit Log-Rang-Test und multivariate Überlebensanalysen nach Cox durchgeführt.

Ergebnisse: Die Expression von ADAM9 im Prostatakarzinom war im Vergleich zum angrenzenden normalen Drüsengewebe auf mRNA- und Proteinebene signifikant erhöht und sowohl in uni- als auch multivariaten Analysen mit kürzeren PSA-wiederanstiegsfreien Intervallen verbunden ($p=0,003$), besonders deutlich war dieser Effekt bei Patienten, die prä-operativ eine anti-androgene Vorbehandlung erhalten hatten.

Im Nierenzellkarzinom war die Expression von ADAM9 im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe auf mRNA-Ebene signifikant erhöht und auf Proteinebene signifikant mit

einem höheren Tumorgrad, einem positiven Lymphknotenstatus und dem Vorhandensein von Fernmetastasen assoziiert. Darüber hinaus war die ADAM9 Expression in den univariaten Analysen signifikant mit einem kürzeren Patientenüberleben assoziiert ($p=0,026$).

Die Analyse der CD146 Expression im Prostatakarzinom führte, antikörperabhängig, zu uneinheitlichen Ergebnissen: Der immunhistologische Nachweis mithilfe des polyklonalen Antikörpers zeigte eine eindeutige CD146 Überexpression im Tumor im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe und war signifikant mit kürzeren PSA-wiederanstiegsfreien Überlebenszeiten assoziiert. Der monoklonale CD146 Antikörper hingegen zeigte ein deutlich schwächeres Signal im Epithel, welches schwach jedoch signifikant mit dem des polyklonalen Antikörpers korrelierte. Ein prognostischer Wert hinsichtlich der PSA Expression liess sich jedoch nicht reproduzieren. Die zum Vergleich der beiden Antikörper durchgeführte Western Blot Analyse zeigte eine deutlich verminderte Spezifität des polyklonalen Antikörpers.

Zusammenfassung:

Die Expression von ADAM9 im Prostatakarzinom ist deutlich erhöht und stellt einen unabhängigen prognostischen Marker für den PSA-Wiederanstieg nach radikaler Prostatektomie dar.

Die ADAM9 Expression im Nierenzellkarzinom war ebenfalls erhöht und signifikant mit ungünstigen Prognosemarkern assoziiert. Ein unabhängiger prognostischer Wert lag jedoch nicht vor.

Die Untersuchung von CD146 im Prostatakarzinom zeigt die immensen Differenzen die durch die Verwendung unterschiedlicher Primärantikörper entstehen können und betont die Wichtigkeit einer Spezifitätstestung. Letztere ist für die korrekte Interpretation von Proteinexpressionsstudien entscheidend. Die Expression von CD146 gemessen mit dem polyklonalen Antikörpers war prognostisch für einen früheren PSA-Wiederanstieg bei Prostatakarzinompatienten, obwohl die Immunreaktivität dieses Antikörpers möglicherweise nicht auf CD146-assoziierte Epitope begrenzt ist.

Einleitung und Zielstellung

Das Prostatakarzinom ist mit geschätzten 186320 neuen Fällen in 2008 auch weiterhin das bei weitem häufigste Karzinom des Mannes in den USA und einer der häufigsten Gründe für ein karzinombedingtes Versterben (1). Diese Zahlen und die damit verbundenen sozioökonomischen Implikationen erklären das große Interesse an wissenschaftlichen Untersuchungen zu diesem Thema. Insbesondere die immer noch ungenügenden Optionen bei fortgeschrittenen Karzinomen bedingen die Suche nach neuen möglichen Therapieangriffspunkten und Prognosemarkern um die Behandlung dieses gesellschaftlich relevanten Karzinoms individueller und effektiver zu gestalten.

Es wird angenommen, dass das Nierenzellkarzinom (NZK) für den Tod von 13010 Menschen in den USA (1) im Jahr 2008 verantwortlich ist, und dass es etwa 2-3% der weltweiten Karzinome ausmacht (2,3). Es ist eines der letalsten urologischen Malignome. Lymph- und systemische Metastasen sowie die vaskuläre Invasion sind wichtige prognostische Faktoren bei diesem Tumor (4).

Neue molekulare Marker werden dringend gesucht, um die Klassifikation des Nierenzellkarzinoms zu verbessern und nach molekularen Grundlagen zu diversifizieren, die jeweilige Prognose besser zu beurteilen und dadurch eine individuelle Therapie zu ermöglichen (5-8).

