

**Identifizierung differenziell exprimierter Gene in
soliden Tumoren am Beispiel des Prostatakarzinoms
und der Einsatz ausgewählter Gene (CD24, CD166)
als molekulare Prognosemarker**

HABILITATIONSSCHRIFT

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Pathologie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. med. Glen Kristiansen
Geboren am 28.03.1969 in Freiburg i.Br.

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht am: September/2003
öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 18.03.2004

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. G. Sauter
2. Prof. Dr. med. F. Hofstädter

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Vorbemerkungen	3
2. Einleitung	4
3. Expressionsanalyse des Prostatakarzinoms	5
4. CD166	6
5. CD24 - tumorbiologische Aspekte eines Moleküls	7
5.1 Funktionen von CD24	8
5.2 Funktionen von CD24 in humanen Tumoren	9
5.3 Expression von CD24 in humanen Tumoren	11
5.4 Spezifität des Antikörpers Ab-2	12
5.5 CD24 im Ovarialkarzinom	13
5.6 CD24 im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom	14
5.7 CD24 im Prostatakarzinom	16
5.8 CD24 im Mammakarzinom	17
5.9 CD24 im Pankreaskarzinom	19
5.10 Hämatologische Tumoren	20
5.11 Tumoren des Nervensystems	21
5.12 Nierentumoren	21
5.13 Hepatozelluläres Karzinom	21
5.14 Andere Tumoren	22
6. Zusammenfassung und Ausblick	23
Literaturverzeichnis	25
Eigene Publikationen	25
Fremdliteratur	29
Relevante Kongressbeiträge	35
Danksagung	36
Eidesstattliche Erklärung	37

1. Vorbemerkungen

1998 begann eine Kooperation zwischen dem Institut für Pathologie der Charité und der biotechnologischen Firma metaGen mit dem Ziel, Gene, die in Diagnostik oder Therapie maligner humaner Tumoren eine Rolle spielen könnten, zu identifizieren. Geeignete Gewebeproben wurden von uns morphologisch charakterisiert, metaGen Mitarbeiter haben mRNA isoliert und mit der neuen Chip-Technologie die Expression von multiplen Genen simultan bestimmt. Von den durch diese Screeningmethode gefundenen Genen war CD166 war das erste, dessen Überexpression wir im Prostatakarzinom immunhistochemisch an Gefrierschnitten bestätigen konnten (Kristiansen et al., 2003). Im Jahre 2001 wurde für anderes dieser differenziell exprimierten Gene, CD24, ein paraffingängiger monoklonaler Antikörper kommerziell erhältlich. Diesen nutzten wir, um die Überexpression dieses Genes im Prostatakarzinom zu verifizieren und auch andere solide Tumoren auf ihre CD24 Expression hin zu untersuchen. Interessanterweise fand sich ein prognostischer Wert der CD24 Expression im Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und auch im Prostatakarzinom, nicht jedoch im Pankreaskarzinom. 2002 wurde auch für CD166 ein paraffingängiger Antikörper erhältlich, mit dem wir die CD166 Überexpression erneut bestätigen konnten, wobei sich durch die Verwendung klinisch charakterisierten Tumormaterials auch für dieses Gen ein prognostischer Wert darstellen ließ; dies ist nicht separat publiziert, sondern in die grundlegende Prostata-Expressionsarbeit (Anhang 9.1) aufgenommen worden. Alle diese Arbeiten werden in den folgenden Abschnitten gesondert behandelt.

2. Einleitung

Im Jahre 2001 verstarben in Deutschland 207.619 (25.1%) der Menschen vorzeitig an malignen Tumoren (Todesursachenstatistik 2001, Statistisches Bundesamt). Die Prognose der Betroffenen hat sich in den letzten 30 Jahren bei einigen Tumoren, beispielsweise Hodenkrebs, durch neue Therapiekonzepte erheblich verbessert. Veränderte Lebensgewohnheiten und ein gestiegenes Gesundheitsbewusstsein der Patienten haben auch zu Verschiebungen der Inzidenzen einiger Krebsentitäten geführt. So ist auch in Deutschland bei Männern das Prostatakarzinom inzwischen an erster Stelle der Neuerkrankungen, während das Magenkarzinom bei beiden Geschlechtern seltener geworden ist (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002). Krebs ist seit längerem als Erkrankung erkannt, die sowohl mit Veränderungen des Genoms, des Transkriptoms und des Proteoms einhergeht. Der biotechnologische Fortschritt der letzten 15 Jahre ermöglichte eine wesentlich detailliertere Untersuchung des Prozesses der Kanzerogenese, wobei unser Verständnis den neuerdings generierten Datenmengen nur langsam folgt. So ist der Abschluß der Sequenzierung des humanen Genoms mehr ein Anfang denn ein erfolgreiches Ende der Forschung, da uns gerade einmal die Menge, Art und Beschaffenheit der genetischen Bausteine, nicht jedoch ihre Funktion und ihr Zusammenspiel bekannt sind.

Mitte der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die Technik entwickelt, multiple Gen-spezifische Sonden, entweder als cDNA oder als Oligonucleotid, auf einer Matrix aufzutragen. Diese Matrizen erlauben, in einem Hybridisierungsschritt, eine Vielzahl von Genen sowohl auf genomischer als auch transkriptorischer Ebene zu erkennen (für eine Übersicht siehe Pilarsky *et al.*, 1999). Die Suche nach differenziell exprimierten Genen, Genen, die im Tumor ein deutlich anderes Expressionsniveau als im korrespondierenden Normalgewebe haben, hatte begonnen (Sager *et al.*, 1997). Diese Gene versprachen ideale Kandidatengene für die weitere Forschung abzugeben, da sie zum Verständnis der Tumorerkrankung beizutragen geeignet schienen. Darüber hinaus kommen sie als potentielle diagnostische Marker oder gar Zielstrukturen für neue Therapieansätze infrage. In den letzten Jahren wurden mittels Microarraytechnologie eine Vielzahl differenziell exprimierter Gene in Karzinomen verschiedener Organe beschrieben: Prostata (Henshall *et al.*, 2003; Welsh *et al.*, 2001; Dhanasekaran *et al.*, 2001; Singh *et al.*,

2002; Luo *et al.*, 2001; Ernst *et al.*, 2002; Stamey *et al.*, 2001), Mamma (Sorlie *et al.*, 2001; van 't Veer *et al.*, 2002), Lunge (Miura *et al.*, 2002; Garber *et al.*, 2002), Colon (Alon *et al.*, 1999) und anderen.

3. Expressionsanalyse des Prostatakarzinoms

Wir haben in Kooperation mit der Fa. metaGen Pharmaceuticals eine Studie zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene im Prostatakarzinom durchgeführt. Diese Studie unterscheidet sich im Studiendesign von den anderen, bislang publizierten Studien durch den durchgängigen Einsatz mikrodisszezierten Ausgangsmaterials und die Untersuchung von Tumor und Normalgewebe aller in die Studie eingeschlossenen Patienten. Es ist eine Besonderheit des Prostatakarzinoms, dass es zum einen histologisch oft sehr inhomogen ist, also sehr unterschiedlich differenzierte Tumoranteile direkt nebeneinander vorliegen können, und dass es zum anderen das tumorinfiltrierte Normalgewebe nicht zerstört, was oft zu einer Melange von Tumor- und Normalgewebe führt. Deshalb ist die Verwendung größerer Gewebeproben („bulk tissue“), die makroskopisch entweder dem Normalgewebe oder dem Tumor zugeordnet wurden, mit einem erheblichen Risiko der Verunreinigung bzw. der Inhomogenität der Tumordifferenzierung verbunden. Daher haben wir eine manuelle Mikrodissektion etabliert, die eine morphologische Kontrolle des zu untersuchenden Ausgangsmaterials erlaubt und das gewünschte Kompartiment entsprechend anreichert. Der paarweise Vergleich von Tumor- und Normalgewebe desselben Patienten sollte konzeptionell verhindern, dass etwa durch interindividuelle Unterschiede pseudo-differenzielle Gene identifiziert würden.

Als Array kam der von der Fa. metaGen konstruierte Affymetrix geneChip metg001A zum Einsatz, der insgesamt 3,023 unterschiedliche Gene repräsentierte (Abb. 1, links). Circa 1000 dieser Gene sind bekannte Tumorsuppressorgene, Onkogene und andere tumorassoziierte Gene verschiedener Signaltransduktionswege wie beispielsweise TGF- β , RAS und WNT (Abb.1, rechts). Weitere 2000 Gene wurden zuvor *in silico*, d.h. bioinformatisch durch Analyse öffentlicher und kommerzieller Datenbanken (Schmitt *et al.*, 1999) als differenziell identifiziert.

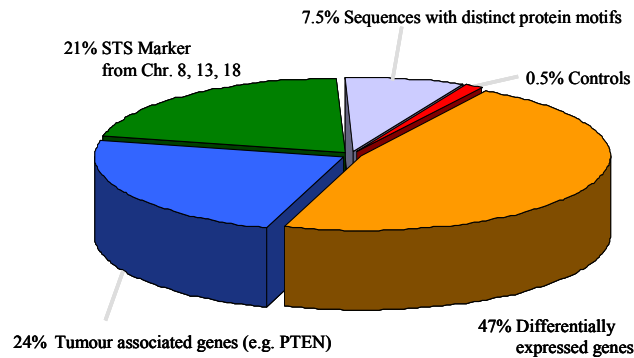


Abbildung 1. Links ein sog. Array der Firma Affymetrix (METG001A). Rechts eine graphische Darstellung der Genzusammensetzung dieses Arrays (Quelle: metaGen Pharmaceuticals).

Es wurden 42 Prostataktomiepräparate, die im Institut für Pathologie diagnostiziert wurden, in die Auswertung der Studie eingeschlossen. Von 84 Proben (1xTumor-, 1xNormalgewebe) wurden Expressionsprofile erstellt und differenziell exprimierte Gene mit unterschiedlichen bioinformatischen Methoden identifiziert. Je nach Methode fanden wir 188 (Methode Golub), 186 (Methode CFM) bzw. 177 (Methode CF2) differenziell exprimierte Gene. Ein Vergleich mit den veröffentlichten Datensätzen anderer, weniger aufwändiger Studien zeigte, dass 62% der von uns mittels Golub-Methode identifizierten Gene bereits von Anderen beschrieben worden waren, was wir als Bestätigung der Validität unserer Methode auffassen. Zusätzlich fanden wir 71 Gene (38%), die bisher nicht beschrieben wurden. Wir haben auf Proteinebene die drei Gene XAG2, CD166 und CD24 detailliert weiter untersucht. XAG2 ist ein kleines muzinähnliches Molekül, welches bislang in Becherzellen des Colons beschrieben war und sich in 89% der Prostatakarzinome fand und offenbar ohne prognostische Bedeutung ist. Eine umfassende Beschreibung dieser Studie findet sich in der Originalarbeit im Anhang 9.1.

