

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität zu Lübeck
Direktorin: Prof. Dr. med. Verena Sailer

**Genexpressionsanalysen des ossär und pulmonal
metastasierten Prostatakarzinoms**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin –

Vorgelegt von
Katharina Wulf, geb. Hempel
aus Kiel

Lübeck 2026

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Verena Sailer
Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ingo Kausch-Blecken von Schmeling

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2026

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.02.2026

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

1.1 EINLEITUNG	1
1.2 ALLGEMEINE METHODIK	3
1.2.1 ETHIK.....	3
1.2.2 KOHORTE	3
1.2.3 mRNA-EXTRAKTION.....	4
1.2.4 GENEXPRESSIONSANALYSE	4
1.2.5 STATISTISCHE ANALYSEN	5
1.2.6 DATENPLATTFORM MACNP-L	5
1.2.7 LIQUID BIOPSY.....	5
1.2.8 ZELLKULTUREN.....	6
1.2.9 PROTEINISOLATION	6
1.2.10 WESTERN BLOT.....	6
1.2.11 siRNA-TRANSFEKTION	7
1.2.12 ZELL-APOPTOSE ANALYSE	7
1.2.13 ZELLPROLIFERATIONSANALYSE	7
1.2.14 ZELLMIGRATIONSANALYSE.....	7
1.3 DARSTELLUNG DER PUBLIKATIONEN	9
1.3.1 CRACKING IT - SUCCESSFUL mRNA EXTRACTION FOR DIGITAL GENE EXPRESSION ANALYSIS FROM DECALCIFIED, FORMALIN-FIXED AND PARAFFIN-EMBEDDED BONE TISSUE	9
1.3.2 THE GENE EXPRESSION LANDSCAPE OF PROSTATE CANCER BONE METASTASES REVEALS CLOSE INTERACTION WITH THE BONE MICROENVIRONMENT.....	12
1.3.3 CEACAM6 PROMOTES LUNG METASTASIS VIA ENHANCING PROLIFERATION, MIGRATION AND SUPPRESSING APOPTOSIS OF PROSTATE CANCER CELLS.....	16
1.3.4 COMPREHENSIVE TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF PROSTATE CANCER LUNG METASTASES	19
1.4 GESAMTKONKLUSION	25
1.5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	29
1.6 LITERATURANGABEN	30
1.7 DANKSAGUNG	33
2. LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
3. PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	34
4. VERZEICHNIS DER PUBLIKATIONEN	35
4.1 CRACKING IT – SUCCESSFUL mRNA EXTRACTION FOR DIGITAL GENE EXPRESSION ANALYSIS FROM DECALCIFIED, FORMALIN-FIXED AND PARAFFIN-EMBEDDED BONE TISSUE	35
4.2 THE GENE EXPRESSION LANDSCAPE OF PROSTATE CANCER BM REVEALS CLOSE INTERACTION WITH THE BONE MICROENVIRONMENT.....	35
4.3 CEACAM6 PROMOTES LUNG METASTASIS VIA ENHANCING PROLIFERATION, MIGRATION AND SUPPRESSING APOPTOSIS OF PROSTATE CANCER CELLS.....	36
4.4 COMPREHENSIVE TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF PROSTATE CANCER LUNG METASTASES	37

1.1 Einleitung

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Tumorerkrankung innerhalb der männlichen Bevölkerung Deutschlands (etwa 25 Prozent der jährlichen Krebsneudiagnosen) und nach dem Lungenkarzinom die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache (zwölf Prozent). Zahlen des Robert-Koch-Institutes zufolge wurden 2020 national etwa 65.820 Erstdiagnosen eines Prostatakarzinoms gestellt. (Koch-Institut, 2023)

Das Lebenszeitrisiko eines amerikanischen Mannes, ein Prostatakarzinom zu entwickeln, wird auf etwa zwölf Prozent geschätzt. (R. L. Siegel et al., 2022)

Die hohe Inzidenz des Prostatakarzinoms im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen sowie die aufgrund des demographischen Wandels und der steigenden Lebenserwartung, alternde Bevölkerung haben in den letzten 50 Jahren zu einem Anstieg der absoluten Anzahl der Todesfälle im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom um fast 100 Prozent geführt (von etwa 8000 p. a. auf etwa 15 000 p. a.). Obwohl sich die Prognose des einzelnen Patienten im gleichen Zeitraum erheblich verbessert hat, wird sich der Trend der steigenden absoluten Todeszahlen bedingt durch die epidemiologische Entwicklung voraussichtlich auch in Zukunft fortsetzen. (Robert Koch-Institut, 2016)

Der Großteil der Tumore (82 Prozent) wird aufgrund der häufig frühzeitigen Diagnosestellung in einem nicht-metastasierten Stadium (UICC I - III) diagnostiziert. Die betroffenen Patienten haben mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von nahezu 100 Prozent eine sehr gute Prognose. (Koch-Institut, 2023) In etwa 18 Prozent der Fälle wird die Erkrankung jedoch erst in einem fortgeschrittenen Stadium (UICC-Stadium IV) erkannt. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate der betroffenen Patienten ist dann auf etwa 54 Prozent reduziert. (Koch-Institut, 2023)

Die Metastasen des Prostatakarzinoms sind zu 84 Prozent im Knochen lokalisiert. Dieser ist damit der am häufigsten befallene Sekundärlokus des Prostatakarzinoms, gefolgt von den Lymphknoten. (Gandaglia et al., 2014) Den Knochenmetastasen kommt damit eine große quantitative Bedeutung zu, da sie den überwiegenden Anteil der Patienten mit metastasierter Erkrankung betreffen. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit ossär metastasiertem Prostatakarzinom ist mit etwa 34-39 Prozent gegenüber Patienten mit lokal begrenzter Tumorlast deutlich reduziert. (D. Liu et al., 2020) Darüber hinaus können mögliche Einschränkungen

der Lebensqualität durch Knochenschmerzen oder Frakturneigungen auftreten. (Coleman, 2001) Das Alter der Patienten hat keinen signifikanten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit einer ossären Metastasierung. Durch einen höheren Gleason-Score sowie ein fortgeschrittenes Tumorstadium erhöht sich das Risiko jedoch. (D. Liu et al., 2020)

Die Lunge ist das am häufigsten betroffene Organ viszeraler Metastasen des Prostatakarzinoms (64 Prozent der viszeralen Metastasen). (Cui et al., 2020) Eine pulmonale Metastasierung kann die Lebensqualität der Patienten durch Symptome wie Husten und Dyspnoe stark beeinträchtigen. Im Fall von Lungenmetastasen beträgt das mediane Überleben etwa 18 Monate. (van den Bergh et al., 2023) Damit ist die Prognose besser als bei viszeralen Fernmetastasen in Leber oder Gehirn (jeweils zehn Monate medianes Überleben), aber bedeutend schlechter als bei Tumoren im lokalisierten Stadium. Einfluss auf die Prognose des Patienten haben im Falle einer pulmonalen Metastasierung sowohl sein Alter als auch das Tumorstadium und der Gleason-Score, wobei höhere Werte jeweils als unabhängige Risikofaktoren für eine reduzierte Überlebenszeit gelten (Cui et al., 2020).