Wir konzentrierten uns auf ADAM9, ein Mitglied der „eine disintegrin und Metalloprotease“ Familie, die in verschiedene physiologische und pathophysiologische Prozesse der Zelladhäsion, der Zellmigration und des Gewebeumbaus eingebunden ist (9,10). ADAMs sind membranverankerte Glykoproteine, die eine Protease- und Adhäsionsdomäne enthalten (11). Die Interaktionen von ADAMs mit der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix können für das Wachstum von Tumoren essentiell sein. ADAM9 (Synonym: MDC9) scheint in grundlegender Weise in die Tumorgenese und Tumorprogression eingebunden sein, indem es die Rezeptoraktivität des endothelin-growth-factors (EGF) modifiziert und die Krebszelleninvasion über eine Regulation von E-Cadherin und Integrinen fördert (12-16).

Eine Überexpression von ADAM9 wurde in zahlreichen soliden Tumoren beschrieben (17-21). Im Magenkarzinom ist die Expression von ADAM9 signifikant erhöht und eine

Inhibition führte zu einem verminderten Wachstum der Magenkarzinomzellen (22). Die Überexpression von ADAM9 in Lungenkarzinomzelllinien führte zu einer erhöhten Invasivität und war signifikant mit Hirnmetastasen assoziiert (23).

Eine erhöhte ADAM9-Expression im Prostatakarzinom konnte erstmals von Karan *et al.* beschrieben werden. Die genannte Arbeitsgruppe fand eine erhöhte ADAM9 Expression in neun Prostatakarzinomzelllinien (18).

Das weiterhin untersuchte Zelladhäsionsmolekül CD146 (Synonym: MCAM, Antigen, P1H12 Antigen, MUC18), wird physiologischerweise im embryonalen Gewebe, Endothelzellen, Nervengewebe, Muskelzellen, Myoepithelzellen, Mammaepithel, bronchialen Basalzellen, aktivierten Lymphozyten und Knochenmarksfibroblasten exprimiert (24).

Seine Überexpression wurde in zahlreichen Malignomen einschließlich Sarkomen, malignen Melanomen und verschiedenen Karzinomen gefunden (24).

Kristiansen *et al.* beschrieben eine CD146 Expression in Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) und zeigten einen ungünstigen Effekt von CD146 auf die Patientenüberlebenszeit (25).

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Fürstenberger *et al.* korrelierte CD146 in der real time-PCR im peripheren Blut mit dem Vorhandensein zirkulierender Endothelzellen und war somit ein Marker der Angiogenese, einem entscheidenden Faktor der Karzinomprogression (26).

Die vorliegenden Studien untersuchten die prognostische Relevanz von ADAM9 und CD146 in Prostatakarzinomen bzw. von ADAM9 beim Nierenzellkarzinom.

Material und Methoden

Patienten:

In die Untersuchungen eingeschlossen wurden 198 (ADAM9) und 168 (CD146) Prostatakarzinompatienten sowie 108 Patienten mit Nierenzellkarzinomen (ADAM9).

Alle Patienten wurden im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Charité Berlin, Campus Mitte, diagnostiziert und ganz überwiegend in der Klinik für Urologie der Charité, Campus Mitte, operativ behandelt. Alle histologischen Diagnosen wurden nach den Leitlinien der WHO gestellt.

Die Patienten mit einem Prostatakarzinom (nach Prostatektomie) wiesen ein postoperatives PSA unter 1 ng/ml auf. Patienten mit einem systemischen Befall (pM1) zur Zeit der Diagnosestellung wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Die Fallauswahl richtete sich nach der Gewebeverfügbarkeit. Das Patientenalter der prostatektomierten Patienten reichte von 47 bis 74 Jahre mit einem Median von 62 Jahren in beiden Kollektiven. Die Patienten mit Nierenkarzinom waren zwischen 28 und 92 Jahre alt mit einem Median von 62 Jahren.

Klinische Nachbeobachtungsdaten, die bei den Prostatakarzinompatienten den Zeitraum bis zu einem erneuten PSA-Anstieg mit einschlossen, waren von allen Patienten verfügbar.

Die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit betrug 44 bzw. 46,5 Monate für die Prostatakarzinompatienten und 30 Monate für Patienten mit einem Nierenzellkarzinom. Ein geringer Teil der Prostatakarzinompatienten hatte eine präoperative anti-androgene Hormontherapie erhalten.

Immunhistochemie:

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe geschnitten (4µm) und auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht. Nach Entparaffinisierung mit Xylol erfolgte die Antigendemaskierung durch Kochen in 0,01M Zitratpuffer für 5 Minuten in einem Schnellkochtopf. Die Primärantikörper wurden in folgenden Verdünnungen (Verdünnungsmedium mit hintergrundreduzierendem Puffer, DAKO, Glostrup, Dänemark (ADAM9) bzw. DAKO, Hamburg, Germany (CD146)

eingesetzt: ADAM9: polyklonal, Ziege, AF949, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland, 1:50.