4. Differenziell exprimierte Gene im Prostatakarzinom – CD166/ALCAM

CD166 (ALCAM/MEMD) ist bereits bei den Vor-Auswertungen der ersten Arrays von 10 Fällen als interessantes Kandidatengen aufgefallen. CD166 war gerade als möglicherweise metastasierungsassoziiertes Gen im malignen Melanom beschrieben worden (van Kempen et al. 2000). Außerdem war ein monoklonaler Antikörper, der allerdings nur an Gefrierschnitten erfolgreich eingesetzt werden konnte, kommerziell erhältlich. Immunhistologisch fanden wir eine herdförmig

erhöhte CD166 Expression im Prostatakarzinom im Vergleich zum Normalgewebe. In 19% der Fälle fand sich ein relativer CD166 Expressionsverlust, der signifikant häufiger in niedrig differenzierten Tumoren zu beobachten war. Eine detaillierte Beschreibung dieser Studie findet sich im Anhang 9.2 (Kristiansen *et al.*, 2003). Durch Einsatz eines neuen, paraffingängigen CD166 Antikörpers an Archivmaterial konnten wir diese Daten bestätigen. Zusätzlich zeigte sich jedoch, dass Patienten, deren Prostatakarzinome eine starke zytoplasmatische CD166 Färbequalität aufwiesen, mit kürzeren progressionsfreien Überlebenszeiten vergesellschaftet waren. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass neben der Überexpression eines Gens auch das Verteilungsmuster seines Produktes biologisch relevant ist.

Am intensivsten haben wir CD24 untersucht. Auch dies ist ein Gen, welches bereits in den ersten Arrayanalysen aufgefallen war und ebenfalls tumorbiologisch interessant zu sein versprach. Die Arbeitsgruppe um Peter Altevogt in Heidelberg hatte seit Anfang der 90er Jahre funktionelle Aspekte dieses Molekül erforscht und hatte zeigen können, dass CD24 möglicherweise eine durch P-Selektin vermittelte pro-metastatische Funktion zukommt. In der folgenden Übersicht fasse ich den gegenwärtigen Wissensstand zu CD24, seiner Entdeckungsgeschichte, seiner Funktion und seiner Bedeutung in humanen Tumoren zusammen.

5. CD24 - tumorbiologische Aspekte eines Moleküls

Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde in der Maus ein hydrophobes Glycoprotein mit lipidartiger Struktur beschrieben, das über einen Glykosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker in die Zellmembran integriert ist. Wegen seiner Hitzebeständigkeit wurde es „heat-stable-antigen“ (HSA), oder, nach dem Antikörper, J11d/M1.69 genannt. HSA fand sich in der Maus in hämatopoetischen Zelllinien, vor allem in B-Lymphozyten, Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten, aber auch in Thymozyten. Seine zellreihenspezifische Expression machte HSA bei Immunologen zu einem beliebten Marker für B-Lymphozyten. 1990 wurde murines HSA (Kay *et al.*, 1990), bald darauf sein humanes Homolog CD24 (Kay *et al.*, 1991) kloniert. CD24 besteht aus 27 Aminosäuren, die über zahlreiche Bindungsstellen für N- und O-gebundene Glykosylierung verfügen. Im Vergleich zum murinen CD24/HSA finden sich im humanen CD24 zusätzliche Serin- und Threoninreste, die das Molekül muzinähnlicher machen, sowie weitere O-gebundene Glykosylierungsstellen in der N-terminalen Hälfte des Proteins (siehe Abbildung 2). Die Glykosylierung von CD24

ist in Abhängigkeit vom Zelltyp sehr unterschiedlich, was sich in stark variablem Molekulargewicht (35-70kD) widerspiegelt (Abb. 2). Das humane CD24 ist genomisch lokalisiert auf Chromosom 6q21 (Zarn *et al.*, 1995) und zeigt einen allelischen Polymorphismus (Valin-Alanin Austausch).

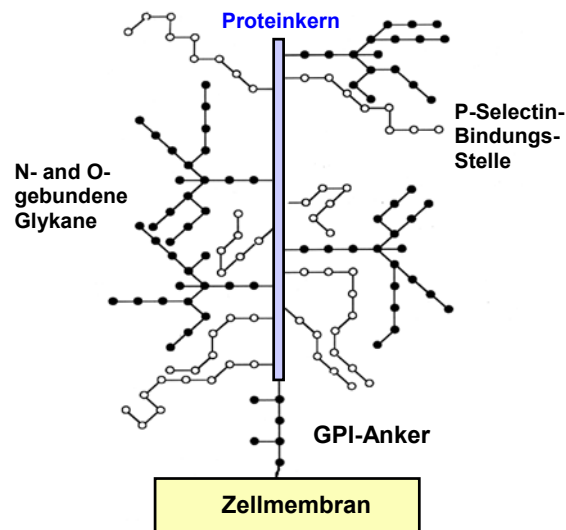


Abbildung 2. Schematische Darstellung des CD24 Moleküls. Zentral das über einen GPI-Anker an die Zellmembran gebundene Kernmolekül, welches über zahlreiche Glykosylierungsstellen verfügt (Quelle: Peter Altevogt in Kristiansen *et al.*, 2003 im Druck)

5.1 Funktion von CD24

Die Funktion von CD24 blieb lange unklar. CD24-Knockout-Mäuse oder chimerische Mäuse, die aus embryonalen Stammzellen mit CD24-doppel-Knockout gezüchtet wurden, waren empfindlicher als normale Mäuse und zeigten eine retardierte B-Zell-Reifung. Erythrozyten dieser Mäuse zeigten zusätzlich eine verkürzte Halbwertszeit, eine stärkere Verklumpungsneigung und lysierten schneller in hypotonen Lösungen (Nielsen *et al.*, 1997). Ektoper Expression von CD24 in T-Lymphozyten verbesserte die Lymphozytenstimulierbarkeit in der sekundären Immunantwort. Möglicherweise ist eine CD24 Expression mit Proliferation und Überleben von B- und T-Lymphozytenvorläuferzellen assoziiert. CD24 Antikörper induzierten Apoptose in murinen B-Zellvorläuferzellen und unterdrückten eine anti-CD40-induzierte Proliferation reifer ruhender B-Lymphozyten (Chappel *et al.*, 1996). Auch in humanen Burkitt-Lymphom-Zellen ist eine CD24 induzierte Apoptose beschrieben (Suzuki *et al.*, 2001). Darüberhinaus gibt es auch für T-Lymphozyten Indizien für eine CD24-abhängige Regulation der Proliferation: Eine klonale Vermehrung CD4-positiver Lymphozyten im Rahmen der Immunantwort erfordert

eine co-stimulatorische Aktivität auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle. Durch Transfektions- und Antikörperversuche wurde CD24 als wichtiges co-stimulatorisch wirkendes Molekül erkannt. Bislang ist der CD24-Ligand auf den T-Zellen allerdings noch nicht identifiziert (Liu *et al.*, 1992).

Der einzige bekannte CD24 Ligand ist P-Selektin. Unter physiologischen Bedingungen fand sich eine CD24 abhängige, durch CD24 Antikörper inhibierbare Adhäsion von Granulozyten oder Monozyten an aktivierten Endothelien und Thrombozyten, beides Zelltypen mit starker P-Selektin Expression (Aigner *et al.*, 1995). Dieser P-Selektin abhängige Mechanismus scheint bei Lymphozyten von untergeordneter Bedeutung zu sein, was möglicherweise in der zelltypspezifischen Glykosylierung des CD24 Moleküls begründet liegt.

5.2 Funktionen von CD24 in humanen Tumoren

Die CD24-P-Selektin Interaktion könnte eine wichtige Rolle in der hämatogen-metastatischen Tumorprogression spielen. Die Entwicklung hämatogener Tumormetastasen ist ein mehrschrittiger Prozess, der spezifische Fähigkeiten der Tumorzellen voraussetzt. Die Tumorzellen müssen fähig sein, den Zellverband des Primärtumors zu verlassen, in Gefäße einzubrechen, schließlich wieder an Endothelien der Zielorgane anzuhafte, um nach der Zellmigration durch Proliferation eine Metastase zu bilden. CD24-positive Tumorzellen könnten eine stärkere Neigung zu einer durch P-Selektin vermittelten Zelladhäsion, die der Invasion/Migration vorausgeht, besitzen. Es ist noch Gegenstand der Diskussion, ob auch die Bildung von Tumorthromben, d.h. die Anhaftung von Thrombozyten und Fibrin an freie Tumorzellen im Blutstrom, die Entstehung hämatogener Metastasen fördert. Diese Hypothese wurde durch Tierversuche untermauert, in denen Tiere mit P-Selektin Mangel oder aber verminderten Thrombozytenzahlen im peripheren Blut eine verminderte hämatogene Tumorzell dissemination aufwiesen (Kim *et al.*, 1998). Eine vermehrte Bildung kleiner Tumorthromben durch Aggregation P-Selektin-positiver Thrombozyten an freie CD24-positive Tumorzellen ist wahrscheinlich: Es ist für CD24-positive Tumorzellen bereits gezeigt worden, dass sie sowohl in einem statischen Modell, als auch unter physiologischen Flussbedingungen an aktivierten Thrombozyten und Endothelien anhaften können (Aigner *et al.*, 1997, 1998). Allerdings ist diese Anhaftung durch das Glykosylierungsmuster des CD24 Moleküls beeinflusst. Insbesondere das sialylLe^x-Epitop scheint hier von Bedeutung zu sein.

Diese Schlussfolgerung basiert auf Transfektionsexperimenten der Adenokarzinomzelllinie A125, die entweder mit CD24 und/oder Fucosyltransferase TVII cDNA transfiziert wurde. Allein die doppelt-transfizierte Zelllinie zeigte eine P-Selektin Adhäsion. Auch in einem Metastasierungsmodell der Maus zeigten nur die doppelt-transfizierten Tumorzellen, die ein sialylLe^x-modifiziertes CD24 Molekül exprimierten, eine pulmonale Anhaftung. Daß sich in Lipopolysaccharid (LPS)-vorbehandelten Mäusen eine weiterhin verstärkte pulmonale Anhaftung zeigte, die in P-Selektin-knockout-Mäusen nicht nachweisbar war, belegt weiterhin die P-Selektinabhängigkeit dieses Mechanismus. Die A125-FucTVII-transfizierte Zelllinie, die das sialylLe^x-Epitop, nicht jedoch CD24 exprimierte, zeigte keine P-Selektin-abhängige pulmonale Anhaftung (Friedrichs *et al.*, 2001). Das sialylLe^x-Epitop findet sich in einer Vielzahl humaner Karzinome und Korrelationen zwischen seiner Expression mit der Prognose des klinischen Verlaufes sind beschrieben (Konno *et al.*, 2002; Baldus *et al.*, 2000; Ura *et al.*, 1997; Jorgensen *et al.*, 1995). Diese Beobachtungen zeigen, dass sialylLe^x-modifiziertes CD24 eine wichtige Rolle bei der pulmonalen Metastasierung humaner Karzinome spielen könnte.

5.3 Expression von CD24 in humanen Tumoren

Tabelle 1 gibt einen chronologischen Überblick wichtiger Arbeiten über CD24 in hämatologischen und soliden Tumoren des Menschen.