Die Therapie eines Prostatakarzinoms wird sowohl durch die individuellen Untersuchungsbefunde als auch durch die Präferenzen des Patienten bestimmt. Die Behandlungsoptionen umfassen neben radikaler Prostatektomie, Bestrahlungs- und Hormontherapien auch die aktive Überwachung. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe & AWMF, 2024) Die Herausforderung besteht darin, in dem meist frühen Diagnosestadium hochmaligne Tumoren mit Metastasierungstendenz von niedrigmalignen Tumoren zu unterscheiden, die während der natürlichen Lebenserwartung des Patienten asymptomatisch bleiben könnten. Das Ziel dabei ist es, auf der einen Seite einen potenziellen Progress der Erkrankung zu verhindern und auf der anderen Seite eine Übertherapie des Patienten mit resultierenden iatrogenen Einschränkungen der Lebensqualität zu vermeiden. Es existieren derzeit noch keine molekularen Biomarker, die standardmäßig zur Risikostratifizierung des jeweiligen Tumortyps verwendet werden und eine entsprechende Anpassung der Therapieempfehlungen ermöglichen. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe & AWMF, 2024; Eggener et al., 2020)

In anderen Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom ist die Testung des Tumorgewebes auf spezifische genomische Veränderungen wie den HER2/neu-

Status sowie den Östrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus bereits in den diagnostischen Standard integriert und beeinflusst maßgeblich die Wahl des Therapieregimes. (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), 2021)

Um molekulare Eigenschaften und biologische Prozesse, die zu einem aggressiveren Tumorphänotyp führen, zu identifizieren und im Optimalfall früh zu erkennen und entsprechend zu therapieren, ist ein umfassendes Verständnis der Eigenschaften des Tumorzellgenoms sowie des Tumormikromilieus notwendig. Durch die Verwendung von molekularen Analyseverfahren wie der Genexpressionsanalyse können potenzielle Biomarker identifiziert werden, die metastasierungsrelevante Eigenschaften von Tumorzellen beeinflussen. Dies könnte die Entwicklung entsprechender Therapeutika ermöglichen, um schließlich den Krankheitsverlauf und die Prognose der Patienten positiv zu beeinflussen.

1.2 Allgemeine Methodik

1.2.1 Ethik

Alle Studien, auf denen diese Arbeit basiert, wurden vom Ethikkomitee der Universität zu Lübeck geprüft und genehmigt (Projekt Code 18-053) und in Übereinstimmung mit den Forschungsregularien der Universität zu Lübeck durchgeführt.

1.2.2 Kohorte

Für die dieser Arbeit zugrunde liegenden Studien wurden Proben verschiedener Gewebe untersucht. Wir haben 28 FFPE-Blöcke mit dem Gewebe primärer Prostatakarzinome, 30 dFFPE-Blöcke mit Gewebeproben aus Knochenmetastasen und 29 FFPE-Blöcke mit Gewebeproben aus pulmonalen Metastasen, jeweils von Patienten mit primärem Prostatakarzinom, ausgewertet.

Als Kontrollen haben wir zudem jeweils 12 dFFPE-Blöcke mit Gewebe aus Multiplen Myelomen und physiologischem Knochengewebe genutzt.

Die Proben stammen aus den Archiven der Institute für Pathologie des Krankenhauses Göppingen, der Campi Kiel und Lübeck des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein sowie aus dem Archiv des Lungenforschungszentrums Borstel. Sämtliche Patientendaten wurden anonymisiert.

1.2.3 mRNA-Extraktion

Die Gewebeproben wurden in 8 µm dicken Schnitten auf Objektträgern aufgetragen. Ein HE-gefärbter Schnitt je Probe wurde histopathologisch von den Pathologinnen Prof. Dr. med. Verena Sailer und Dr. med. Anne Offermann ausgewertet und der tumorzellhaltige Bereich des jeweiligen Schnittes markiert.

Für die mRNA-Extraktion aus dem vorliegenden FFPE-Material haben wir dieses entparaffiniert und gezielt das tumorzellhaltige Material mit einem Skalpell von den Objektträgern gekratzt. Hieraus haben wir die RNA gemäß den Anweisungen des Herstellerprotokolls und mit Hilfe des *Maxwell 16® RSC* und dem *RSC RNA FFPE Kit AS1440 (Promega)* extrahiert.

Die Konzentration der gewonnenen und in 50 µl nukleasefreiem Wasser gelösten RNA haben wir unabhängig voneinander mithilfe des *NanoDrop®-Fluoreszenzspektrometers (Thermo Scientific)* sowie mithilfe des *Qubit™-Fluorometers (Invitrogen)* gemessen. Da wir keine Interobserver-Variabilität zwischen beiden Messmethoden feststellen konnten, haben wir die weiteren Messungen mit dem *Qubit™ 2.0-Fluorometer* durchgeführt.

Die Proben wurden bei –80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

1.2.4 Genexpressionsanalyse

Wir haben eine automatisierte Analyse der mRNA-Expressionslevel der verschiedenen Gewebearten mithilfe des *NanoString®-nCounter Systems* durchgeführt. Hierzu haben wir das 770 prostatakarzinomspezifische Gene umfassende *PanCancer Progression Panel* gewählt und je Probe 10-35 ng mRNA eingesetzt. Die Probenverarbeitung erfolgte vollautomatisiert und entsprechend den Verfahrensanweisungen des Herstellers. Die digitale Auswertung der Probenkassetten mit dem *nCounter® Sprint Profiler System* wurde an der medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt und die Daten in Form von Reporter-Code-Counts an uns übermittelt. Mithilfe der *NanoString nSolver™-Analysis-Software v4.0* konnten wir weitere Analysen dieser Werte sowie eine automatische Qualitätskontrolle durchführen. Dabei wurden Datensätze, die das System im Rahmen der Qualitätskontrolle als auffällig markiert hat, von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

1.2.5 Statistische Analysen

Die entstandenen Daten haben wir normalisiert, den log₂FC berechnet und den p-Wert bestimmt. Zum Vergleichen zweier Werte haben wir den zweiseitigen T-Test verwendet, zum Vergleichen mehrerer Datensätze die einfaktorielle Varianzanalyse mit dem Tukey-post-hoc-Test. So konnten wir die DEGs der Metastasenentitäten untereinander bzw. im Vergleich zu den Primärtumoren ermitteln. Dabei haben wir Unterschiede mit p-Werten kleiner als 0,05 und |log₂FC|-Werten größer als 1 als signifikant gewertet. Für die statistische Analyse haben wir *IBM SPSS Statics Version 2.0* verwendet.

1.2.6 Datenplattform MACNP-L

Für die resultierenden DEGs haben wir manuell annotierte Daten-Plattformen (MACNP bzw. MACNP-L) erstellt. Diese beinhalten Informationen zur molekularen Funktion, den beeinflussten biologischen Prozessen, der Proteinklasse und den Signalwegen der einzelnen Gene. Zudem sind Weblinks zu den *Pubmed*-Einträgen dieser Gene im Kontext des Prostatakarzinoms enthalten. Für das Erstellen dieser Daten-Plattformen wurden die digitalen Datenbanken *Metascape* (molekulare Funktion), *Panther* (biologischer Prozess), *Pfam Database* (Proteinklasse) und *Kegg* (Signalwege) genutzt.

Mithilfe von *String* haben wir zudem ein Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk erstellt, welches die Wechselwirkungen der DEGs untereinander darstellt. Die Knotenpunkt-Proteine haben wir unter Anwendung von *cytoHubba* identifiziert und entsprechend farblich hervorgehoben.