CD146: polyklonal, Kaninchen, ab28360, Abcam, Cambridge, UK, 1:400.

CD146: monoklonal (Maus, NCL-CD146, Novocastra, Newcastle upon Tyne, Vereinigtes Königreich), 1:400.

Als Detektionssysteme wurde bei den Prostatakarzinomen die Streptavidin-Biotin-Methode (DAKO, Hamburg, Deutschland) mit alkalischer Phosphatase als Reporterenzym verwendet. Bei der Untersuchung am Nierenzellkarzinom verwendeten wir das REAL™ EnVision™ System (Dako). Die Anwendung der Detektionssysteme erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Diaminobenzidin (DAB, Sigma- Aldrich) diente beim Nierenzellkarzinom und Fast-Red (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in den Prostatakarzinomfällen als Chromogen. Die Schnitte wurden mit Haematoxylin gegengefärbt. Die Antikörperspezifität des ADAM9-Antikörpers wurde mit einem Peptidblockungsexperiment bestätigt.

Auswertung:

Die Immunhistochemie wurde von zwei Pathologen die für die Überlebenszeiten verblindet waren, ausgewertet. Die Färbeintensität wurde mit einem Vierstufensystem bewertet (0=negativ, 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Färbeintensität). Für den Western Blot des CD146 verwendeten wir humanes CD146. Die Fraktionierung erfolgte durch Auftragung auf ein SDS-Page und anschließende Übertragung gemäß der Prozedur nach Towbin auf eine PVDF-Membran (Millipore Corp., Bedford, MA, USA).

Die Antikörper-Antigen-Reaktion wurde durch das ECL-Advance™ Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) dargestellt.

Da der Western Blot des polyklonalen Antikörpers verschiedene Banden anzeigte, führten wir ein Peptidblockungsexperiment mit rekombinantem humanen CD146 Peptid durch.

Statistik:

Die Daten wurden mittels SPSS, Version 14.0 analysiert (SPSS Inc., Chicago, USA). Fischer's exact Test und Chi-Quadrat Tests wurden für die Korrelation zwischen immunhistochemischer Expression und klinisch-pathologischen Parametern benutzt. Die Expressionsintensitäten wurden durch den Wilcoxon- und Mann-Whitney-U-Test

miteinander verglichen. Die univariate Überlebensanalyse wurde entsprechend der Kaplan-Meier Methode durchgeführt und Unterschiede bezüglich der Überlebenskurven mit dem Log rank Test bestimmt. Die multivariate Analyse wurde mittels Cox-Regression durchgeführt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant gewertet.

Ergebnisse

ADAM9 im Prostatakarzinom

ADAM9 konnte in normalem und malignem Prostataepithel nachgewiesen werden. Die Unterschiede der ADAM9 Proteinexpression in Tumor- und Normalgewebe waren dabei höchst signifikant ($p < 0,001$).

Nur 14,1% der Prostatakarzinomfälle waren komplett negativ für ADAM9.

Im Karzinomgewebe herrschte eine diffuse zytoplasmatische Immunreaktivität vor. Prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN) war in 30,3% der Fälle vorhanden. Die ADAM9 Expression in der PIN war signifikant höher ($p = 0,001$) als im Normalgewebe, unterschied sich aber nicht signifikant von der ADAM9 Expression des invasiven Karzinoms ($p = 0,645$).

Überlebensanalysen und Assoziationen:

Die ADAM9 Proteinexpression korrelierte in bivariaten Analysen mit keinem der klinisch-pathologischen Parameter. Präoperatives PSA, pT-Status (Tumorgrad), Gleason-Score und Residualtumorstatus erreichten in den univariaten Überlebenskurven (Kaplan-Meier) statistische Signifikanz.

Eine höhere ADAM9 Expression im Prostatakarzinom war signifikant mit einem kürzeren PSA-wiederanstiegsfreien Intervall assoziiert ($p = 0,003$). Eine hohe ADAM9 Expression war dabei generell ungünstig, eine niedrige ADAM9 Expression wiederum war ebenfalls eher unvorteilhaft, wenn sie diffus und nicht luminal betont war. Tumorpatienten die eine geringe polare ADAM9 Expression aufwiesen, hatten einen günstigen Verlauf. Wichtig ist, dass nicht allein die Expressionsintensität sondern auch die subzelluläre Lokalisation (membrangebunden vs. diffus zytoplasmatisch) eine Rolle für die korrekte Interpretation spielt. Der unabhängige prognostische Wert von ADAM9 wurde durch eine Cox-multivariate Analyse (inclusive pT-Status, Gleason-Score, präoperativem PSA-Wert und Residualtumorstatus) bestätigt.