Tabelle 1. Chronologische Übersicht über Studien, die eine CD24 Expression in humanen Tumoren beschreiben

Jahr	Tumor	Studientyp*	n	Referenz
1981	Akute Leukämie	IF		Abrahamson <i>et al.</i>
1983	Lymphoide Neoplasien	IH	70	Knowles <i>et al.</i>
1987	Lymphome des Waldeyer Rings	IH	23	Chan <i>et al.</i>
1987	Akute lymphatische Leukämie (cALL)	IF	100	Foa <i>et al.</i>
1988	Non Hodgkin Lymphom (NHL)	IH, IF	92	Schuurman <i>et al.</i>
1988	Myelom	Indirect immune rosetting, IF	43	Jackson <i>et al.</i>
1988	B-NHL, low grade	IF	48	Oertel <i>et al.</i>
1989	Haarzellenleukämie	IF	1	Fridrik <i>et al.</i>
1989	Klarzellensarkom	IH	1	Mechtersheimer <i>et al.</i>
1990	Nephroblastom	IH	12	Droz <i>et al.</i>
1990	Nierenzellkarzinom	IH	28	Droz <i>et al.</i>
1992	SCLC	Northern Blot, IF	8	Jackson <i>et al.</i>
1993	Neuroblastom, Ganglioneuroblastom	IH	9	Mechtersheimer <i>et al.</i>
1993	Sarkom des terminalen Ileums	IH	1	Kataoka <i>et al.</i>
1994	Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen der Lunge, Magen-, Colon-, Nierenzell-, und Chorionkarzinomen	IH	12	Akashi <i>et al.</i>
1995	Nasopharyngealkarzinom	Northern blot, IH	4	Karran <i>et al.</i>
1995	Hepatozelluläres Karzinom	Differential Display, Northern Blot	91	Jackson <i>et al.</i>
1996	Neurale Tumoren	IH	50	Poncet <i>et al.</i>
1999	Urothelkarzinom der Harnblase	SSH	2	Gromova <i>et al.</i>
1999	Mammakarzinomzelllinien	SSH/ cDNA Array	4	Yang <i>et al.</i>
1999	Gliom	Mouse model	1	Senner <i>et al.</i>
1999	Mammakarzinom	IH	29	Fogel <i>et al.</i>
2000	Mesoblastisches Nephrom des Erwachsenen	IH	1	Daniel <i>et al.</i>
2001	Ovarialkarzinom	cDNA Array	27	Welsh <i>et al.</i>
2001	Kolorektales Karzinom	ISH	10	Nestl <i>et al.</i>
2002	Prostatakarzinom	IH	10	Liu <i>et al.</i>
2002	Mammakarzinomzelllinien	RT-PCR	25	Schindelmann <i>et al.</i>
2002	Ovarialkarzinom	IH	56	Kristiansen <i>et al.</i>
2003	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	IH	89	Kristiansen <i>et al.</i>
2003	Neuroendokrines Prostatakarzinom	IH	1	Clegg <i>et al.</i>
2003	Merkelzellkarzinom	IH	31	Deichmann <i>et al.</i>
2003	Mammakarzinom	RT-PCR	18	Sorbello <i>et al.</i>
2003	Prostatakarzinom	IH	102	Kristiansen <i>et al.</i>
2003	Mammakarzinom	IH	201	Kristiansen <i>et al.</i>

*Abkürzungen: IH-Immunhistochemie, IF- Immunfluoreszenz, SSH- Subtraktive Suppressive Hybridisierung

Es folgt eine nach Tumorentität geordnete Zusammenfassung wesentlicher Befunde dieser Studien einschließlich einer detaillierteren Beschreibung der eigenen

Arbeiten. 2001 kam ein paraffingängiger monoklonaler CD24 Antikörper auf den Markt (Ab-2, Klon 24C02, Neomarkers, Fremont, USA), der eine immunhistochemische Antigendetektion an paraffinisiertem Archivmaterial erlaubte. Retrospektive CD24-Proteinexpressionsstudien an klinisch durch Verlaufsdaten charakterisierten Tumorkollektiven wurden so erstmalig möglich. In der Folge haben wir die Tumorentitäten nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Ovar-, Mamma-, Prostata-, und Pankreaskarzinom auf ihre CD24 Expression hin untersucht und die Befunde mit klinikopathologischen Parametern einschließlich der Patientenüberlebenszeit korreliert.

5.4 Spezifität des Antikörpers Ab-2

Die Spezifität des CD24 Antikörpers haben wir in einer FACS-Analyse bestätigen können. Wir untersuchten die Reaktivität zweier CD24 Antikörper, des bereits etablierten ML-5 und des neueren Ab-2, an der Zelllinie A125 in nativer (CD24 negativ) und CD24 transfizierter Form (CD24 positiv). Wie Abbildung 3 zeigt, ließ sich unter Einsatz beider Antikörper ein stärkeres Signal der CD24 transfizierten Zelllinie (rechts) nachweisen, während die nicht-transfizierten Zelllinie (links) keine Immunreaktivität zeigte (Kristiansen *et al.*, 2003 im Druck). Der Antikörper Ab-2 ist im Gegensatz zum ML-5 paraffingängig und wurde daher von uns für die Immunhistochemie verwendet.

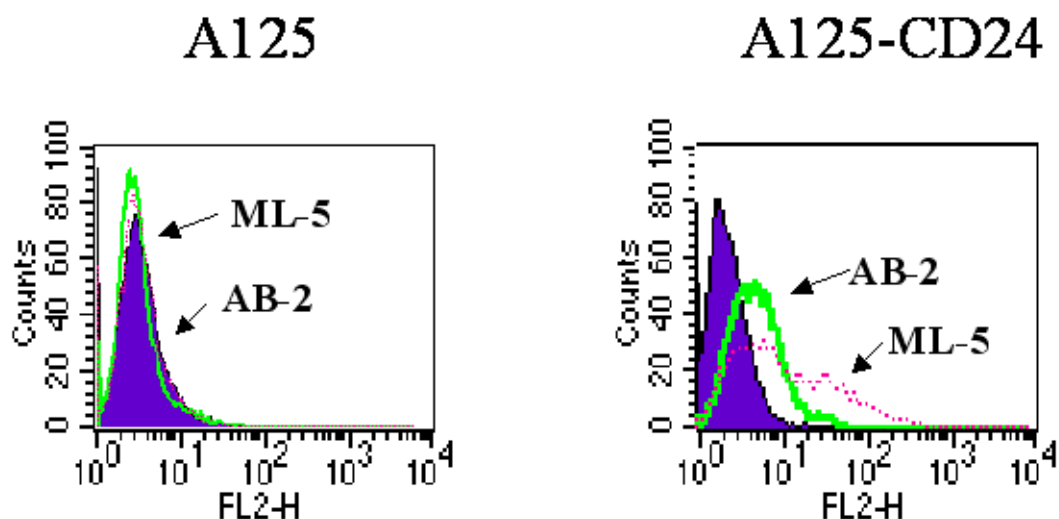


Abbildung 3. Links eine FACS Analyse der CD24-negativen Zelllinie A125 unter Verwendung der monoklonalen Antikörper ML-5 and Ab-2. Rechts eine entsprechende FACS Analyse der CD24 transfizierten Zelllinie CD24-A125

5.5 CD24 im Ovarialkarzinom

Welsh *et al.* (2001) fanden in einer vergleichenden Chip-basierten Expressionsstudie von 27 serös-papillären Adenokarzinomen des Ovars und drei normalen Ovarien CD24 mRNA in den Tumoren aufreguliert. Dies wurde mit quantitativen RT-PCR Untersuchungen bestätigt: In einem von dreien Tumoren war CD24 stark exprimiert.

Wir überprüften diese Ergebnisse auf Proteinebene anhand von Gewebeproben von 78 Patientinnen: Neun normale Ovarien, fünf Zystadenome, acht Borderline Tumoren und 56 invasive Karzinome (Histologie: 29 serös, 5 mucinös, 7 endometrioid, 2 klarzellig, 1 transitional, 12 undifferenziert. pT-Stadien: 11 pT1, 7 pT2, 38 pT3. FIGO-Stadien: 10 I, 6 II, 36 III, 4 IV. Silverberg-Grad: 11 G1, 23 G2, 22 G3) wurden immunhistochemisch auf ihre CD24 Expression hin untersucht und die Färbung semiquantitativ ausgewertet. Die Immunfärbungen ließen zwei unterschiedliche Lokalisationen erkennen, eine membranöse (Abb. 4, links), die für ein membrangebundenes Oberflächenmolekül zu erwarten war, und eine zusätzliche zytoplasmatische Immunreaktivität (Abb. 4, rechts):

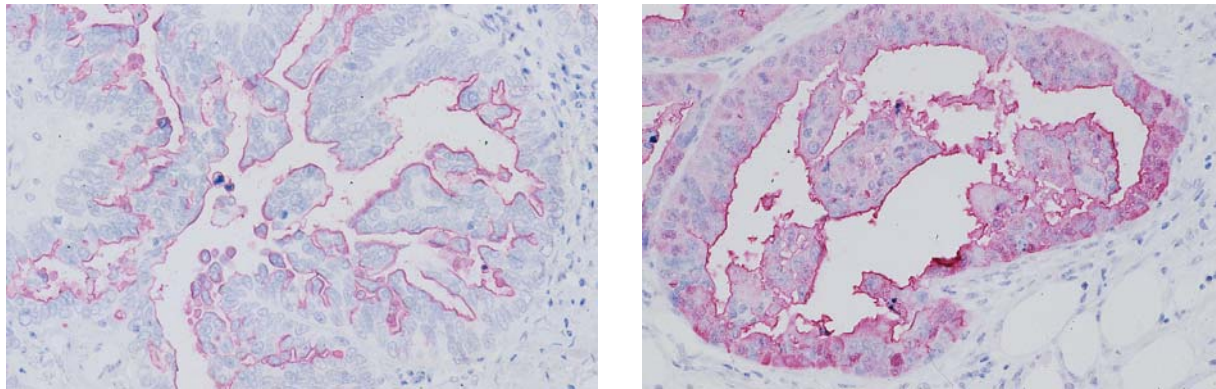


Abbildung 4. CD24 in Ovarialkarzinomen

Letztere sahen wir in 59% der Karzinome und in einem Borderlinetumor, nicht jedoch in normalen Ovarien oder in endosalpingealer Mucosa, welche eine starke, luminal membranöse Färbung aufwies. Eine membranöse Färbung sahen wir in 83% der invasiven Karzinome. Beide Färbequalitäten zeigten keine Korrelation mit dem Patientinnenalter, dem histologischen Subtyp, dem Tumorgrad, dem pT- oder FIGO-Stadium oder dem Nodalstatus. In der univariaten Analyse der Überlebenszeiten nach Kaplan Meier zeigten sich höhere Werte der zytoplasmatischen CD24 Expression als hochgradig prädiktiv für kürzere

Überlebenszeiten (Abb. 5, links: (durchschnittlich) 36,5 vs. 97,8 Monate; $p=0,0002$). Keine Unterschiede in der Überlebenszeit fanden sich in der Differenzierung des membranösen CD24 (Abb. 5, rechts)

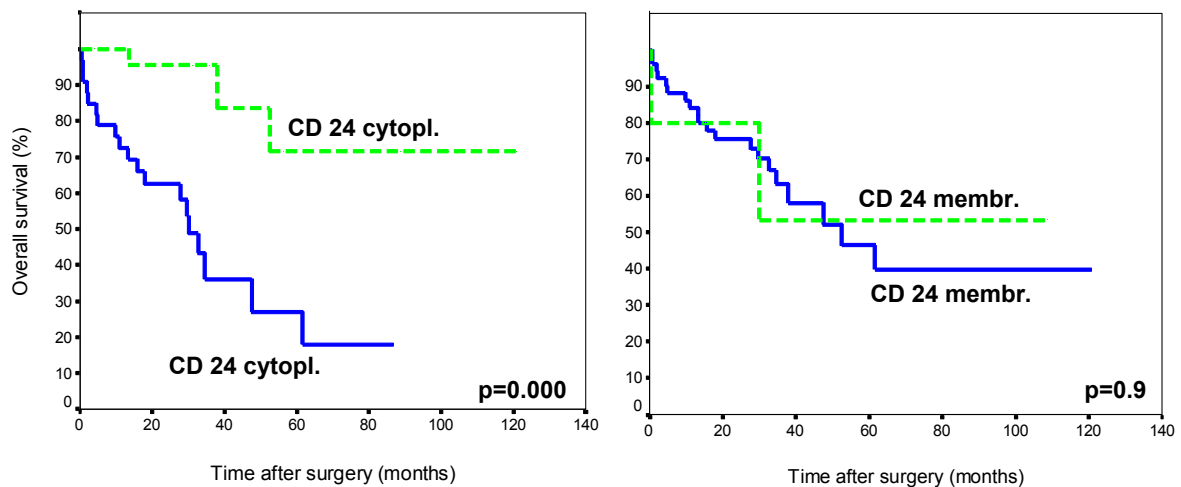


Abbildung 5. Kaplan Meier Kurven der Überlebenszeiten von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen, stratiziert nach CD24 Expression

In der multivariaten Analyse (Cox Regressionsmodell), in die alle Parameter eingeschlossen wurden, die sich in der univariaten Analyse als signifikant erwiesen hatten, verblieben allein das zytoplasmatische CD24 (Relatives Risiko (RR)=7,77; $p=0,001$) und das FIGO-Stadium ($p=0,002$) als unabhängige prognostische Parameter erhalten. Eine genaue Beschreibung dieser Studie findet sich im Anhang 9.3 (Kristiansen *et al.*, 2002).