1.2.7 Liquid Biopsy

Die Liquid Biopsy haben wir mit dem *AdnaTest (Quiagen)* und jeweils 7-8 ml EDTA-Blut von Patienten mit ossär metastasiertem Prostatakarzinom durchgeführt. Wir haben den *AdnaTest ProstateCancerSelect* gemäß den Anweisungen des Herstellers und unter Verwendung antikörperkonjugierter magnetischer Beads durchgeführt, um die zirkulierenden Tumorzellen zu isolieren und anzureichern. Anschließend haben wir die mRNA dieser Zellen extrahiert und mittels *AdnaTest ProstateCancerDetect* sowie multiplex RT-PCR auf Prostatakarzinom-assoziierte Marker untersucht. Die Expressionsmuster der zirkulierenden Tumorzellen haben wir mit dem *Agilent®-Bioanalyzer* untersucht.

Zudem wurde die extrahierte mRNA mit dem *nCounter Sprint Profiler* wie oben beschrieben ausgewertet.

1.2.8 Zellkulturen

Für die Zellkulturexperimente haben wir humane PC-3- und LNCaP-Zelllinien genutzt. Zur Inkubation der Zellen haben wir dem entsprechenden Medium jeweils 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin zugesetzt (DMEM-Medium für PC-3-Zellen und RPMI-Medium für LNCaP-Zellen). Nach Erreichen einer Konfluenz der Zellen von ca. 80 % haben wir diese gewaschen, mit Trypsin von den Kulturplatten gelöst und erneut in das oben beschriebene Medium gegeben. Diese Zell-Medium-Suspension haben wir mit 800-1000 U/min bei Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert und den Überstand abgetragen. Das Pellet haben wir im jeweiligen Medium resuspendiert und im Anschluss die Zellkonzentrationen in den Suspensionen beider Zellreihen mittels *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) nach Verfahrensanleitung des Herstellerprotokolls gemessen.

Ein Mykoplasmen-Test zur Detektion möglicher Kontaminationen wurde durchgeführt.

1.2.9 Proteinisolation

Für die Proteinisolation haben wir die Zellen mit Trypsin aus den Kulturflaschen gelöst, zentrifugiert und die Pellets in warmem PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und schließlich mit kaltem PBS gewaschen und in RIPA-Puffer gelöst. Diese Suspension wurde auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Den Überstand haben wir zur weiteren Verwendung abpipettiert.

Den Protein-Assay haben wir mit dem *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* und nach den Angaben im Herstellerprotokoll in einer 96er Mikrotitrierplatte mit jeweils 9 µl RIPA-Puffer und 1 µl Protein-Extrakt durchgeführt.

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben konnten wir im Anschluss basierend auf der mit dem *TECAN Spark®-Mikroplatten Reader* gemessenen Absorption berechnen.

1.2.10 Western Blot

Für den Western Blot haben wir 30 µg reines Protein pro Lane verwendet. Die isolierten Proteine haben wir in 10-12 % SDS Polyacrylamid Gel separiert und im Anschluss auf eine Polyvinylidenfluorid Membran (45 µm Dicke) übertragen. Die Reaktion wurde mit TBS-T-Puffer geblockt und mit Anti-CEACAM6 in der

Verdünnung 1:1.000 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die überflüssigen Antikörper haben wir mit TBS-T-Puffer abgewaschen und anschließend einen Anti-Maus Antikörper in der Verdünnung 1:5000 als zweiten Antikörper zu den Membranen gegeben. Nach erneuter Inkubation haben wir die überschüssigen Antikörper abgewaschen und die Membranen mit ECL-Substrat zur Darstellung von spezifischen, immunreaktiven Signalen entwickelt.

Im Anschluss haben wir die Membranen gestripped und sind mit β -Actin in der Verdünnung 1:50.000 als Positiv-Kontrolle identisch zu oben beschriebenem Vorgehen verfahren.

1.2.11 siRNA-Transfektion

In beiden Zellreihen haben wir mittels CEACAM6-mRNA-spezifischer *Silencer® Select siRNA (Ambion®)* das CEACAM6-Gen inaktiviert. Als Negativkontrolle haben wir Scramble-siRNA genutzt.

Hierzu haben wir die Zellen mit 2 ml Medium, jeweils 100 nM siRNA, gelöst in je 300 μ l *Opti-MEM™-Medium (Thermo Scientific)*, sowie 5-7 μ l *Lipofectamine® 2000 (Thermo Scientific)* in 6er-Titrierplatten gegeben. Nach 5-6 Stunden Inkubationszeit wurde diese Medium-Mischung gegen frisches, zusatzfreies Medium ausgetauscht.

1.2.12 Zell-Apoptose Analyse

Für die Zell-Apoptose-Analyse haben wir das *Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit (BioVision)* entsprechend den Angaben im Herstellerprotokoll verwendet.

Die Absorptionen der Suspensionen haben wir im Anschluss bei 405 nm Wellenlänge im Mikroplatten-Reader gemessen.

1.2.13 Zellproliferationsanalyse

Die Zellproliferationsanalyse haben wir mit dem *CCK-8 Kit (GLPBIO)* nach den Angaben im Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Absorption der einzelnen Proben haben wir bei 450 nm Wellenlänge im Mikroplatten-Reader bestimmt.

1.2.14 Zellmigrationsanalyse

Die Zell-Migrationsanalyse haben wir anhand einer etablierten Methode durchgeführt. Dafür haben wir die Zellen in 6er Titrierplatten gegeben und bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 % die siRNA-Transfektion wie oben beschrieben durchgeführt. Nach einer 24-stündigen Hungerphase haben wir mit einer Pipettenspitze die Zellen in 3-4 Kratzern pro Vertiefung abgekratzt und 3-mal mit PBS gewaschen, um die abgelösten und toten Zellen zu entfernen. Unmittelbar

nach dem Waschen sowie nach weiteren 24 Stunden haben wir Lichtmikroskop-Aufnahmen gemacht, um die Breite der Pipettenkratzer im Verlauf zu beurteilen.

Für die Vorbereitung der Zellen haben wir serumfreies Wachstumsmedium genutzt, um die Proliferationsrate bereits im Vorfeld zu minimieren und so die Zellproliferation als Störfaktor für die Beurteilung der Migration zu reduzieren.

Den Anteil der Zellmigration haben wir folgendermaßen berechnet:

Zellmigrationsanteil

$$= \frac{(\text{Kratzerbreite nach 0 Stunden} - \text{Kratzerbreite nach 24 Stunden})}{\text{Kratzerbreite nach 0 Stunden}}$$

1.3 Darstellung der Publikationen

1.3.1 Cracking it - successful mRNA extraction for digital gene expression analysis from decalcified, formalin-fixed and paraffin-embedded bone tissue

Alireza Saraji, Anne Offermann, Janine Stegmann-Frehse, Katharina Hempel, Duan Kang, Rosemarie Krupar, Christian Watermann, Danny Jonigk, Mark Philipp Kühnel, Jutta Kirfel, Sven Perner, Verena Sailer

Hintergrund

Seit der Zulassung der PSA-Bestimmung im Serum als Früherkennungsparameter für das Prostatakarzinom 1986 durch die FDA hat sich die Prognose der betroffenen Männer aufgrund einer frühzeitigeren Diagnosestellung sowie stetig weiter entwickelter Behandlungsstrategien deutlich verbessert. Dennoch führten insbesondere Erkrankungen im metastasierten Stadium im Jahr 2019 zu mehr als 15.000 Sterbefällen in Deutschland. Das am häufigsten von metastatischer Aussaat des Prostatakarzinoms betroffene solide Gewebe ist der Knochen. Ossäre Metastasen können sowohl die Lebensdauer reduzieren als auch die Lebensqualität durch Symptome wie pathologische Frakturen und Schmerzen beeinträchtigen.