Die Ergebnisse galten ebenso für die anti-androgen vorbehandelten Patienten, in denen ADAM9 den einzigen signifikanten Parameter für einen PSA-Wiederanstieg darstellte ($p = 0,031$).

ADAM9 im Nierenzellkarzinom

Die ADAM9 Expression im Nierenzellkarzinom war signifikant höher als im Normalgewebe ($p < 0,0001$). Im Nierenzellkarzinom konnte man eine zytoplasmatisch betonte Färbung erkennen, wohingegen das Normalgewebe v. a. luminalseitig in den Zellen der proximalen Tubuli angefärbt wurde.

Es konnten keine signifikanten Assoziation zwischen ADAM9 mRNA Expression und klinisch-pathologischen Parametern (Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Metastasen, histologischer Typ und Residualtumorstatus) gezeigt werden (alle p -Werte $> 0,5$).

Obwohl eine starke ADAM9 Proteinexpression sehr viel häufiger im Tumor als im Normalgewebe gefunden wurde, waren diese Unterschiede im Wilcoxon signed rank Test nicht signifikant ($p = 0,367$). In bivariaten Analysen hingegen war eine höhere ADAM9 Proteinexpression signifikant mit Tumorstatus, Patientenalter und Resektionsstatus R1 assoziiert.

Eine höhere ADAM9 Proteinexpression war signifikant mit einer kürzeren Überlebenszeit ($p = 0,026$) verbunden.

Die Cox multivariaten Überlebensanalysen zeigten keinen unabhängigen prognostischen Wert für ADAM9, wohingegen konventionelle Parameter wie pT-Status und das Vorhandensein von Fernmetastasen hoch signifikant blieben.

CD146 im Prostatakarzinom

Die durch den polyklonalen Antikörper dargestellte CD146 Expression blieb nur in sehr wenigen Fällen des Tumors und angrenzendem Normalgewebe negativ. Im Tumor war eine deutlich vermehrte Färbung nachzuweisen. Die Unterschiede in der zytoplasmatischen CD146 Expression zwischen Tumor und Normalgewebe waren signifikant ($p < 0,001$).

Bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers zeigten nur 46 der Prostatakarzinomfälle (28,7%) eine geringe zytoplasmatische Positivität für CD146, das angrenzende normale Prostataepithel blieb vollständig negativ.

Die durch den monoklonalen Antikörper dargestellte CD146 Expression korrelierte signifikant mit der des polyklonalen Antikörpers ($p = 0,001$, Korrelationskoeffizient 0,271), aber es ließ sich keine Assoziation mit den klinischpathologischen Parametern nachweisen.

Bei Darstellung durch den polyklonalen Antikörper hingegen korrelierte die CD146 Expression mit antiandrogener Vorbehandlung, Gleason-Score, pT-Status und H-Score.

Nach Dichotomisierung in gering und stark CD146 exprimierende Tumore zeigte sich, dass bei Verwendung des polyklonalen Antikörpers Tumoren mit einer hohen CD146 Expression signifikant kürzere PSA-wiederanstiegsfreie Überlebenszeiten hatten.

Im Western Blot wurden die Unterschiede zwischen poly- und monoklonalem Antikörper deutlich. In den PC-3 Zelllysaten zeigte der polyklonale Antikörper vier Banden verschiedenen Molekulargewichtes. Das Band bei 130kDa zeigt nur eine schwache Intensität. Der monoklonale Antikörper stellte das humane CD146 in den gleichen Zelllysaten mit nur einer stark gefärbten Bande mit dem korrekten Molekulargewicht dar.

Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Zusammenhang zwischen einer Expression von ADAM9 und CD146 im Prostatakarzinom bzw. von ADAM9 im Nierenzellkarzinom und klinisch-pathologischen Parametern dieser malignen Tumorerkrankungen analysiert.

Die Überexpression von ADAM9, einem Zelladhäsions- und Zellmigrationsmolekül wurde in zahlreichen soliden Tumoren beschrieben (18-20,27). Im Prostatakarzinom fanden wir in eigenen Vorarbeiten (Kristiansen et al., 2005) eine deutliche Überexpression auch im Prostatakarzinom auf Transskriptionsebene.

Grützmann *et al.* und Alldinger *et al.* fanden heraus, dass ADAM9 mRNA im duktalem Adenokarzinom des Pankreas überexprimiert ist. Mittels Immunhistochemie wiesen sie eine erhöhte ADAM9 Expression in 70% der Pankreaskarzinome nach (28). In einer Folgestudie konnte ein signifikanter prognostischer Wert der ADAM9 Expression nachgewiesen werden (29).