5.6 CD24 im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom

Jackson *et al.* (1992) klonierten das cluster-w4-Antigen, welches in kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC) stark exprimiert ist. Sie fanden, dass die Sequenz bis auf einen einzelnen Valin-Alanin-Austausch mit CD24 identisch war. Sie beschrieben eine CD24 Expression in acht SCLC Zelllinien und auch in Zelllinien nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome (NSCLC).

Wir untersuchten die CD24 Protein Expression in NSCLC an einem sogenannten „Tissue Mikro Array“. Dies ist eine Zusammenstellung repräsentativer Tumorproben in Biopsiegröße, die in einen neuen Paraffinblock integriert wird. Dies ermöglicht die Untersuchung eines kompletten Tumorkollektives auf einem Schnitt in einem Arbeitsgang. Auf diesem Array waren 89 Tumoren auswertbar und einer weiteren Analyse zugänglich. Diese Fälle gliederten sich in 49 Adenokarzinome und

40 Plattenepithelkarzinome (pT-Stadium: 22 pT1, 57 pT2, 8 pT3, 2 pT4. Nodalstatus: 53 pN0, 12 pN1, 23 pN2. Grad: 3 G1, 44 G2, 42 G3). Um der kleinen Stanzgröße der Einzelproben Rechnung zu tragen, wurde nur die CD24 Gesamtfärbung, unabhängig von der Färbequalität (membranös/zytoplasmatisch), semiquantitativ ausgewertet. 45% der Tumoren hatten eine starke CD24 Expression, welche signifikant häufiger in Adenokarzinomen (Abb. 6, links) als in Plattenepithelkarzinomen (Abb. 6, rechts) beobachtet wurde.

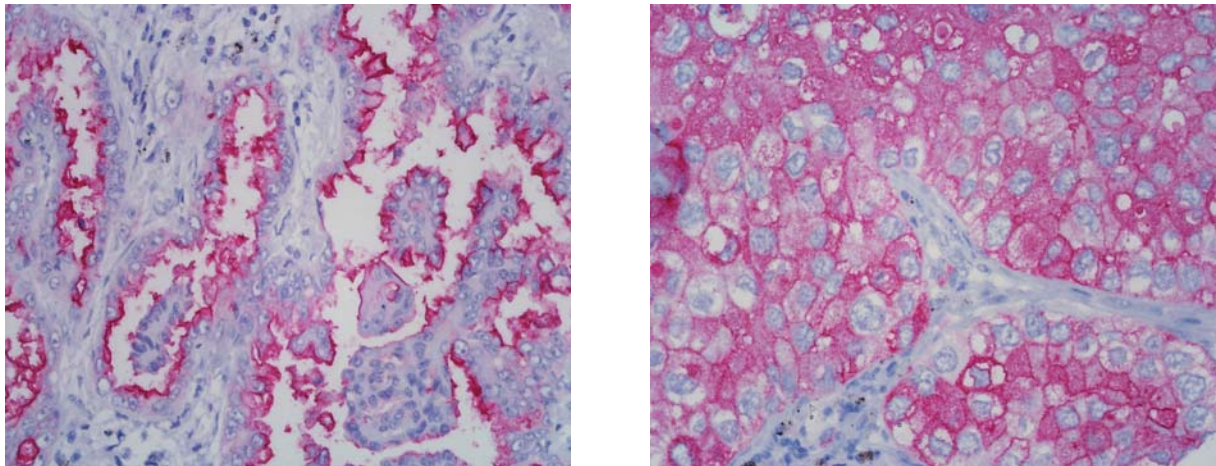


Abbildung 6. CD24 in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen

Hiervon abgesehen, fanden sich keine weiteren Korrelationen zu klinisch-pathologischen Parametern. In der univariaten Überlebensanalyse zeigte sich, dass Patienten, deren Tumoren CD24 stark exprimierten, signifikant früher (median 23 vs. 38 Monate, $p=0,03$; Abb. 7) starben.

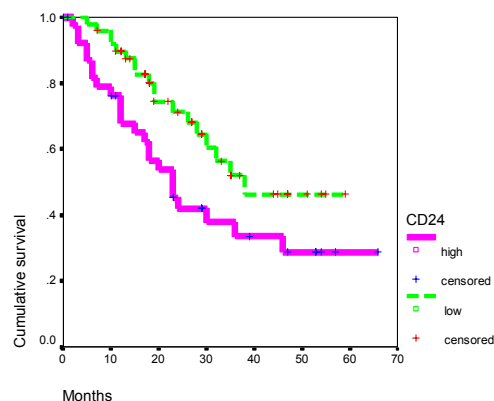


Abbildung 7. Kaplan Meier Kurve der Überlebenszeiten von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, stratifiziert nach CD24 Expression

Dies konnte in der Cox Regression bestätigt werden, in welcher sich das UICC-Stadium ($RR=2,4$; $p=0,006$) und eine starke CD24 Expression ($RR=2$;

p=0,024) als unabhängig signifikante Prognoseparameter erwiesen. Eine detailliertere Beschreibung dieser Studie findet sich im Anhang 9.4 (Kristiansen *et al.*, 2003).

5.7 CD24 im Prostatakarzinom

Der erste Bericht einer CD24 Expression im Prostatakarzinom stammte von Liu *et al.* (2001), die systematisch die Expression von CD-Markern in Prostatagewebe untersuchten. Clegg *et al.* (2003) beschrieben einen Fall eines CD24 positiven kleinzelligen neuroendokrinen Karzinoms der Prostata, welches eine seltene Entität ist.

In unserer Expressionsanalyse des Prostatakarzinoms fanden wir CD24 mRNA in 19% der Tumoren aufreguliert. Dies liegt etwas unterhalb der Raten, die wir durch Analyse der Expressionsdaten von Welsh *et al.* (33%) und Singh *et al.* (46%) fanden. Immunhistochemisch untersuchten wir 102 Adenokarzinome der Prostata (pT-Stadien: 7 pT2a, 52 pT2b, 28 pT3a, 11 pT3b, 4 pT4. Alle Fälle waren pN0. Tumorgrad: 1 G1b, 11 G2a, 42 G2b, 38 G3a, 4 G3b, 4 Fälle mit präoperativer Hormontherapie. Gleason Grad: 0 Gleason 2, 5 Gleason 3, 8 Gleason 4, 18 Gleason 5, 16 Gleason 6, 34 Gleason 7, 11 Gleason 8, 10 Gleason 9, 0 Gleason 10.) auf ihre CD24 Proteinexpression. In diesem Tumor fand sich, bei sehr heterogenem Verteilungsmuster der Immunreaktivität, in 48% der Fälle eine CD24 Positivität.

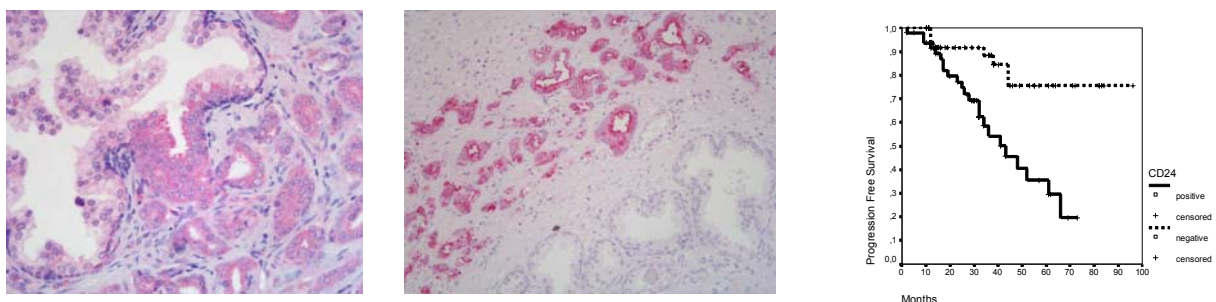


Abbildung 8. Links und Mitte: CD24 Expression in Prostatakarzinomen. Rechts: Kaplan Meier Kurve der Überlebenszeiten von Patienten mit Prostatakarzinomen, stratiziert nach CD24 Expression

Die Abbildung 8 links zeigt den Übergang normalen Epithels in eine Prostatiche Intraepitheliale Neoplasie (Bildmitte), die, wie das angrenzende Karzinom (rechte untere Ecke), CD24-positiv ist. Das mittlere Bild zeigt ein CD24-positives Adenokarzinom (oben), die hyperplastischen normalen Drüsen (unten) sind

CD24 negativ. Die Kaplan Meier Kurve (rechts) zeigt die unterschiedlichen PSA-Rezidivzeiten für CD24-positive (durchgezeichnete Kurve) und -negative (gepunktete Kurve) Adenokarzinome der Prostata.

Die CD24-Expression war signifikant mit jüngerem Patientenalter, höheren pT-Stadien (organüberschreitende Tumoren) und einer höheren 3-Jahresprogressionsrate von 47,7% im Vergleich zu 11,7% bei CD24-negativen Tumoren, assoziiert. Die Assoziation von CD24-Positivität mit früherer Tumorprogression war interessanterweise vor allem in kleinen, auf das Organ begrenzten oder gut bis mittelgradig differenzierten (Gleason 1-6, „low grade“) Karzinomen relevant. Im Cox Regressionsmodell konnten wir CD24 (RR=3,24; $p=0,005$), präoperatives PSA (RR=2,74; $p=0,011$) und das pT-Stadium (RR=2,73; $p=0,013$) als unabhängig signifikante Einflussgrößen auf ein PSA-Rezidiv bestätigen. Eine genauere Beschreibung dieser Studie findet sich im Anhang 9.5 (Kristiansen *et al.*, 2003 im Druck).