Angesichts der zunehmend individualisierten und präziseren Behandlungsstrategien von Tumorpatienten gewinnt auch die molekulare Untersuchung des Mikromilieus der ossären Metastasen an Bedeutung. In Relation zum Weichteilgewebe wurde der Knochen diesbezüglich in der Vergangenheit jedoch eher vernachlässigt. Dies ist vor allem auf die Dekalzifizierung der Gewebeproben mit EDTA oder Trichloressigsäure im Rahmen der histologischen Aufbereitung zurückzuführen. Bei diesem Prozess wird nicht nur die harte Gewebestruktur des Knochens aufgeweicht, sondern oft auch ein Großteil der enthaltenen RNA degradiert und das Gewebe damit für zukünftige molekulare Analysen unbrauchbar gemacht. Neben der Dekalzifizierung beeinflussen auch Faktoren wie die warme Ischämiezeit und die Dauer des Fixierungsprozesses die Qualität und Quantität der enthaltenen RNA.

Im Rahmen dieser Studie haben wir mit Hilfe der *NanoString® nSolver*-Technologie eine molekulare Genexpressionsanalyse der RNA durchgeführt, die wir im Vorfeld aus dFFPE-Material ossären Ursprungs extrahiert haben.

Material und Methoden

Für diese Studie haben wir 29 dFFPE-Blöcke mit Gewebe aus Knochenmetastasen bei primärem Prostatakarzinom sowie jeweils zwölf dFFPE-Blöcke mit Gewebe aus ossären Herden Multipler Myelome und mit physiologischem Knochengewebe genutzt. Alle Proben sind im Rahmen der Gewinnung und Fixierung mit EDTA dekalzifiziert worden und stammen aus dem Archiv des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck.

Aus diesen Gewebeproben haben wir die RNA extrahiert, deren Qualität und Quantität mit Hilfe des *NanoDrop®-Fluoreszenzspektrometers* sowie des *Qubit™-Fluorometers* bestimmt und eine Genexpressionsanalyse mittels *NanoString®-nCounter-System* inklusive automatisierter Qualitätskontrolle durchgeführt. Die statistischen Analysen sind erfolgt wie oben beschrieben.

Ergebnisse

Die RNA-Quantifizierung hat erwartungsgemäß eine signifikant höhere RNA-Konzentration in den Gewebeproben der Multiplen Myelome als in denen aus physiologischem Knochengewebe ergeben. Die Reinheit der eingesetzten und zuvor aus dFFPE-Material extrahierten RNA haben wir anhand der Absorptionsspektren der jeweiligen Proben berechnet. Nahezu 100 Prozent der Extrakte aus den Gewebeproben der Multiplen Myelome stellten sich hierbei als reine RNA heraus. Das aus den Gewebeproben des physiologischen Knochengewebes extrahierte Material bestand zu mehr als 60 Prozent aus reiner RNA. Um die Interobserver-Variabilität und damit die Reliabilität unserer Messergebnisse beurteilen zu können, haben wir die RNA-Konzentrationen der gleichen Proben wie oben beschrieben mit zwei verschiedenen Geräten quantifiziert. Die Messergebnisse beider Geräte wiesen keinen signifikanten Unterschied auf und ergaben für sämtliche eingesetzte Proben eine ausreichend hohe RNA-Konzentration (mind. 10 ng/µl), um eine *NanoString®*-Genexpressionsanalyse mit reliablen Ergebnissen durchführen zu können.

Die RNA-Konzentration der Gewebeproben aus den ossären Metastasen von Patienten mit primärem Prostatakarzinom haben wir mit dem *Qubit™ 2.0 Fluorometer* bestimmt. Auch hier ergab sich für alle Proben eine für die *NanoString®*-Genexpressionsanalyse ausreichende Qualität sowie Quantität der extrahierten RNA. Im Rahmen der Genexpressionsanalysen wurden automatische

Qualitätskontrollen des eingesetzten Materials durchgeführt. Den vom Hersteller angegebenen Grenzwert von 75 Prozent erfolgreich gescannter FOVs als Maß für eine optimale Quantität des eingesetzten Materials konnten sämtliche unserer Proben erreichen. Zudem fordert der Hersteller eine RNA-Kettenlänge von mehr als 300 Nukleotiden in mindestens 50 Prozent der Fälle als Qualitätskriterium des eingesetzten Materials. Auch dieses Kriterium konnte in nahezu allen unseren Proben erfüllt werden. Die systeminternen Qualitätskontrollen des *NanoString® nSolver* bestätigen damit die für weitere Analysen ausreichende Qualität und Quantität der von uns aus dFFPE-Material extrahierten RNA. Die Bindungsdichte der von uns eingesetzten Proben lag ebenfalls stets im Idealbereich, was als weiteres Qualitätsmerkmal zu werten ist.

Fazit

Wir konnten im Rahmen dieser Studie zeigen, dass die aus dFFPE-Gewebeblöcken ossären Ursprungs extrahierte RNA qualitativ sowie quantitativ zur Durchführung weiterer molekularer Analysen geeignet ist. Wir haben dabei Methoden verwendet, die routinemäßig in der Majorität der molekularanalytisch tätigen Labore praktikierbar sein sollten. Die Ergebnisse der systeminternen Qualitätskontrollen der *NanoString®-nSolver*-Software haben die ausreichende Qualität und Quantität der von uns extrahierten RNA bestätigt. Damit sind die erzielten Ergebnisse als reliabel einzustufen.

Zwar gibt es inzwischen schonende Methoden zur Durchführung von Knochenbiopsien, die eine spätere RNA-Extraktion durch Vermeidung von Dekalzifizierung ermöglichen und zudem ein geringes Risiko für die Patienten und Patientinnen darstellen. Dennoch ist die Verwendung von EDTA zur Dekalzifizierung von Gewebeproben ossären Ursprungs im Vorfeld der Fixierung nach wie vor der Standard in der histologischen Aufarbeitung. Zudem handelt es sich bei den ossären Archivbeständen vieler Krankenhäuser und Forschungseinrichtungen zum Großteil um dFFPE-Material. Die im Rahmen dieser Studie erzielten Ergebnisse eröffnen damit die Möglichkeit, die in Form von bereits archivierten dFFPE-Gewebeblöcken bestehenden Ressourcen zur Durchführung molekularer Analysen zu nutzen. Mit der hier dargestellten Methode können die molekularen Veränderungen im Knochen im Kontext diverser Erkrankungen genauer untersucht und neue therapeutische Ziele oder diagnostische Biomarker

identifiziert werden. Aufgrund des geringen Zeitraumes von sechs bis zehn Werktagen, der für die Arbeitsschritte von der operativen Gewebeentnahme bis zum Ergebnis der Genexpressionsanalyse benötigt wird, bietet das beschriebene Vorgehen auch neue Optionen zur individualisierten Therapieplanung oder zur Evaluation erzielter Therapieergebnisse von Patienten und Patientinnen mit malignen Knochenerkrankungen. Der mögliche Einsatzbereich der dargestellten Methodik betrifft somit sowohl den Bereich der Forschung als auch den der klinischen Patientenversorgung.

1.3.2 The gene expression landscape of prostate cancer bone metastases reveals close interaction with the bone microenvironment

Anne Offermann, Alireza Saraji, Kang Duan, Christian Watermann, Katharina Hempel, Marie C. Roesch, Rosemarie Krupar, Janine Stegmann-Frehse, Danny Jonigk, Mark Philipp Kühnel, Wolfgang Klapper, Axel S. Merseburger, Jutta Kirfel, Sven Perner, Verena Sailer

Hintergrund

Das Prostatakarzinom weist mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von mehr als 99 Prozent im lokal begrenzten Stadium eine der besten Prognosen unter den malignen Erkrankungen auf. Im Falle von Knochenmetastasen sinkt die Fünf-Jahres-Überlebensrate jedoch erheblich auf etwa 39 Prozent. Knochenmetastasen betreffen etwa 84 Prozent der Patienten mit fernmetastasiertem Prostatakarzinom. Diese Metastasen sind meist vom osteoblastischen Typ und treten vor allem im Becken und in der lumbalen Wirbelsäule auf, sodass Spinalkanalstenosen, Tumorschmerzen und pathologische Frakturen mögliche Komplikationen sind, die die Lebensqualität beeinträchtigen können.