In unserer Studie war ADAM9 Protein im Karzinomgewebe signifikant überexprimiert und eine stärkere ADAM9 Expression war mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf verbunden.

Sung *et al.* wies eine erhöhte ADAM9 Expression während des Übergangs von androgen-abhängigen zu androgen-unabhängigen und metastasierten Karzinomzellen nach (30). In unserer Studie war die erhöhte ADAM9 Expression bei anti-androgen vorbehandelten Patienten der einzige signifikante Parameter für einen PSA-Wiederaanstieg. Dies könnte eine Bedeutung für die Beurteilung des prognostischen Werts von ADAM9 in antiandrogen vorbehandelten Patienten haben.

Es bleibt noch in größeren Kohorten zu zeigen, ob die ADAM9 Expression als prädiktiver Marker einer antiandrogenen Therapie dienen kann.

Die ADAM9 Proteinexpression war signifikant und unabhängig mit einem kürzeren PSA-wiederaanstiegsfreien Intervall verbunden. Wenn unsere Ergebnisse in anderen Studien bestätigt würden, könnte ADAM9 somit möglicherweise als unabhängiger prognostischer Marker verwendet werden.

Unsere Untersuchungen von ADAM9 im Nierenzellkarzinom zeigten eine signifikante Erhöhung der ADAM9 Expression auf mRNA-Ebene.

Die Proteinexpression von ADAM9 war in 34% der Tumoren zwar ebenfalls erhöht, es konnte jedoch keine signifikante Erhöhung nachgewiesen werden. Für diese Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinebene könnten posttranskriptionale Prozesse verantwortlich sein.

Interessanterweise wurde ADAM9 in den meisten (13 von 17) der papillären Karzinome gefunden. Obwohl die Fallzahl des papillären Nierenzellkarzinoms in unserer Kohorte klein war, könnte diese Information für die histologische Klassifizierung des Nierenzellkarzinoms von diagnostischem Nutzen sein.

Auf Proteinebene war die ADAM9 Expression signifikant mit einem höheren Tumorgrad, einem positiven Lymphknotenstatus und dem Vorhandensein von Fernmetastasen assoziiert. Eine Assoziation mit einem kürzeren Patientenüberleben konnte jedoch lediglich in den univariaten Analysen festgestellt werden. Da auch die histologische Differenzierung nicht signifikant ausfiel nehmen wir an, dass die Kohorte nicht groß genug war, um eine signifikante Erhöhung in den multivariaten Analysen nachweisen zu können. Daher sollte die Bedeutung von ADAM9 als prognostischer Marker im Nierenzellkarzinom in weiteren Studien an grösseren Kohorten untersucht werden.

Das Adhäsionsmolekül CD146 wurde in verschiedenen Studien mit der Progression des Prostatakarzinoms in Verbindung gebracht. Wu *et al.* wies durch die Verwendung eines selbst erzeugten polyklonalen Ig-Hühnerantikörper nach, dass CD146 in PIN, Prostatakarzinommetastasen und zu einem geringeren Anteil auch in prostaticem Normalgewebe exprimiert wird (31,32). Omara-Opyene *et al.* wiesen CD146 in Prostatakarzinomzelllinien nach, indem sie einen polyklonalen IgG-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology verwendeten, der nicht für Formalin fixiertes Gewebe empfohlen wird (33).

Um einen möglichen diagnostischen Nutzen zu finden, wollten wir in der vorliegenden Arbeit die Expression von CD146 im Prostatakarzinom untersuchen, indem wir zwei kommerziell erhältliche Antikörper verwendeten. Dies ist die erste immunhistologische Evaluation von CD146 im Prostatakarzinom in einer gut charakterisierten und repräsentativen Kohorte.

Bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers konnten wir nur eine sehr schwache und seltene CD146 Expression nachweisen. Dies stimmt mit Ergebnissen von Shih *et al.* überein, die den monoklonalen Antikörper MN-4 an 15 Prostatakarzinomen sowie einer kleinen Anzahl von normalem Prostatagewebe getestet hatten und komplett negative Ergebnisse erhielten (34).

Unsere Studie schloss ein breites Spektrum von Karzinomen ein, die einen vergleichsweise hohen Anteil von schlecht differenzierten und aggressiveren Tumoren hatten, die nach den Ergebnissen von Wu *et al.* Tumore mit einer erhöhten CD146 Expression hätten sein sollen (31,32).