5.8 CD24 im Mammakarzinom

Yang *et al.* (1999) fanden eine CD24-Expression in den östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomzelllinien MCF7 und T47D durch einen cDNA Array basierten Transkriptvergleich und bestätigten diesen Befund auf Proteinebene. Sorbello *et al.* (2003) untersuchten 18 primäre, invasive Mammakarzinome (14 duktal, 4 lobulär) mittels quantitativer RT-PCR auf ihre Expression potentiell östrogenregulierter Gene. Die CD24 mRNA Mengen waren in der Gruppe der östrogenrezeptorpositiven Karzinome niedriger, was möglicherweise in Widerspruch zu Yang *et al.* als Repression von CD24 durch Östrogen interpretiert werden kann. Dieser Befund ist allerdings statistisch insignifikant ($p=0,2$) und bedarf weiterer Untersuchungen. Wichtiger scheint die signifikante Assoziation CD24-positiver Tumoren mit höheren pT-Stadien ($pT \geq 2$; $p=0,01$) zu sein. Fogel *et al.* (1999) demonstrierten in einer gefrierschnittbasierten immunhistologischen Studie (Antikörper ML-5, s.o.) eine starke CD24 Protein Expression in invasiven Mammakarzinomen. Sie fanden eine membranöse Immunreaktivität in benignen Gangstrukturen und ein zusätzliches zytoplasmatisches Signal in intraduktalen und invasiven Karzinomen. Dies deckt sich prinzipiell mit unseren Beobachtungen. Unsere Studie umfasste 201 Patientinnen mit primären invasiven Mammakarzinomen (Histologie: 81% duktal, 10% lobulär, 9% andere. pT Stadium: 127 pT1, 58 pT2, 7 pT3, 9 pT4. Nodalstatus: 3 pNx, 94 pN0, 86

pN1, 18 pN2. Grad: 47 G1, 104 G2, 50 G3. Östrogenrezeptor: 31% negativ, 69% positiv.) die zwischen 1992 und 1997 im Institut für Pathologie der Charité diagnostiziert worden waren. In normalem Mammaparenchym sahen wir eine membranöse CD24 Immunreaktivität, betont in atrophen oder zystisch dilatierten Gängen. In invasiven Karzinomen kam sowohl eine membranöse (Abb. 9, links) als auch eine zytoplasmatische (Abb. 9, rechts) Färbung zur Darstellung, zusammen in 85% der Fälle.

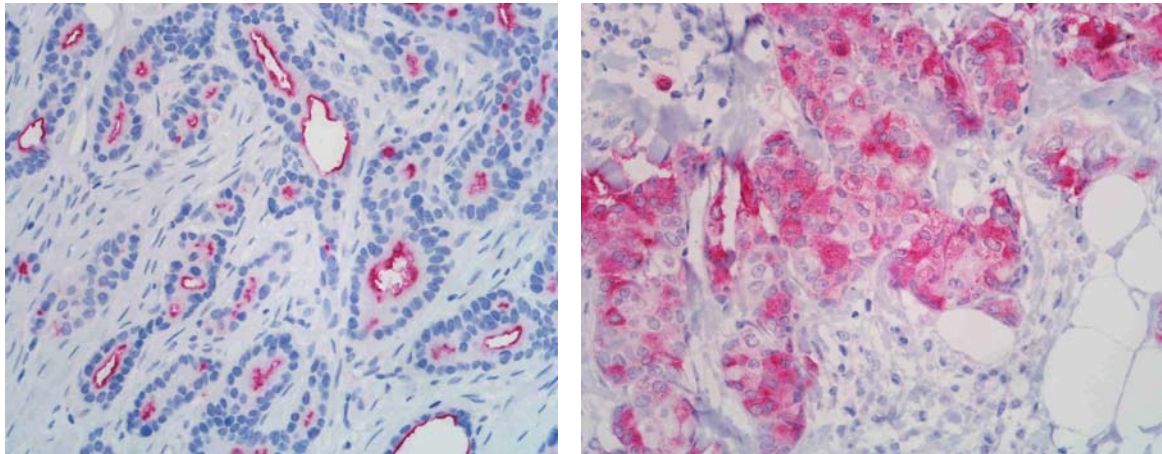


Abbildung 9. CD24 Expression in Mammakarzinomen

CD24-Positivität der Tumoren war signifikant mit einem positiven Nodalstatus assoziiert ($p=0,02$) und zeigte eine Trend zu höheren pT-Stadien ($p=0,1$). In der univariaten Überlebensanalyse nach Kaplan Meier waren CD24 positive Karzinome mit verkürztem progressionsfreiem Überleben assoziiert (5 Jahresprogressionsrate 40% vs. 11%; $p=0,004$; Abb. 10, rechts). Ein signifikant verkürztes Gesamtüberleben wiederum fand sich nicht (Abb. 10, links), was an der kurzen Nachbeobachtungszeit von (median) 5 Jahren liegen könnte.

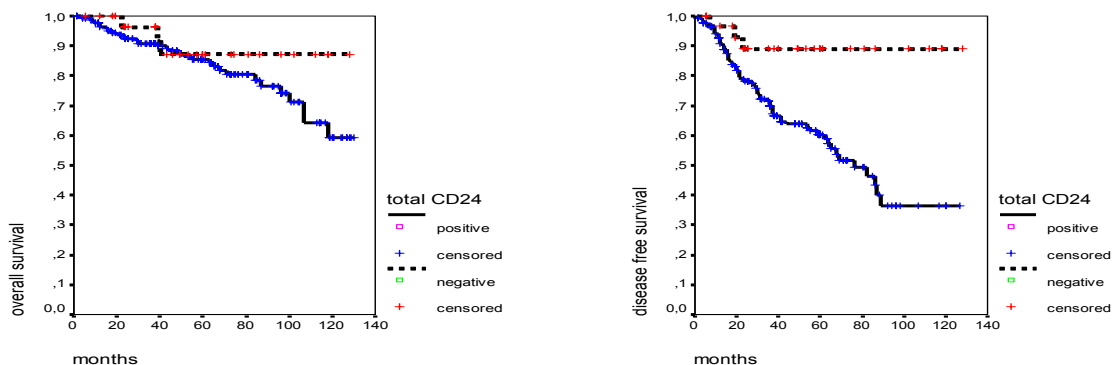


Abbildung 10. Kaplan Meier Kurven der Überlebenszeiten von Patientinnen mit Mammakarzinomen, stratifiziert nach CD24 Expression; links bezogen auf das Gesamtüberleben, rechts bezogen auf progressionsfreies Überleben

Auch im Mammakarzinom scheint der zytoplasmatischen Färbequalität die größere prognostische Bedeutung zuzukommen, da sie auch in der Analyse des Gesamtüberlebens Signifikanz erreichte. In das Cox-Regressionsmodell wurden das pT-Stadium, der Nodalstatus, der Tumorgrad und die (gesamt) CD24 Expression eingeschlossen. Der Nodalstatus, der Tumorgrad und CD24 Expression blieben als unabhängig signifikante Einflussparameter auf die progressionsfreie Überlebenszeit erhalten. Interessanterweise kam CD24 das höchste relative Risiko (3,8) für die Prädiktion einer Tumorprogression zu. Die gesamte Studie findet sich im Anhang 9.6 (Kristiansen et al., im Druck).

An dieser Stelle müssen zwei Studien erwähnt werden, die in Widerspruch zu der Annahme stehen, CD24 sei ein Marker für eine aggressivere Tumorbiologie. Schindelmann *et al.* untersuchten mRNA von 12 invasiven und 13 nicht-invasiven Mammazelllinien mittels cDNA Arrays zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene. Sie fanden CD24 in den invasiven Zelllinien auf mRNA-Ebene reduziert und bestätigten dies auch auf Proteinebene. Sie schlussfolgerten, dass ein Verlust von CD24 mit einem aggressiverem Mammakarzinomphänotyp assoziiert sei. Al-Haj *et al.* (2003) verwendeten ein Tumorprogressionsmodell, in dem humane Mammakarzinomzellen in immunkompromittierten Mäusen wuchsen. Die Autoren berichteten, dass nur eine kleine Minderheit von Mammakarzinomzellen, die sie „Brustkrebsstammzellen“ nannten, die Fähigkeit besaß, neue Tumoren zu initiieren. Überraschenderweise waren diese Zellen meistens CD44 positiv und (weitgehend) CD24 negativ. Angesichts der mittlerweile vorliegenden Evidenz der pro-metastatischen Fähigkeiten von CD24 sind diese Befunde überraschend und scheinbar widersprüchlich. Andererseits kann der Vorgang der Metastasierung, der die Zellvereinzelung, den Gefäßeinbruch, die Wiederanhaftung und die Migration der Tumorzellen umfasst, sehr wohl durch CD24 begünstigt werden, während das Wachstum eines neuen Tumors, welches Al-Haj *et al.* untersuchten, ein biologisch grundsätzlich anderer Prozess ist, der durch die Proliferationsrate, lokale Wachstumsfaktoren und die Fähigkeit Angiogenese zu induzieren, bestimmt wird.

5.9 CD24 im Pankreaskarzinom

Eine CD24 Expression in Adenokarzinomen des Pankreas ist bislang nicht beschrieben. In unserer Studie von 95 Fällen (pT Stadium: 4 pT1, 34 pT2, 53 pT3, 4 pT4. Nodalstatus: 3 pNx, 28 pN0, 62 pN1, 2 pN2. Grad: 10 G1, 50 G2, 35 G3.

Residualtumorklassifikation: 67 R0, 12 R1, 16 Rx) waren 68 Fälle (71.6%) CD24 positiv.

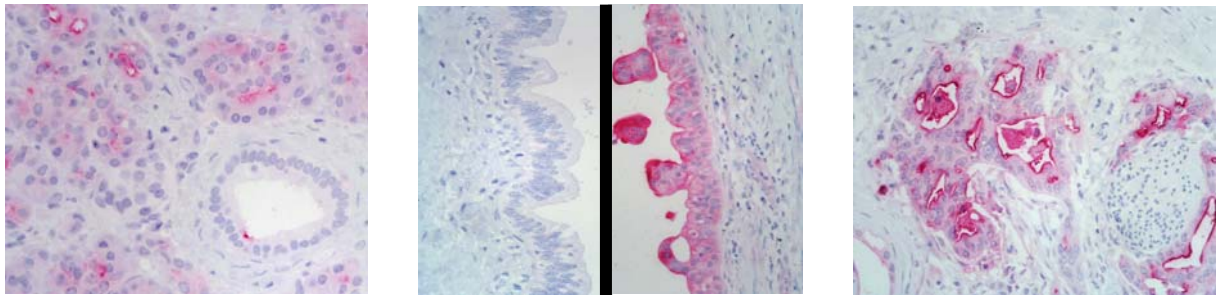


Abbildung 11. CD24 Expression in Pankreasgewebe und Pankreaskarzinomen.

Die Abbildung 11, links, zeigt normales exkretorisches Pankreasparenchym mit einer geringen CD24 Expression. Die Immunreaktivität fehlt in normalem duktalem Epithel (Abb. 11, links zentral und Mitte links). Dagegen ist atypisches duktales Epithel (Abb. 11, Mitte rechts) häufig CD24 positiv. Die Abb. 11 (rechts) zeigt ein CD24 positives Adenokarzinom des Pankreas mit einer Perineuralkarzinose.

Obwohl eine CD24 Positivität in Pankreaskarzinomen signifikant mit schlechterer Tumordifferenzierung korrelierte, fanden sich in univariaten Überlebensanalysen keine CD24 abhängigen Unterschiede der Überlebenszeiten. Dies konnte in umfangreich stratifizierten Analysen in Tumoruntergruppen, beispielsweise nodal-negativen oder gut differenzierten Adenokarzinomen, bestätigt werden. Details der Studie finden sich im Anhang 9.7 (Jacob *et al.*, 2003 eingereicht).

5.10 Hämatologische Tumoren

CD24 ist in Tumorzellen einer Vielzahl von B-Zelllymphomen und Leukämien exprimiert (für Übersichten siehe Abramson *et al.* 1981, Knowles *et al.*, 1983; Oertel *et al.*, 1988). Die B-ALL ist zumeist CD24 positiv, es sei denn, es liegt die Translokation t(4;11)(q21;q23) vor, deren Lymphoblasten CD24 negativ sind (Parkin *et al.*, 1982; Foa *et al.*, 1987). Lavabre-Bertrand *et al.* (1994) beschrieben CD24-Negativität als Prädiktor einer besseren Prognose bei ALL. Valet *et al.* (2003) fanden bei AML-Patienten CD24 innerhalb einer Gruppe von Genen, die mit einem höheren Risiko der Erkrankungsprogression behaftet waren.