Aktuelle Forschungen haben gezeigt, dass das Tumor-Mikromilieu einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung, Progredienz und Metastasierung maligner Erkrankungen hat. Dabei scheinen Tumor und Umgebung durch wechselseitige Kommunikation zu interagieren.

In dieser Studie haben wir eine Genexpressionsanalyse von Gewebeproben aus metastatischen Knochenläsionen bei primärem Prostatakarzinom durchgeführt und die Ergebnisse sowohl mit ossären Herden von Patienten mit Multiplem Myelom als auch mit Gewebeproben aus primären Prostatakarzinomen verglichen.

Material und Methoden

Für diese Studie haben wir 28 dFFPE-Blöcke mit Gewebe aus primären Prostatakarzinomen und 30 dFFPE-Blöcke mit Gewebe aus ossären Metastasen von Patienten mit primärem Prostatakarzinom genutzt. Die Proben stammen aus den Archiven der Institute für Pathologie des Krankenhauses Göppingen sowie der Campi Kiel und Lübeck des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein. Aus den Gewebeproben haben wir die RNA extrahiert und anhand dieser eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Wir haben die DEGs identifiziert und nach statistischer Validierung eine manuelle Annotation der herauf- und herunterregulierten Gene durchgeführt, um deren Funktion sowie die Protein-Protein-Interaktionen zu analysieren. Zusätzlich haben wir bei Patienten mit ossär metastasiertem Prostatakarzinom eine Liquid Biopsy durchgeführt.

Ergebnisse

In der Genexpressionsanalyse konnten wir insgesamt 116 Gene identifizieren, die in den ossären Metastasen im Vergleich zu primären Prostatakarzinomen signifikant abweichend exprimiert sind. Diese sind vollständig in der generierten MACNP enthalten. Die DEGs haben wir anhand eines hohen Fold-Change-Betrages sowie eines als signifikant einzustufenden p-Wertes identifiziert und sortiert. CD36, FOXC2, COL1A2, CHAD, SPP1, COL1A1, MMP9, IBSP, PTX3 und MMP13 konnten wir so als die zehn am stärksten hochregulierten Gene identifizieren. ACTG2, MYH11, MFAP4, ITGA8, CNN1, FGF2, ISL1, SFRP1, SPOCK3 und CHRDL1 hingegen zeigten sich in den Knochenmetastasen im Vergleich zu den Primärtumoren besonders stark herunterreguliert.

Um zu evaluieren, ob diese Ergebnisse auf die zirkulierenden Tumorzellen übertragbar sind, haben wir eine Liquid Biopsy anhand der Blutproben von 15 Patienten mit ossär metastasiertem Prostatakarzinom durchgeführt. In fünf der 15 Proben konnten wir zirkulierende Tumorzellen im Blut nachweisen. Wir haben die mRNA dieser Proben extrahiert und quantifiziert, die resultierende RNA-Konzentration war jedoch für eine *NanoString nSolver*[®]-Analyse zu gering.

Mit Hilfe von *Metascape* haben wir die funktionellen Eigenschaften der 20 am stärksten differenziell exprimierten Gene ausgewertet. Dabei stachen insbesondere die Organisation extrazellulärer Strukturen sowie die Beeinflussung der Angiogenese als häufig vertretene Eigenschaften heraus. Betrachtet man die

Gesamtheit der DEGs, wirken die meisten im Bereich der Zellmotilität, gefolgt von Zell-Adhäsionen und EZM-Proteoglykanen. Insbesondere die Gene COL3A1, COL1A1, FN1, CX3CL1, SFRP1, THY1, NRP1, SEMA3E, POSTN, GREM1 und ITGB3 sind mit metastasierungsrelevanten Fähigkeiten assoziiert.

Die Auswertung der Interaktionen zwischen den durch die DEGs kodierten Proteinen mit Hilfe von *String* ergab eine enge Interaktion von FN1, MMP9, COL1A1, COL1A2 und FGF2.

Fazit

Im Rahmen dieser Studie haben wir die Expression von 770 krebsspezifischen Genen in primären Prostatakarzinomen sowie in ossären Metastasen primärer Prostatakarzinome untersucht und verglichen. Der überwiegende Anteil der resultierenden DEGs ist mit zellulären Fähigkeiten assoziiert, die für die metastatische Aussaat maligner Tumoren relevant zu sein scheinen.

Unter den in den Knochenmetastasen im Vergleich zu den Primärtumoren am stärksten hochregulierten Genen befinden sich die für Kollagen kodierenden Gene COL1A1 und COL1A2. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass eine Überexpression von COL1A1 sowohl bei kolorektalen als auch bei Ovarialkarzinomen mit einer Progression und Metastasierung der Erkrankung assoziiert ist. Die Suppression dieses Gens dagegen reduzierte in Studien die Migrationsfähigkeit kolorektaler Tumorzellen. Darüber hinaus wird in der Literatur ein Zusammenhang zwischen der Überexpression beider Gene und der ossären Metastasierung eines primären Prostatakarzinoms beschrieben, was unsere Ergebnisse unterstützt. COL1A1 stellt somit ein potenzielles Therapieziel zur Verhinderung einer Progression oder Metastasierung maligner Erkrankungen dar.

In Übereinstimmung mit anderen Studien zeigten sich auch bei uns MMP9 und MMP13 in den Knochenmetastasen signifikant hochreguliert. MMP9 hat eine proteolytische Funktion und kann daher zur Degradation der EZM und der Basalmembranen sowie zum Gewebeumbau durch Aktivierung von TGF-beta beitragen. Über diese Funktion kann MMP9 eine Invasion von Tumorzellen in die Blutgefäße oder in andere Gewebestrukturen ermöglichen. Zudem erhöht MMP9 die Verfügbarkeit von VEGF und kann damit durch verbesserte Angiogenese zum Wachstum metastatischer Zellen im ossären Mikromilieu beitragen. Auch E-Cadherin, ein die Zelldifferenzierung kontrollierender Faktor, wird durch MMP9

degradiert. In der Literatur wird MMP9 auch in anderen Tumorentitäten wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom als prometastatischer Faktor beschrieben. Konträr dazu haben andere Forschungsgruppen eine schützende Funktion von MMP9 im Hinblick auf potenzielle Metastasierung nachgewiesen.

MMP13 wird laut aktueller Studienlage vor allem in geringgradig differenzierten und undifferenzierten Prostatakarzinomen überexprimiert. Zudem scheint es sich ebenfalls auf die Angiogenese auszuwirken. Für das Mammakarzinom wurde eine MMP13-vermittelte, beschleunigte Osteoklasten-Differenzierung sowie eine vermehrte Freisetzung von MMP9-Vorstufen aus den Osteoklasten beschrieben. Nach aktuellem Forschungsstand wirken MMP9 und MMP13 somit synergistisch und mehrheitlich prometastatisch.