Unsere Ergebnisse zur CD146 Expression (monoklonaler Antikörper) im Prostatakarzinom stimmen nicht mit den Ergebnissen der CD146 Expression (polyklonaler Antikörper) überein, noch entsprechen sie den Beobachtungen von Wu *et al.* und Omara-Opyene *et al.* (beide verwendeten polyklonale Antikörper).

Polyklonal nachgewiesenes CD146 zeigt einen prognostischen Wert. Jedoch wird die Validität des polyklonalen Antikörpers durch seine fehlende Spezifität in Frage gestellt, so dass er nicht als Nachweis für CD146 empfohlen werden kann.

Die Studie macht auf die Notwendigkeit einer routinierten und standardisierten Spezifitätstestung auch kommerziell erhältlicher Antikörper aufmerksam.

Zusammenfassend konnte in den drei vorliegenden Publikationen die prognostische Bedeutung von ADAM9 im Prostatakarzinom und Nierenzellkarzinom sowie von CD146 im Prostatakarzinom genauer bestimmt werden.

Die Studien lieferten Hinweise darauf, dass diese zwei Proteine als Marker für eine schlechtere Prognose dienen könnten. Eine zukünftige routinemäßige immunhistochemische Untersuchung von Tumorgewebe auf die Expression dieser Marker soll Patientengruppen definieren, die mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf rechnen müssen, und die somit unter Umständen von einer entsprechend intensiveren Therapie/bzw. Betreuung profitieren könnten. Weitere Studien müssten sich anschließen, um diese These zu überprüfen.

Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ: Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58; 71-96.
2. McLaughlin JK, Lipworth L: Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Seminars in oncology* 2000, 27(2):115-123.
3. Dhote R, Pellicer-Coeuret M, Thiounn N, Debre B, Vidal-Trecan G: Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for prevention. *BJU international* 2000, 86(1):20-27.
4. Dall'Oglio MF, Arap MA, Antunes AA, Cury J, Leite KR, Srougi M: Impact of clinicopathological parameters in patients treated for renal cell carcinoma. *The Journal of urology* 2007, 177(5):1687-1691.
5. Breda A, Konijeti R, Lam JS: Patterns of recurrence and surveillance strategies for renal cell carcinoma following surgical resection. *Expert review of anticancer therapy* 2007, 7(6):847-862.
6. Martignoni G, Brunelli M, Gobbo S, Remo A, Ficarra V, Cossu-Rocca P, Pea M, Chilosi M, Menestrina F, Cheng L: Role of molecular markers in diagnosis and prognosis of renal cell carcinoma. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology* 2007, 29(1):41-49.
7. Rathmell WK, Martz CA, Rini BI: Renal cell carcinoma. *Current opinion in oncology* 2007, 19(3):234-240.
8. Young AN, Master VA, Amin MB: Current trends in the molecular classification of renal neoplasms. *TheScientificWorldJournal* 2006, 6:2505-2518.
9. Hammond ME, Fitzgibbons PL, Compton CC, Grignon DJ, Page DL, Fielding LP, Bostwick D, Pajak TF: College of American Pathologists Conference XXXV: solid tumor prognostic factors-which, how and so what? Summary document and recommendations for implementation. *Cancer Committee and Conference*

- Participants. Archives of pathology & laboratory medicine 2000, 124(7):958-965.
10. Yamamoto S, Higuchi Y, Yoshiyama K, Shimizu E, Kataoka M, Hijiya N, Matsuura K: ADAM family proteins in the immune system. Immunology today 1999, 20(6):278-284.
 11. Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DG, White JM: ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. The Journal of cell biology 1995, 131(2):275-278.
 12. Iba K, Albrechtsen R, Gilpin BJ, Loechel F, Wewer UM: Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. The American journal of pathology 1999, 154(5):1489-1501.
 13. Nath D, Slocombe PM, Stephens PE, Warn A, Hutchinson GR, Yamada KM, Docherty AJ, Murphy G: Interaction of metargidin (ADAM-15) with alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins on different haemopoietic cells. Journal of cell science 1999, 112 (Pt 4):579-587.
 14. Nath D, Slocombe PM, Webster A, Stephens PE, Docherty AJ, Murphy G: Meltrin gamma(ADAM-9) mediates cellular adhesion through alpha(6)beta(1) integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. Journal of cell science 2000, 113 (Pt 12):2319-2328.
 15. Schwettmann L, Tschesche H: Cloning and expression in Pichia pastoris of metalloprotease domain of ADAM 9 catalytically active against fibronectin. Protein expression and purification 2001, 21(1):65-70.
 16. Zhou M, Graham R, Russell G, Croucher PI: MDC-9 (ADAM-9/Meltrin gamma) functions as an adhesion molecule by binding the alpha(v)beta(5) integrin. Biochemical and biophysical research communications 2001, 280(2):574-580.
 17. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, et al: Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers of patient survival. J Pathol 2005;205:359-76