5.11 Tumoren des Nervensystems

Poncet *et al.* (1996) untersuchten eine Reihe neuroepithelialer Tumoren (n=50) auf ihre CD24 Expression. Im normalen humanen Gehirn wurde CD24 an der Neuroblastenmembran und im Neuropil des sich entwickelnden Cortex beobachtet, nicht jedoch in einem reiferen Gehirn (Kind, 4 Jahre alt). Eine starke CD24 Expression fand sich in Medulloblastomen, zentralen Neurozytomen und undifferenzierten Neuroblastomen. Neurilemmome oder Tumoren, die sich von Arachnoidalzellen ableiteten, waren CD24 negativ. Senner *et al.* (1999) konstruierte einen Klon einer C6 Rattenglioblastomzelllinie mit einem tetrazyklinabhängigen CD24-Promoter, in welchem Tetrazyklin zu einer 20-fachen Abregulation der CD24 Expression führte. *In vitro* Migrationsassays zeigten keine Assoziation zwischen CD24 Expression und Zellmotilität. *In vivo* transplantierten sie den C6 Klon orthotop in das Striatum von Nacktmäusen und regulierten die CD24 Expression über Tetrazyklin im Trinkwasser. Drei Wochen später zeigten CD24 positive Tumoren eine diffuse Invasion der Tumorzellen in einem zehnmal größeren Areal des Gehirns als die CD24-supprimierten Tumoren.

5.12 Nierentumoren

Droz *et al.* (1990) beschrieben eine CD24 Expression in einer Serie von 12 Nephroblastomen und 28 Nierenzellkarzinomen. Durch eine Immunhistochemie an Gefrierschnitten zeigten sie in Nierenzellkarzinomen eine starke, vom histologischen Subtyp unabhängige, CD24 Färbung. Assoziationen mit klinisch-pathologischen Parametern wurden nicht untersucht. In normalem Nierengewebe fand sich CD24 allein im distalen Nephron, während das metanephrische Blastem während der Organogenese stark CD24 positiv war. Daher interpretierten sie CD24 als einen Ursprungsmarker primitiver Nierenzellen. Daniel *et al.* (2000) berichteten einen einzelnen Fall eines Mesoblastischen Nephroms mit Expression von CD24 und CD56 (NCAM), welches wiederum als Hinweis auf eine Ko-Expression von CD24 mit Markern neuroendokriner Differenzierung gelten kann.

5.13 Hepatozelluläres Karzinom

Huang *et al.* (1995) fanden CD24 mRNA wurde in 66% der Fälle (n=79), vor allem bei jüngeren Patienten. CD24 Expression war signifikant mit höheren Serumspiegeln von HBs-Ag ($p < 0,023$) und alpha-Fetoprotein ($p < 0,04$) sowie p53-

Mutationen korreliert. Keine Zusammenhänge zeigten sich mit der Tumorgröße, der Invasivität oder der Prognose des Patienten.

5.14 Andere Tumoren

CD24 Expression wurde bereits beschrieben in kleinen Serien bzw. Einzelberichten in Kolorektalen Karzinomen (Nestl *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2002), Nasopharyngealkarzinomen (Karran *et al.*, 1995), Urothelkarzinomen der Harnblase (Gromova *et al.*, 1999) und Merkelzellkarzinomen (Deichmann *et al.*, 2003).

6. Zusammenfassung und Ausblick

Nach mehr als 20 Jahren der CD24 Forschung kann dieses Molekül als ein Zelloberflächenmolekül welches sowohl Zelladhäsions- als auch Signaltransduktionseigenschaften besitzt, angesehen werden. Wie schon erläutert, ist P-Selektin der einzige bislang identifizierte Ligand. Da die CD24-P-Selektin-Interaktion jedoch vom Glykosylierungsmuster des CD24 Moleküls abhängig ist, ist es unwahrscheinlich, dass alle biologischen Eigenschaften, die CD24 zugeschrieben werden, über P-Selektin vermittelt werden. Auf der Zellmembran ist CD24 in sogenannten Lipid-Flöße (englisch: „lipid rafts“) lokalisiert. Dies sind kleine membranständige Mikrodomänen, die als Plattform für die Regulation für Zelladhäsion und Signaltransduktion dienen (Simons *et al.* 1997). Innerhalb dieser Domänen ist CD24 eng mit src-Kinasen, G-Proteinen und Kalziumkanälen assoziiert. Obwohl für eine Reihe GPI-verankerter Zelloberflächenmoleküle eine durch src-Kinasen vermittelte Signaltransduktion beschrieben ist (Jacobson *et al.* 1999), wurde eine CD24 spezifische Signalkaskade noch nicht identifiziert. Bei kleinzelligen Lungenkarzinomen ist eine Verbindung von CD24 und src-Kinasen bekannt und in Zellen einer pro-lymphoblastischen Leukämie induzierten CD24 Antikörper unterschiedliche Phosphorylierungsmuster zytoplasmatischer Proteine (Zarn *et al.*, 1996). Möglicherweise spielt die Assoziation von CD24 mit den Lipid-Flößen eine Rolle bei der CD24 abhängigen Modulation der Integrinaktivität. Auch ist denkbar, dass CD24 bei der Steuerung der Zusammensetzung der Lipid-Flöße eine Rolle spielt und somit an der Kontrolle wichtiger Signalwege in der Zelle beteiligt ist.

In Zusammenfassung eigener Arbeiten fand sich eine CD24 Protein Expression in einer Auswahl der häufigsten humanen Karzinome. Darüber hinaus waren, mit Ausnahme des Pankreaskarzinoms, CD24 Positivität oder eine stärkere CD24 Expression mit signifikant früherer Erkrankungsprogression bzw. kürzeren Überlebenszeiten assoziiert. Diese Daten passen zu *in vitro* Beobachtungen, die eine P-Selektin abhängige pro-metastatische Funktion von CD24 belegen und sind grundsätzlich geeignet, die Bedeutung von CD24 in der metastatischen Progression humaner Karzinome zu untermauern. Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass neben den Funktionen der Zelladhäsion weitere tumorrelevante Funktionen von CD24, wie etwa eine zusätzliche Rolle bei der Zellwachstumsregulation, zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden können.

Es ist zu erwarten, dass die Beschreibung von CD24 als Prognosemarker in humanen Tumoren neue diagnostische Möglichkeiten eröffnet, die in die klinische Risikostratifizierung zum Zwecke einer individualisierteren Therapieplanung, eingehen. Es bleibt ferner zu prüfen, ob CD24 eine geeignete Zielstruktur für neue, beispielsweise Antikörper-basierte Therapeutika ist.

Die in der vorliegenden Schrift zusammengefassten Arbeiten zeigen, dass Chip-basierte Expressionsprofile tumorrelevante Gene für die weitere Forschung identifizieren können. Allerdings sollte innerhalb der Listen differenziell exprimierter Gene eine hypothesenbasierte Auswahl getroffen werden. Sowohl ALCAM als auch CD24 gehörten beide nicht zu den am differenziellsten exprimierten Genen in unserer Expressionsstudie des Prostatakarzinoms, d.h., beide waren nur in einem Teil der Tumoren überexprimiert. Dennoch waren sie beide vielversprechende Kandidaten für eine weitere Untersuchung, da sie bereits in anderen Tumoren beschrieben worden waren, bzw. funktionelle Studien ihre Tumorrelevanz belegt hatten.

Ein weiterer Aspekt unserer Arbeiten ist die diagnostische Verwendung mehrerer molekularer bzw. immunhistochemischer Marker. Eine Kombination von ALCAM und CD24 erlaubte uns eine präzisere Prädiktion eines PSA-Rezidives, als es durch Einsatz der Einzelmarker möglich war (Anhang 9.1). Dies bedarf natürlich der weiteren Überprüfung, insbesondere bezüglich der Übertragbarkeit auf andere Tumorentitäten. Dennoch wird die Etablierung und Verifizierung derartiger, vorzugsweise immunhistochemischer Multiplexmarker mittelfristig ein wichtiges Arbeitsfeld des forschenden Pathologen sein. Eine Array-basierte Tumorcharakterisierung ist noch kostspielig und wird auch in naher Zukunft nur größeren Instituten zugänglich sein. Hingegen gehört selbst in kleineren Abteilungen die preiswertere Immunhistochemie zur Charakterisierung eines Tumors zum festen Bestand des diagnostischen Repertoires.

Literaturverzeichnis

Eigene Publikationen:

Chen Y, Knösel T, Kristiansen G, Pietas A, Garber ME, Matsushashi S, Ozaki I, Petersen I. Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis. J Pathol. 2003; 200:640-646.

Denkert C, Winzer KJ, Muller BM, Weichert W, Pest S, Kobel M, Kristiansen G, Reles A, Siegert A, Guski H, Hauptmann S. Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. Cancer. 2003; 97:2978-87.

Grützmann R, Foerder M, Alldinger I, Staub E, Brümmendorf T, Röpcke S, Li X, Kristiansen G, Jesnowski R, Sipos B, Löhr M, Lüttges J, Ockert D, Klöppel G, Saeger HD, Pilarsky C. Gene expression profiles of microdissected pancreatic ductal adenocarcinomas. Virchows Archiv 2003, im Druck.

J Elgeti U, Jung K, Lein M, Brux B, Sinha P, Rudolph B, Kristiansen G, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA. Komplex-gebundenes oder freies prostata-spezifisches Antigen: welche Komponente sollte zur Differenzierung zwischen benigner Prostatahyperplasie und Prostatakarzinom bestimmt werden? J Lab Med 1999; 23:645-53.

Jung K, Brux B, Lein M, Rudolph B, Kristiansen G, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA, Sinha P. Molecular forms of prostate-specific antigen in malignant and benign prostatic tissue: biochemical and diagnostic implications. Clin Chem. 2000; 46:47-54.

Jung K, Stephan C, Elgeti U, Lein M, Brux B, Kristiansen G, Rudolph B, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA, Sinha P. Molecular forms of prostate-specific antigen in serum with concentrations of total prostate-specific antigen <4 microg/L: are they useful tools for early detection and screening of prostate cancer? Int J Cancer. 2001; 93:759-65.

Jung M, Romer A, Keyszer G, Lein M, Kristiansen G, Schnorr D, Loening SA, Jung K. mRNA expression of the five membrane-type matrix metalloproteinases MT1-MT5 in human prostatic cell lines and their down-regulation in human malignant prostatic tissue. Prostate. 2003; 55:89-98.

Kristiansen G*, Denkert C*, Schluns K, Dahl E, Pilarsky C, Hauptmann S. CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. Am J Pathol. 2002; 161:1215-21.

Kristiansen G, Pilarsky C, Pervan J, Stürzebecher B, Stephan C, Jung K, Loening S, Rosenthal A, Dietel M. CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer. Prostate 2003, im Druck.

Kristiansen G*, Pilarsky C*, Wissmann C, Stephan C, Weissbach L, Loy V, Loening S, Dietel M, Rosenthal A. ALCAM/CD166 is up-regulated in low-grade prostate cancer and progressively lost in high-grade lesions. *Prostate*. 2003; 54:34-43.

Kristiansen G, M. Sammar M, Altevogt P. Tumour biology aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *Histochemical Journal* 2003, im Druck.

Kristiansen G, Schluns K, Yongwei Y, Denkert C, Dietel M, Petersen I. CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Br J Cancer*. 2003; 88:231-6.