Die Expression von CD36 erwies sich in unserer Analyse ebenfalls als stark erhöht. In Magen- und Ovarialkarzinomen sind erhöhte CD36-Expressionslevel negativ mit dem progressionsfreien Überleben sowie der Überlebensrate insgesamt korreliert. Zudem konnten in beiden Tumorentitäten mehr CD36-positive Zellen in metastatisch befallenem Gewebe als in den Primärtumoren nachgewiesen werden. Eine höhere Expression von CD36 scheint somit die metastatischen Fähigkeiten der Tumorzellen zu erhöhen. Umgekehrt führt eine CD36-Inaktivierung in Magenkarzinomzellen zu einer geringeren Metastasierungs- und Invasionsrate. Auch für das Zervixkarzinom gilt CD36 als ein die Invasivität und Metastasierung akzelerierender Faktor.

In der Literatur ist eine Korrelation zwischen einer Überexpression von FOXC2 und SPP1 mit beschleunigter Metastasierung maligner Erkrankungen bereits beschrieben und passt damit ebenfalls zu unseren Analyseergebnissen. Auch die Überexpression von PTX3, das bereits mit der pulmonalen Metastasierung des Mammakarzinoms in Verbindung gebracht wurde, gliedert sich hier ein.

Die bedeutendsten herunterregulierten Gene in unserer Studie waren MYH11, ITGA8 und SPOCK3.

MYH11 kodiert für eine schwere Kette des Myosin-Moleküls und ist damit für den Aufbau glatter Muskelzellen elementar. Andere Studien haben bereits einen kausalen Zusammenhang zwischen reduzierter MYH11-Expression und Ausbruch sowie schlechterer Prognose von Lungenkarzinomen beschrieben.

SPOCK3 zeigte sich in unserer Studie ebenfalls signifikant herunterreguliert. Die verringerte Expression korreliert nach Literaturlage mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben von Prostatakarzinompatienten.

Die Ergebnisse unserer Arbeit fügen sich insgesamt in die bestehende Studienlage ein. Sie bestätigen die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen und identifizieren neue Gene und Zusammenhänge, die als Grundlage für weitere Studien genutzt werden können.

1.3.3 CEACAM6 Promotes Lung Metastasis via Enhancing Proliferation, Migration and Suppressing Apoptosis of Prostate Cancer Cells

Alireza Saraji, Katharina Wulf, Janine Stegmann-Frehse, Duan Kang, Anne Offermann, Gevorg Shaghoyan, Danny Jonigk, Mark Philipp Kühnel, Sven Perner, Jutta Kirfel, Verena Sailer

Hintergrund

Prostatakarzinome werden seit der Einführung von Früherkennungsuntersuchungen in vielen Fällen in einem frühen Stadium diagnostiziert, was in der Regel zu einer guten Prognose führt. In etwa 18 Prozent der Fälle liegt jedoch bei der Erstdiagnose bereits eine metastasierte Erkrankung des UICC-Stadiums VI vor. Nach dem Knochen ist die Lunge der zweithäufigste Ort für metastatische Absiedlungen des Prostatakarzinoms. Pulmonale Metastasen führen zu einem deutlichen Anstieg der Morbidität und Mortalität sowie zu einer potenziell starken Beeinträchtigung der Lebensqualität durch Symptome wie Dyspnoe oder Husten.

Um die molekularen Prozesse, die zu einer Metastasierung des Prostatakarzinoms in die Lunge führen, besser verstehen zu können, haben wir eine Genexpressionsanalyse von Lungenmetastasen bei primärem Prostatakarzinom durchgeführt. Hier konnten wir insbesondere eine 8-fach höhere Expression des Zell-Adhäsionsmoleküls CEACAM6 im Vergleich zum primären Prostatakarzinom nachweisen. In anderen Tumorentitäten wie dem kolorektalen Karzinom gilt eine Überexpression von CEACAM6 bereits als ungünstiger prognostischer Parameter. Ursächlich scheint eine erhöhte Adhäsions- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen als Folge der CEACAM6-Überexpression zu sein.

Material und Methoden

Für diese Studie haben wir 28 FFPE-Blöcke von Patienten mit primärem Prostatakarzinom und 29 Blöcke von Patienten mit pulmonalen Metastasen genutzt, welche wir aus den Beständen des Institutes für Pathologie des UKSH Lübeck sowie des Lungenforschungszentrums Borstel gesammelt haben. Aus diesem Gewebe haben wir die RNA extrahiert und anhand derer eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Zur funktionellen Validierung unserer Ergebnisse haben wir Zellkulturen angelegt und an diesen eine Proteinisolierung sowie eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Wir haben zudem eine siRNA-vermittelte CEACAM6-Inaktivierung in unseren Zellen induziert und Proliferations-, Migrations- sowie Apoptose-Analysen angeschlossen.

Die statistische Auswertung ist wie oben beschrieben erfolgt.

Ergebnisse

Aus 24 von 29 FFPE-Blöcken der Lungenmetastasen konnten wir mRNA in ausreichender Qualität und Quantität extrahieren, um an ihnen die geplante Genexpressionsanalyse durchzuführen. Wir haben die Genexpression von primären Prostatakarzinomen als Referenz angenommen und konnten so 234 signifikant herauf- und 78 signifikant herunterregulierte Gene in den Lungenmetastasen finden. Nach der statistischen Analyse der Daten zeigte sich CEACAM6 als das in den Lungenmetastasen im Vergleich zu den primären Prostatakarzinomen am stärksten überexprimierte Gen.

Zur funktionellen Validierung der Auswirkungen einer CEACAM6-Überexpression auf die Metastasierungsprozesse von Prostatakarzinomzellen führten wir Zellreihenexperimente mit PC-3 und LNCaP-Zellen durch. In einem Teil der Zellen wurde die Expression von CEACAM6 durch siRNA-Transfektion inaktiviert (Erfolgsquote der Inaktivierung in PC3-Zellen 85 Prozent, in LNCaP-Zellen 60 Prozent).

Die verwendeten Zellen induzieren die Apoptose über die Kaspase-3-Kaskade. Um den Einfluss von CEACAM6 auf die Apoptosefähigkeit der Zellen zu untersuchen, führten wir daher 48 Stunden nach siRNA-vermittelter CEACAM6-Inaktivierung eine Analyse der Kaspase-3-Aktivität durch. Hier konnten wir eine signifikant erhöhte Kaspase-3-Aktivität und damit eine erhöhte Apoptoserate in den CEACAM6-inaktiven Zellen im Vergleich zu Zellen mit unveränderter CEACAM6-Expression

nachweisen. Die in den pulmonalen Metastasen nachgewiesene CEACAM6-Überexpression resultiert also in einer reduzierten Apoptoserate der Tumorzellen. Eine weitere wesentliche Rolle für den Metastasierungsprozess spielt die Fähigkeit zur raschen Zellproliferation. Wir haben daher die Auswirkungen der CEACAM6-Expression auf diese Zelleigenschaft mittels CCK8-Analyse untersucht. Auch hier zeigte sich, gemessen an den Kontrollzellen, eine deutliche Reduktion sowohl der Überlebens- als auch der Proliferationsfähigkeit von Zellen beider Zelllinien mit inaktivem CEACAM6-Gen. Übertragen auf die Tumorzellen bedeutet dies eine erhöhte Überlebens- und Proliferationsfähigkeit dieser Zellen infolge der CEACAM6-Überexpression.

Die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen ist für den Metastasierungsprozess ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Die Zellmigrationsanalyse nach CEACAM6-Inaktivierung ergab eine signifikant geringere Zellmigrationsrate in diesen Zellen verglichen mit den Kontrollzellen. Die Überexpression von CEACAM6 in den Tumorzellen führt folglich zu einer erhöhten Zellmigrationsrate.