18. Karan D, Lin FC, Bryan M, et al: Expression of ADAMs (a desintegrin and metalloprotease) and TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) in human prostatic adenocarcinomas. *Int J Oncol* 2003;23:1365-71
19. O'Shea C, McKie N, Buggy Y, et al: Expression of ADAM9 mRNA and protein in human breast cancer. *Int J Cancer* 2003;105:754-61
20. Peduto L, Reuter VE, Shaffer DR, Scher HI, Blobel CP. Critical function for ADAM9 in mouse prostate cancer. *Cancer Res* 2005;65:9312-9
21. Sung L, Kubo H, Shiremura K, et al: Oxidative stress induces ADAM9 protein expression in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:9519-26
22. Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roessner A, Rocken C. The desintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12 and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int J Oncol* 2005;26:17-24
23. Shintani Y, Higashiyama S, Ohta M, et al: Overexpression of ADAM9 in non-small cell lung cancer correlates with brain metastasis. *Cancer Res* 2004;64:4190-6
24. Shih IM. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol* 1999; 189: 4-11
25. Kristiansen G, Yu Y, Schluns K et al. Expression of the cell adhesion molecule CD146/MCAM in non-small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol* 2003; 25: 77-81.
26. Fuerstenberger G, von Moos R, Senn HJ et al. Real-time PCR of CD146 mRNA in peripheral blood enables the relative quantification of circulating endothelial cells and is an indicator of angiogenesis. *Br J Cancer* 2005; 93: 793-798.
27. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, et al. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals. *J Pathology* 2005; 205:359-76
28. Grutzmann R, Foerder M, Alldinger I, Staub E, Brummendorf T, Ropcke S, Li X, Kristiansen G, Jesnowski R, Sipos B et al: Gene expression profiles of

- microdissected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Virchows Arch* 2003, 443(4):508-517
29. Grutzmann R, Luttges J, Sipos B, Ammerpohl O, Dobrowolski F, Alldinger I, Kersting S, Ockert D, Koch R, Kalthoff H et al: ADAM9 expression in pancreatic cancer is associated with tumour type and is a prognostic factor in ductal adenocarcinoma. *British journal of cancer* 2004, 90(5):1053-1058
 30. Sung SY, Kubo H, Shigemura K, Arnold RS, Logani S, Wang R, Konaka H, Nakagawa M, Mousses S, Amin M et al: Oxidative Stress Induces ADAM9 Protein Expression in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer research* 2006, 66(19):9519-9526
 31. Wu GJ, Wu MW, Wang SW et al. Isolation and characterization of the major form of human MUC18 cDNA gene and correlation of MUC18 over-expression in prostate cancer cell lines and tissues with malignant progression. *Gene* 2001; 279: 17-31
 32. Wu GJ, Fu P, Chiang CF et al. Increased expression of MUC18 correlates with the metastatic progression of mouse prostate adenocarcinoma in the TRAMP model. *J Urol* 2005; 173: 1778-1783
 33. Omara-Opyene AL, Qiu J, Shah GV et al. Prostate cancer invasion is influenced more by expression of a CD44 isoform including variant 9 than by Muc18. *Lab Invest* 2004; 84: 894-907
 34. Shih IM, Nesbit M, Herlyn M et al. A new Mel-CAM (CD146)-specific monoclonal antibody, MN-4, on paraffin-embedded tissue. *Mod Pathol* 1998; 11: 1098-1106

Anteilerklärung

Die Promovendin hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Promotionen:

- Publikation 1: **ADAM9 Expression is a Significant and Independent Prognostic Marker of PSA Relapse in Prostate Cancer.**
Autoren: F. R. Fritzsche, M. Jung, A. Toelle, P. Wild, A. Hartmann, K. Wassermann, A. Rabien, M. Lein, M. Dietel, C. Pilarsky, D. Calvano, R. Gruetzmann, K. Jung, G. Kristiansen
Prozent: 10%
Beitrag im Einzelnen: Assistenz bei der Auswertung der Immunhistochemie und der Statistik.
- Publikation 2: **ADAM9 is highly expressed in renal cell cancer and is associated with tumour progression.**
Autoren: F. R. Fritzsche*, K. Wassermann*, M. Jung, A. Tölle, I. Kristiansen, M. Johannsen, M. Lein, M. Dietel, K. Jung, G. Kristiansen
Prozent: 50%
Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Immunhistochemie, supervidierte Auswertung der Immunhistochemie, Assistenz bei der Berechnung der Statistik.
- Publikation 3: **CD146 Protein in Prostate Cancer- revisited with two different antibodies.**
Autoren: F. R. Fritzsche*, K. Wassermann*, A. Rabien, H. Schick Tanz, A. Dankhof, S. Loenning, M. Dietel, K. Jung, G. Kristiansen
Prozent: 25%
Beitrag im Einzelnen: Assistenz bei der Auswertung der Immunhistochemie und der Statistik.