Kristiansen G, Schluns K, Yongwei Y, Dietel M, Petersen I. CD10 expression in non-small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol*. 2002; 24:41-6.

Kristiansen G, Winzer, KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevogt P, Guski H, Dietel M. CD24 Expression is a New Prognostic Marker in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2003, im Druck.

Kristiansen G, Wunderlich W, Fischer F, Roehrig B, Arntz HR, Horstkotte D, Schultheiss HP: Accuracy and precision of the analytic calibration method in quantitative coronary angiography. *Comp Cardiol* 1996; 23:553-556.

Kristiansen G, Yu Y, Petersen S, Kaufmann O, Schluns K, Dietel M, Petersen I. Overexpression of c-erbB2 protein correlates with disease-stage and chromosomal gain at the c-erbB2 locus in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2001 ;37:1089-95.

Kristiansen G, Yu Y, Schluns K, Sers C, Dietel M, Petersen I. Expression of the cell adhesion molecule CD146/MCAM in non-small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol*. 2003; 25:77-81.

Lichtinghagen R, Musholt PB, Lein M, Romer A, Rudolph B, Kristiansen G, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *Eur Urol*. 2002; 42:398-406.

Lichtinghagen R, Musholt PB, Stephan C, Lein M, Kristiansen G, Hauptmann S, Rudolph B, Schnorr D, Loening SA, Jung K. mRNA expression profile of matrix metalloproteinases 1, 2, 7, 9, 11, 14 and the tissue inhibitors 1, 2, 3 in malignant and nonmalignant prostatic tissue. *Anticancer Res* 2003; 23:2617-24.

Magklara A, Scorilas A, Stephan C, Kristiansen GO, Hauptmann S, Jung K, Diamandis EP. Decreased concentrations of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in malignant versus nonmalignant prostatic tissue. *Urology*. 2000; 56:527-32.

Nakamura T, Scorilas A, Stephan C, Yousef GM, Kristiansen G, Jung K, Diamandis EP. Quantitative analysis of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) gene expression in human prostatic tissues. *Br J Cancer*. 2003; 88:1101-4.

Stephan C, Jung K, Cammann H, Vogel B, Brux B, Kristiansen G, Rudolph B, Hauptmann S, Lein M, Schnorr D, Sinha P, Loening SA. An artificial neural network considerably improves the diagnostic power of percent free prostate-specific antigen in prostate cancer diagnosis: results of a 5-year investigation. *Int J Cancer*. 2002; 99:466-73.

Stephan C, Vogel B, Cammann H, Lein M, Sinha P, Kristiansen G, Schnorr D, Jung K, Loening SA. Die Nutzung von artifiziellen neuronalen Netzwerken zur Risikoabschätzung eines Prostatakarzinoms: Biopsieindikationen im PSA-Bereich 2-20 µg/l. *Urologe A* 2003; im Druck.

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; 169:361-4.

Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, Kristiansen G, Hsieh JC, Ferdinand Hofstaedter F, Arndt Hartmann A, Ruth Knuchel R, André Rosenthal A, Pilarsky C. WIF1 a component of the Wnt-pathway is down-regulated in prostate, breast, lung and bladder cancer. *J Pathol* 2003; im Druck.

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; 56:287-92.

Zhang J, Jung K, Lein M, Kristiansen G, Rudolph B, Hauptmann S, Schnorr D, Loening SA, Lichtinghagen R. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human primary cultured prostatic cells and malignant prostate cell lines. *Prostate*. 2002; 50:38-45.

Zur Publikation eingereichte Manuskripte:

Jacob J, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G. CD24 Expression in Adenocarcinoma of the Pancreas. Eingereicht am 26.05.2003 an *Pancreatology*

Jung K, Stephan C, Lewandowski M, Klotzek S, Jung M, Kristiansen G, Schnorr D, Loening SA, Lein M. Increased free circulating DNA in plasma of patients with metastatic spread in prostate cancer. Eingereicht am 24.03.2003 an *Clinical Cancer Research*

Klopocki E, Kristiansen G, Klaman I, Castanos-Velez E, Stöhr R, Hartmann A, Wild PJ, Simon R, Sauters G, Leibiger H, Essers L, Weber B, Rosenthal A, Dahl E. Prognostic significance of SFRP1 in breast cancer. Eingereicht am 11.8.2003 an *American Journal of Pathology*

Pilarsky C*, Kristiansen G*, Wissmann C, Kaiser S, Bruemmendorf T, Roepcke S, Hoffmann P, Staub E, Dahl E, Hinzmann B, Specht T, Stephan C, Jung K, Loening S, Bellach J, Dietel M, Rosenthal A. Expression Profiling of Microdissected Matched

Prostate Cancer Samples Reveals CD166 and CD24 as New Prognostic Markers for Patient Survival. Eingereicht am 3.8.2003 an *Journal of Clinical Investigations*

Roemer A, Schwettmann L, Jung M, Roigas J, Kristiansen G, Schnorr D, Loening SA, Jung K, Lichtinghagen R. Increased mRNA expression of ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) in renal cell carcinoma: association with clinical outcome. Eingereicht am 12.7.2003 an *International Journal of Cancer*

Stephan C, Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Jung M, Kristiansen G, Hauptmann S, Kishi T, Nakamura T, Loening SA, Diamandis EP. Hepsin is highly overexpressed and is a new candidate prognostic indicator in prostate cancer. Eingereicht im September 2002 an *British Journal of Cancer*

Weichert W, Knösel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G. ALCAM/CD166 is expressed in Colorectal Carcinoma and correlates to shortened Patient Survival. Eingereicht am 4.4.2003 an *Americal Journal of Clinical Pathology*

* geteilte Erstautorenschaft

Fremdliteratur:

Abramson CS, Kersey JH, LeBien TW. A monoclonal antibody (BA-1) reactive with cells of human B lymphocyte lineage. *J Immunol.* 1981; 126:83-8.

Aigner S, Ruppert M, Hubbe M, Sammar M, Sthoeger Z, Butcher EC, Vestweber D, Altevogt P. Heat stable antigen (mouse CD24) supports myeloid cell binding to endothelial and platelet P-selectin. *Int Immunol.* 1995; 7:1557-1565.

Aigner S, Sthoeger ZM, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M, Zeller Y, Vestweber D, Stahel R, Sammar M, Altevogt P. CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* 1997; 89:3385-95.

Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, Lawrence MB, Friederichs J, Altevogt P, Ley K. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J.* 1998; 12:1241-1251.

Akashi T, Shirasawa T, Hirokawa K. Gene expression of CD24 core polypeptide molecule in normal rat tissues and human tumor cell lines. *Virchows Arch.* 1994; 425:399-406.

Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D, Levine AJ. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:6745-6750.

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2002.

Baldus SE, Zirbes TK, Monig SP, Engel S, Monaca E, Rafiqpoor K, Hanisch FG, Hanski C, Thiele J, Pichlmaier H, Dienes HP. Histopathological subtypes and prognosis of gastric cancer are correlated with the expression of mucin-associated sialylated antigens: Sialosyl-Lewis(a), Sialosyl-Lewis(x) and sialosyl-Tn. *Tumour Biol.* 1998; 19:445-53.

Chan JK, Ng CS, Lo ST. Immunohistological characterization of malignant lymphomas of the Waldeyer's ring other than the nasopharynx. *Histopathology* 1987; 11:885-99.

Chappel MS, Hough MR, Mittel A, Takei F, Kay R, Humphries RK. Cross-linking the murine heat-stable antigen induces apoptosis in B cell precursors and suppresses the anti-CD40-induced proliferation of mature resting B lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 184:1638-49.

Clegg N, Ferguson C, True LD, Arnold H, Moorman A, Quinn JE, Vessella RL, Nelson PS. Molecular characterization of prostatic small-cell neuroendocrine carcinoma. *Prostate.* 2003; 55:55-64.

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001; 412:822-826.

Daniel L, Lechevallier E, Bouvier C, Coulange C, Pellissier JF. Adult mesoblastic nephroma. *Pathol Res Pract*. 2000; 196:135-9.

Deichmann M, Kurzen H, Egner U, Altevogt P, Hartschuh W. Adhesion molecules CD171 (L1CAM) and CD24 are expressed by primary neuroendocrine carcinomas of the skin (Merkel cell carcinomas). *J Cutan Pathol*. 2003; 30:363-8.

Droz D, Rousseau-Merck MF, Jaubert F, Diebold N, Nezelof C, Adafer E, Mouly H. Cell differentiation in Wilms' tumor (nephroblastoma): an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1990; 21:536-44.

Droz D, Zachar D, Charbit L, Gogusev J, Chretein Y, Iris L. Expression of the human nephron differentiation molecules in renal cell carcinomas. *Am J Pathol*. 1990; 137:895-905.

Ernst T, Hergenbahn M, Kenzelmann M, Cohen CD, Bonrouhi M, Weninger A, Klaren R, Grone EF, Wiesel M, Gudemann C, et al. Decrease and gain of gene expression are equally discriminatory markers for prostate carcinoma: a gene expression analysis on total and microdissected prostate tissue. *Am J Pathol* 2002; 160:2169-2180.

Foa R, Migone N, Fierro MT, Basso G, Lusso P, Putti MC, Giubellino MC, Saitta M, Miniero R, Casorati G, et al. Genotypic characterization of common acute lymphoblastic leukemia may improve the phenotypic classification. *Exp Hematol*. 1987; 15:942-5.

Friederichs J, Zeller Y, Hafezi-Moghadam A, Grone HJ, Ley K, Altevogt P. The CD24/P-selectin binding pathway initiates lung arrest of human A125 adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60:6714-6722.

Fridrik MA, Wahl G, Herbing W, Schutzenberger W, Gastl G, Huber C, Kronke M, Hopfel I. Morphological and immunological changes of hairy cell leukemia during alpha-2-interferon therapy. *Blut*. 1989; 58:261-264.

Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna-Gengelbach M, van de Rijn M, Rosen GD, Perou CM, Whyte RI, Altman RB, Brown PO, Botstein D, Petersen I. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:13784-13789.

Gromova I, Gromov P, Celis JE. Identification of true differentially expressed mRNAs in a pair of human bladder transitional cell carcinomas using an improved differential display procedure. *Electrophoresis*. 1999; 20:241-248.

Henshall SM, Afar DE, Hiller J, Horvath LG, Quinn DI, Rasiah KK, Gish K, Willhite D, Kench JG, Gardiner-Garden M, et al. Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse. *Cancer Res* 2003; 63:4196-4203.

Huang LR, Hsu HC. Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: a potential early tumor marker gene correlates with p53 mutation and tumor differentiation. *Cancer Res.* 1995; 55:4717-21.

Jackson D, Waibel R, Weber E, Bell J, Stahel RA. CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B cells, is a major surface antigen on small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 1992; 52:5264-70.

Jackson N, Ling NR, Ball J, Bromidge E, Nathan PD, Franklin IM. An analysis of myeloma plasma cell phenotype using antibodies defined at the IIIrd International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Clin Exp Immunol.* 1988; 72:351-356.

Jacobson K, Dietrich C (1999) Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol.* 1999; 9:87-91.

Jorgensen T, Berner A, Kaalhus O, Tveter KJ, Danielsen HE, Bryne M. Up-regulation of the oligosaccharide sialyl LewisX: a new prognostic parameter in metastatic prostate cancer. *Cancer Res.* 1995; 55:1817-9.

Karran L, Jones M, Morley G, van Noorden S, Smith P, Lampert I, Griffin BE. Expression of a B-cell marker, CD24, on nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer.* 1995; 60:562-566.