Fazit

Die Fähigkeit von Tumorzellen zur Metastasierung wird im Wesentlichen durch drei Faktoren positiv beeinflusst: eine niedrige Apoptoserate, eine hohe Proliferationsrate und eine hohe Migrationsrate. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Faktoren aus einer erhöhten Expressionsrate von CEACAM6 in den Prostatakarzinomzellen folgen können.

Die Inaktivierung des CEACAM6-Gens in den Prostatakarzinomzellen führte insgesamt zu einem weniger aggressiven Tumorphänotyp. Nach unserem Kenntnisstand ist dies somit die erste Studie, die eine positive Korrelation zwischen CEACAM6-Expressionsrate und Aggressivität des Prostatakarzinoms sowie folglich ermöglichter pulmonaler Metastasierung beschreibt.

Unsere Ergebnisse gliedern sich damit in den aktuellen Forschungsstand ein, der ähnliche Funktionen einer CEACAM6-Überexpression in Lungen- und Mammakarzinomen sowie kolorektalen und hepatozellulären Karzinomen beschreibt. In seiner Funktion als Zelloberflächen-Antigen bietet CEACAM6 einen interessanten, potenziellen diagnostischen sowie therapeutischen Ansatzpunkt.

1.3.4 Comprehensive transcriptomic analysis of prostate cancer lung metastases

Alireza Saraji, Katharina Wulf*, Janine Stegmann-Frehse, Duan Kang, Anne Offermann, Danny Jonigk, Mark Philipp Kühnel, Jutta Kirfel, Sven Perner, Verena Sailer*

* geteilte Erstautorenschaft

Einleitung

Etwa neun Prozent der Patienten mit metastasiertem, kastrationsresistentem Prostatakarzinom sind von pulmonalen Metastasen betroffen. Aufgrund der hohen Krankheitsprävalenz ergeben sich daraus jedoch relevante absolute Patientenzahlen. Im Falle von Lungenmetastasen können zudem organspezifische Symptome und mögliche Komplikationen wie Husten, Dyspnoe und Pleuraergüsse auftreten und die Lebensqualität der Patienten erheblich beeinträchtigen. Die Etablierung spezifischer Biomarker, die eine pulmonale Metastasierung detektieren, sowie die Identifikation potenzieller therapeutischer Ziele sind daher wichtige Zielsetzungen, um die zukünftige Behandlung dieser Patienten zu verbessern. Gegebenenfalls könnten diese Erkenntnisse sogar als Grundlage für die Entwicklung präventiver Maßnahmen gegen eine Metastasierung genutzt werden. Als Grundlage für solche zukunftsweisenden Ansätze ist es notwendig, die molekularen Eigenschaften und genomischen Veränderungen zu identifizieren, die dem Metastasierungsprozess und der metastatischen Nische zugrunde liegen. Wir haben zu diesem Zweck eine Genexpressionsanalyse von Lungen- und Knochenmetastasen bei primärem Prostatakarzinom durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Diese Analyse hat spezifische Gene aufgezeigt, die insbesondere für die pulmonale Metastasierung des Prostatakarzinoms von Bedeutung zu sein scheinen.

Material und Methoden

Für diese Studie haben wir 30 dFFPE-Blöcke mit Gewebe aus ossären Metastasen sowie 29 FFPE-Blöcke mit Gewebe aus pulmonalen Metastasen von Patienten mit primärem Prostatakarzinom verwendet. Die Gewebeproben stammen aus dem Archiv des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und dem Archiv des Forschungszentrums Borstel. Von zwei Patienten waren sowohl Proben aus den pulmonalen Metastasen als auch Proben

aus dem Primärtumor verfügbar. Aus diesen Gewebeproben haben wir die RNA extrahiert und eine digitale Genexpressionsanalyse durchgeführt. Für die resultierenden DEGs haben wir eine Datenplattform erstellt und Protein-Interaktionen visuell dargestellt. Die statistische Analyse ist erfolgt wie oben beschrieben.

Ergebnisse

Die RNA-Quantifizierung hat für 24 der 29 Proben aus den pulmonalen Metastasen ausreichend hohe mRNA-Konzentrationen ergeben, um mit einer digitalen Genexpressionsanalyse reliable Ergebnisse erzielen zu können. Diese Analyse wurde mit Hilfe eines 770 Gene umfassenden Panels durchgeführt. Für die Auswertung und die Ermittlung der DEGs haben wir die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von Knochenmetastasen des primären Prostatakarzinoms als Referenzwerte herangezogen. Im Vergleich der pulmonalen mit den ossären Metastasen konnten wir insgesamt 309 DEGs identifizieren, von denen 209 in den Lungenmetastasen herauf- und 100 herunterreguliert waren. Die Gene mit den signifikantesten p-Werten in der Gruppe der in den pulmonalen Metastasen hochregulierten Gene waren HLA-DPB1, PTPRC, ITGB7, C3, CCL21, CCL5, ITGAM, SERPINA1, MFAP4 und ARAP2. Unter den Genen mit verringerter Expression wiesen FOXC2, TWIST1, CDK14, CHAD, IBSP, EPN3, VIT, HAPLN1, SLC44A4 und TBX1 die signifikantesten p-Werte auf. Die wesentlichen Eigenschaften dieser DEGs sind in der Datenplattform MACNP-L zusammengefasst.

In den Lungenmetastasen konnten wir eine signifikant geringere Expression von NCAM1 als in den Knochenmetastasen beobachten. Physiologischerweise wird NCAM1 von Osteoblasten exprimiert, die geringere Expression in der Lunge ist daher am ehesten auf die spezifischen Gewebeeigenschaften zurückzuführen. Dies hebt die Notwendigkeit der physiologischen und funktionellen Einordnung der ermittelten DEGs hervor, um eine differenzierte Ergebnisauswertung zu gewährleisten und Fehlinterpretationen zu vermeiden.

Im Vergleich zu den Knochenmetastasen haben wir in den Lungenmetastasen eine mehr als doppelt so hohe CD36-Expression festgestellt. CD36 wird

physiologischerweise auf Makrophagen, einschließlich Alveolarmakrophagen, und Endothelzellen exprimiert. Die erhöhte Expression in den pulmonalen Metastasen ist jedoch nicht ausschließlich durch die unterschiedlichen Gewebeeigenschaften von Knochen und Lunge zu erklären. Sie deutet vielmehr darauf hin, dass CD36-exprimierende Makrophagen möglicherweise eine wichtige Rolle für die Lunge als metastatische Nische des Prostatakarzinoms spielen.

Einige C-C-Chemokine, darunter CCL5, CCL7, CCL8 und CCL21, waren in den Lungenmetastasen ebenfalls signifikant hochreguliert. Sie sind unter anderem an der Chemotaxis von Monozyten sowie der Entwicklung von Tumor-assoziierten Makrophagen beteiligt. Das proinflammatorisch wirkende CCL5 trägt zur Zellmigration bei, einer wichtigen Voraussetzung für die Metastasierung maligner Erkrankungen. Zudem beeinflusst es wichtige intrazelluläre Signalkaskaden und konsekutiv die zelluläre Immunmodulation sowie Inflamationsprozesse. Die CCL5-Produktion wird durch das von Tumorzellen freigesetzte Laktat erhöht. CCL7 und CCL8 können über ihre Rezeptoren CCR1 und CCR2 die Tumorprogression sowohl beschleunigen als auch hemmen, wobei die tumorfördernden Effekte zu dominieren scheinen. Diese Chemokine tragen außerdem zur Invasivität und Migration von Tumorzellen sowie zur inflammatorischen Reaktion im Mikromilieu der Metastasen bei. Bisher war die Beteiligung von CCL7 und CCL8 an der pulmonalen Metastasierung des Prostatakarzinoms nicht beschrieben. CCL21 wirkt sich ebenfalls positiv auf die Fähigkeit der Prostatakarzinomzellen zur Migration aus und ist auch im Mikromilieu des primären Prostatakarzinoms zu finden.