*geteilte Erstautorenschaft

Ausgewählte Publikationen

Publikation 1: European Urology, 2007 Nov. (Impact Factor 2007: 5,634)

Titel: ADAM9 Expression is a Significant and Independent Prognostic Marker of PSA Relapse in Prostate Cancer.

Autoren: F. R. Fritzsche, M. Jung, A. Toelle, P. Wild, A. Hartmann, K. Wassermann, A. Rabien, M. Lein, M. Dietel, C. Pilarsky, D. Calvano, R. Gruetzmann, K. Jung, G. Kristiansen

Publikation 2: BMC-Cancer, 2008 Jun. (Impact Factor 2007: 2,71)

Titel: ADAM9 is highly expressed in renal cell cancer and is associated with tumour progression.

Autoren: F. R. Fritzsche*, K. Wassermann*, M. Jung, A. Tölle, I. Kristiansen, M. Johannsen, M. Lein, M. Dietel, K. Jung, G. Kristiansen

Publikation 3: Pathology, 2008 Aug. (Impact Factor 2007: 1,772)

Titel: CD146 Protein in Prostate Cancer- revisited with two different antibodies.

Autoren: F. R. Fritzsche, K. Wassermann, A. Rabien, H. Schicktanz, A. Dankhof, S. Loenning, M. Dietel, K. Jung, G. Kristiansen

* geteilte Erstautorenschaft

Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutztechnischen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

Bremen, den 06.04.2010

Kirsten Wassermann

Vollständige Publikationsliste

Publikation 1: European Urology, 2007 Nov. (Impact Factor 2007: 5,634)

Titel: ADAM9 Expression is a Significant and Independent Prognostic Marker of PSA Relapse in Prostate Cancer.

Autoren: F. R. Fritzsche, M. Jung, A. Toelle, P. Wild, A. Hartmann, K. Wassermann, A. Rabien, M. Lein, M. Dietel, C. Pilarsky, D. Calvano, R. Gruetzmann, K. Jung, G. Kristiansen

Publikation 2: BMC-Cancer, 2008 Jun. (Impact Factor 2007: 2,71)

Titel: ADAM9 is highly expressed in renal cell cancer and is associated with tumour progression.

Autoren: F. R. Fritzsche*, K. Wassermann*, M. Jung, A. Tölle, I. Kristiansen, M. Johannsen, M. Lein, M. Dietel, K. Jung, G. Kristiansen

Publikation 3: Pathology, 2008 Aug. (Impact Factor 2007: 1,772)

Titel: CD146 Protein in Prostate Cancer- revisited with two different antibodies.

Autoren: F. R. Fritzsche, K. Wassermann, A. Rabien, H. Schick Tanz, A. Dankof, S. Loening, M. Dietel, K. Jung, G. Kristiansen

Publikation 4: British Journal of Cancer, 2008 September

Titel: GOLPH2 Protein Expression as a novel Tissue Biomarker for Prostate Cancer - Implications for Tissue-based Diagnostics.

Autoren: G. Kristiansen, FR Fritzsche, K. Wassermann, C. Jäger, A. Tölle, M. Lein, C. Stephan, K. Jung, C: Pilarsky, M. Dietel, H. Moch

geteilte Erstautorenschaft

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Kirsten Wassermann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Immunchemische Untersuchung differentiell exprimierter Gene des Prostata- und Nierenzellkarzinoms und ihre potentiell prognostische Bedeutung

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum: 25.08.2009

Kirsten Wassermann

Danksagung

Für die hervorragende Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Glen Kristiansen, meinem Betreuer Herrn Dr. Florian Fritzsche und den Mitgliedern der Arbeitsgruppe AG Expressionsanalyse urogenitaler Karzinome Frau Dr. Anja Dankof, Frau Britta Beyer und Herrn Dr. Stefan Pahl sowie den Kooperationspartnern der Urologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin herzlich danken.

Ich danke dem Direktor des Instituts für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin Herrn Prof. Dr. Manfred Dietel für die Möglichkeit an seinem Institut zu promovieren.

Für die freundliche und hilfsbereite Aufnahme danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung, die mir in der Zeit meiner Promotion und während meines Studiums zuteil wurde und die mir stets Rückhalt gibt.