Kataoka Y, Shimada H, Sugimoto T, Mine H, Hachitanda Y, Doi Y, Sawada T, Weeks DA. Congenital sarcoma in the terminal ileum histologically resembling clear cell sarcoma of the kidney: a case report with an immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 1993; 24:1026-30.

Kay R, Rosten PM, Humphries RK. CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J Immunol.* 1991; 147:1412-1416.

Kay R, Takei F, Humphries RK. Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J11d heat-stable antigens. *J Immunol.* 1990; 145:1952-1959.

Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:9325-9330.

Knowles DM 2nd, Dodson LD, Raab R, Mittler RS, Talle MA, Goldstein G. The application of monoclonal antibodies to the characterization and diagnosis of lymphoid neoplasms: a review of recent studies. *Diagn Immunol.* 1983; 1:142-149.

Konno A, Hoshino Y, Terashima S, Motoki R, Kawaguchi T. Carbohydrate expression profile of colorectal cancer cells is relevant to metastatic pattern and prognosis. *Clin Exp Metastasis.* 2002; 19:61-70.

Liu Y, Jones B, Aruffo A, Sullivan KM, Linsley PS, Janeway CA Jr. Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. *J Exp Med.* 1992; 175:437-445.

Luo J, Duggan DJ, Chen Y, Sauvageot J, Ewing CM, Bittner ML, Trent JM, Isaacs WB. Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res* 2001; 61:4683-4688.

Mechtersheimer G, Barth T, Ludwig R, Staudter M, Moller P. Differential expression of leukocyte differentiation antigens in small round blue cell sarcomas. *Cancer*. 1993; 71:237-248.

Mechtersheimer G, Tilgen W, Klar E, Moller P. Clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses: case presentation with special reference to immunohistochemical findings. *Hum Pathol*. 1989; 20:914-917.

Miura K, Bowman ED, Simon R, Peng AC, Robles AI, Jones RT, Katagiri T, He P, Mizukami H, Charboneau L, et al. Laser capture microdissection and microarray expression analysis of lung adenocarcinoma reveals tobacco smoking- and prognosis-related molecular profiles. *Cancer Res* 2002; 62:3244-3250.

Nestl A, Von Stein OD, Zatloukal K, Thies WG, Herrlich P, Hofmann M, Sleeman JP. Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer Res*. 2001; 61:1569-1577.

Nielsen PJ, Lorenz B, Muller AM, Wenger RH, Brombacher F, Simon M, von der Weid T, Langhorne WJ, Mossmann H, Kohler G. Altered erythrocytes and a leaky block in B-cell development in CD24/HSA-deficient mice. *Blood*. 1997; 89:1058-1067.

Oertel J, Oertel B, Kastner M, Lobeck H, Huhn D. The value of immunocytochemical staining of lymph node aspirates in diagnostic cytology. *Br J Haematol*. 1988; 70:307-316.

Pilarsky CP, Schmitt A, Dahl E, Rosenthal A. Microarrays – changes and challenges. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 1999; 1:727-736.

Poncet C, Frances V, Gristina R, Scheiner C, Pellissier JF, Figarella-Branger D. CD24, a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules is transiently expressed during the development of human central nervous system and is a marker of human neural cell lineage tumors. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1996; 91:400-408.

Sager R. Expression genetics in cancer: shifting the focus from DNA to RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:952-955.

Schuurman HJ, Huppel W, Verdonck LF, Van Baarlen J, Van Unnik JA. Immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphoma. Correlation with relapse-free survival. *Am J Pathol*. 1988; 131:102-111.

Schindelmann S, Windisch J, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H. Expression profiling of mammary carcinoma cell lines: correlation of in vitro invasiveness with expression of CD24. *Tumour Biol*. 2002; 23:139-145.

Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387:569-72.

Singh D, Febbo PG, Ross K, Jackson DG, Manola J, Ladd C, Tamayo P, Renshaw AA, D'Amico AV, Richie JP, Lander ES, Loda M, Kantoff PW, Golub TR, Sellers WR. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell*. 2002; 1:203-209.

Sorbello V, Fuso L, Sfiligoi C, Scafoglio C, Ponzzone R, Biglia N, Weisz A, Sismondi P, De Bortoli M. Quantitative real-time RT-PCR analysis of eight novel estrogen-regulated genes in breast cancer. *Int J Biol Markers*. 2003; 18:123-129.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:10869-10874.

Stamey TA, Warrington JA, Caldwell MC, Chen Z, Fan Z, Mahadevappa M, McNeal JE, Nolley R, Zhang Z. Molecular genetic profiling of Gleason grade 4/5 prostate cancers compared to benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2001; 166:2171-2177.

Suzuki T, Kiyokawa N, Taguchi T, Sekino T, Katagiri YU, Fujimoto J. CD24 induces apoptosis in human B cells via the glycolipid-enriched membrane domains/rafts-mediated signaling system. *J Immunol* 2001; 166:5567-5577.

Ura H, Denno R, Hirata K, Yamaguchi K, Yasoshima T, Shishido T. Close correlation between increased sialyl-Lewisx expression and metastasis in human gastric carcinoma. *World J Surg*. 1997; 21:773-776.

van Kempen LC, van den Oord JJ, van Muijen GN, Weidle UH, Bloemers HP, Swart GW. Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol* 2000; 156:769-774.

van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415:530-536.

Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Kern SG, Wang-Rodriguez J, Moskaluk CA, Frierson HF Jr, Hampton GM (2001) Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res*. 2001; 61:5974-5978.

Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapinoso LM, Kern SG, Behling CA, Monk BJ, Lockhart DJ, Burger RA, Hampton GM. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:1176-1181.

Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Kern SG, Wang-Rodriguez J, Moskaluk CA, Frierson HF Jr., Hampton GM. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61:5974-5978.

Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27:1517-1523.

Zarn JA, Zimmermann SM, Pass MK, Waibel R, Stahel RA. Association of CD24 with the kinase c-fgr in a small cell lung cancer cell line and with the kinase lyn in an erythroleukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 225:384-391.

Relevante Kongressbeiträge:

1. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Habedank S, Polzin E, Roepke S, Schmitt A, Loening S, Weissbach L, Loy V, Rosenthal A, Dietel M. Identification of Genes Downregulated in Prostatic Carcinogenesis using Chip Analysis of Microdissected Tissue. [Abstract: Proceedings of the AACR 2000, 41:4318]. 91nd annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Francisco, April 1-5, 2000. (Poster)
2. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Habedank S, Loy V, Weissbach L, Loening S, Rosenthal A, Dietel M. Identifizierung differentiell exprimierter Gene im Prostatakarzinom durch Chip-Hybridisierung und Mikrodissektion. [Abstract: Pathol. Res. Pract. 196(2000):2]. 84. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 7-10. Juni, Kiel. (Vortrag)
3. Kristiansen G, Kaufmann O, Petersen S, Dietel M, Petersen I. C-erbB2 Überexpression korreliert mit chromosomalen Gewinnen am c-erbB2-Locus (17q21) bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen. [Abstract: Pathol. Res. Pract. 196(2000):327]. 84. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 7-10. Juni, Kiel. (Vortrag).
4. Kristiansen G, Pilarsky C, Kaiser S, Wissmann C, Polzin E, Busse S, Stephan C, Jung K, Loening SA, Dietel M, Rosenthal A. Biphasic expression of ALCAM/CD166 in prostate cancer with progressive loss in high grade tumors [Abstract: Proceedings of the AACR 2001, 42:1890]. 92nd annual Meeting of the American Association for Cancer Research, New Orleans, March 24-28, 2001. (Poster).
5. Kristiansen G, Pilarsky C, Dahl E, Kaiser S, Wissmann C, Yu W, Loening S, Petersen I, Rosenthal A, Dietel M. Identification and Validation of Differentially Expressed Genes in Prostate Cancer. [Abstract: Virchows Archiv 439(3):O-85]. 18th European Congress of Pathology, 8-13 September, 2001, Berlin. (Vortrag/Poster).
6. Kristiansen G, Pilarsky C, Dahl E, Kaiser S, Wissmann C, Stephan C, Jung K, Loening S, Rosenthal A, Dietel M. Differentially Expressed Genes in Prostate Cancer: Identification, Validation and their Use in Clustering. [Abstract: Pathol. Res. Pract. 198(2002):316]. 86. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 3-6. April, Wien. (Vortrag).
7. Kristiansen G, Pilarsky C, Dahl E, Kaiser S, Wissman C, Stephan C, Jung K, Loening S, Dietel M, Rosenthal A. Identification and validation of differentially expressed genes in prostate cancer [Abstract: Proceedings of the AACR 2002, 43:2289]. 93nd Meeting of the American Association for Cancer Research, San Francisco, April 6-10, 2002. (Poster).
8. Kristiansen G, Winzer KJ, Denkert C, Mayordomo E, Jacob J, Pervan J, Stephan C, Jung K, Yongwei Y, Guski H, Petersen I, Hauptmann S, Dietel M. Expression of CD24 in Solid Tumours. [Abstract: Pathol. Res. Pract. 198(2003):316]. 87. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 11-14. Juni, Bamberg. (Poster).
9. Kristiansen G, Guski H, Dietel M, KJ Winzer. Prognosefaktoren für das Lokalrezidiv und die Erkrankungsprogression des Mammakarzinom. 23. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie. 19.-21. Juni 2003, München. (Vortrag).

DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. Dr. M. Dietel danke ich herzlich für die jahrelange Unterstützung und die Schaffung der exzellenten Arbeitsbedingungen im Institut für Pathologie, welche wissenschaftliche Tätigkeit außerordentlich fördern.

Weiterhin möchte ich meinen Vorgesetzten aus dem Institut, die mich im Rahmen der ärztlichen Weiterbildung betreuten, für ihre Unterstützung und ihr Verständnis danken. Insbesondere Frau Dr. B. Fleige, Frau Dr. B. Rudolph und Herr Prof. Dr. H. Guski haben durch ihre terminliche Flexibilität bei der Fallabnahme mir die für Forschungstätigkeit notwendigen Freiräume ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. S. Loening und seiner Abteilung danke ich sehr für die seit Jahren bestehende gute Kooperation, Prof. Dr. K. Jung für die zahlreichen Ratschläge bei der Publikation der Daten und die vielen Diskussionen.

Herrn Dr. K-J.Winzer vom Mammazentrum der Charité danke ich sehr für die rückhaltlose, aktive Unterstützung bei der Zusammenstellung des Mammakarzinomkollektivs, und die vielen fachlichen Diskussionen.

Den Kollegen bei der metaGen, insbesondere Christian Pilarsky und Edgar Dahl danke ich für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen Gespräche.

Besonderen Dank schulde ich Frau Britta Beyer und Frau Eva Polzin, die beide als Medizinisch-Technische Assistentinnen in meiner Arbeitsgruppe tätig sind, und an allen in der vorliegenden Schrift beschriebenen Projekten maßgeblich beteiligt waren. Eine absolut zuverlässige Arbeitsweise und ein guter Humor zeichnen sie aus.

Frau C. Scholz danke ich für die Unterstützung bei fotografischen Arbeiten.

Meinen Doktorantinnen Janja Pervan, Empar Mayordomo und Juliane Jacob danke ich für ihre engagierte Mitarbeit.

B. Röhrig (Trimbach) und J. Ackermann danke ich für manch inspirierende Diskussion.

Ich danke meiner Freundin Marie-Christin Koll, die in den letzten zwei Jahren einiges Verständnis aufbringen musste, für Ihre Geduld.

Besonderen Dank schulde ich meiner Tante Ilse.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

(gemäß Habilitationsordnung der Charité)

Hiermit erkläre ich, dass

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

Berlin, den 4.09.2003

Glen Kristiansen