Auch CCR2, ein Rezeptor für CCL2, CCL7, CCL8 und CCL21, war in den Lungenmetastasen überexprimiert.

Auch einige C-X-C-Chemokine waren in den Lungenmetastasen hochreguliert, insbesondere CXCL10, CXCL11 und CXCL13. Diese Moleküle beeinflussen die metastatische Nische durch die Rekrutierung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten und regulatorischen T-Zellen. CXCR3, ein Rezeptor für die Liganden CXCL10 und CXCL11, wies in den Lungenmetastasen im Vergleich zu den Knochenmetastasen ebenfalls eine signifikante Überexpression auf.

Im Gegensatz zu den hochregulierten Chemokinen zeigten sich FOXC2 und TWIST1, die die EMT beschleunigen, in den Lungenmetastasen herunterreguliert.

FOXC2 unterdrückt physiologischerweise die Transkription von E-Cadherin und erleichtert damit die EMT, was zu einem aggressiveren Tumorphänotyp führt.

Fazit

Um die Besonderheiten der Lunge als metastatische Nische des Prostatakarzinoms zu untersuchen, haben wir eine Genexpressionsanalyse an Gewebeproben pulmonaler Metastasen durchgeführt und die Ergebnisse mit den in unserer vorherigen Studie erhobenen Daten zur Genexpression in ossären Metastasen des Prostatakarzinoms verglichen. Da die meisten Metastasen des Prostatakarzinoms in den Knochen auftreten, ermöglicht uns die Verwendung der aus den ossären Metastasen generierten Daten als Referenzwerte eine spezifische Analyse der Eigenschaften der pulmonalen Metastasen unter Exklusion der allgemeinen, metastasierungsassoziierten Veränderungen, die auch in den ossären Metastasen vorkommen.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung haben wir unter Berücksichtigung der spezifischen Gewebeeigenschaften und der konsekutiv divergierenden physiologischen Genexpressionen im jeweiligen Gewebe ausgewertet. So konnten wir den Einfluss der DEGs auf wichtige Signalwege ermitteln, die sich auf den Tumor, die Metastasierung und das Mikromilieu auswirken.

Zusammenfassend konnten wir feststellen, dass in den Lungenmetastasen im Vergleich zu den Knochenmetastasen vor allem Gene, die die Immunantwort und die Rekrutierung von Makrophagen beeinflussen, hochreguliert waren.

Dies kongruiert mit der aktuellen Studienlage, nach der ein Zusammenhang zwischen CD36-exprimierenden TAMs und einer erhöhten Invasivität maligner Erkrankungen besteht.

Wir konnten mit unserer Studie zeigen, dass Makrophagen sowie Makrophagen-rekrutierende Chemokine eine relevante Rolle bei der pulmonalen Metastasierung des Prostatakarzinoms spielen.

Unsere Analyse ergab zudem eine geringere Expression EMT-assoziiierter Gene. Dies bestätigt die Beobachtungen von Børretzen et al., die eine geringere FOXC2-Expression in viszerale Metastasen verglichen mit ossären Metastasen des Prostatakarzinoms beschrieben haben.

Diese Erkenntnisse könnten zur Entwicklung diagnostischer Biomarker oder neuer Therapietargets beitragen. Die überexprimierten Chemokine können auch im Blut nachgewiesen und quantifiziert werden und damit potenziell als diagnostische Marker genutzt werden. Beispielhaft ist hier CCL21 zu nennen. In CDK12-defizienten Prostatakarzinomen gilt die Überexpression von CCL21 als eine der charakterisierenden Eigenschaften dieses spezifischen Tumortyps. Die betroffenen Patienten profitieren in der Regel von einer Immuntherapie. Eine Überexpression von CCL21, nachweisbar im peripheren Blut, weist auf ein gutes Ansprechen auf eine Immuntherapie hin. Vor dem Hintergrund der CCL21-Überexpression in den Lungenmetastasen könnte es auch als mögliches therapeutisches Target dienen. Bei genauerer Analyse der molekularen Funktionen der CCR7/CCL21-Achse wird deutlich, dass diese sowohl tumorfördernde als auch tumorsuppressive Eigenschaften aufweist. Daher ist eine eindeutige Bewertung der Wirkung einer medikamentösen CCL21-Suppression auf Basis des aktuellen Forschungsstandes nicht möglich und illustriert exemplarisch die Herausforderungen bei der Entwicklung neuer Therapietargets.

Im Gegensatz zu den ossären Metastasen sind in den pulmonalen Metastasen Gene, die mit der Immunantwort assoziiert sind, deutlich überexprimiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass Patienten mit pulmonalen Metastasen im Allgemeinen besser von einer Immuntherapie profitieren könnten als Patienten mit ossären Metastasen.

Eine Überexpression der Gene der CXCR3/CXCL10-Achse sowie eine konsekutiv erhöhte Zellproliferationsrate sind in der Literatur bereits für verschiedene Tumorentitäten beschrieben. Unsere Ergebnisse belegen ebenfalls eine Überexpression dieser Achse in pulmonalen Prostatakarzinommetastasen im Vergleich zu ossären Metastasen. In anderen Studien wurde jedoch eine tumorsuppressive Wirkung der CXCR3/CXCL10-Achse beobachtet. Die medikamentöse Blockade von CXCR3 in präklinischen Studien führte zu einer signifikanten Reduktion der Lungenmetastasen bei verschiedenen Karzinomtypen. Damit könnte CXCR3 ein potenzielles Therapieziel in der Behandlung pulmonal metastasierender Malignome sein. Es bedarf jedoch weiterer Studien sowie eines umfassenderen Verständnisses der Funktion und Wirkung dieses Rezeptors, bevor eine klinische Anwendung in Betracht gezogen werden kann.

Eine wesentliche Einschränkung unserer Studie ist die geringe Fallzahl von 24 analysierten Gewebeproben, bedingt durch die geringe Prävalenz pulmonaler Prostatakarzinometastasen. Zudem verfügen wir über begrenzte Informationen bezüglich des Krankheitsverlaufs sowie der durchgeführten Therapien der entsprechenden Patienten. Da der Fokus unserer Studie jedoch auf organspezifische Veränderungen im Mikromilieu der Metastasen liegt, sind diese Aspekte für die Bewertung unserer Ergebnisse weniger relevant. Für zukünftige Studien wären eine höhere Fallzahl sowie umfassende Kenntnisse über die klinischen Daten und den Therapieverlauf der Patienten wünschenswert, um die molekularen Auswirkungen der Therapeutika auf die Genexpression im Tumormikromilieu und in den Metastasen beurteilen zu können.

Unsere Ergebnisse geben keinen Aufschluss über den zeitlichen Zusammenhang der veränderten Genexpression und der Metastasierung selbst. Ob diese Gene bereits im Prozess der Metastasierung oder erst bei etablierter pulmonaler Metastase überexprimiert werden, lässt sich aus unseren Daten nicht ableiten. Um dies zu klären und eine mögliche prädiktive Aussagekraft der Genexpression hinsichtlich des Krankheitsverlaufes bewerten zu können, sind weitere Studien sowie in-vivo-Korrelationen erforderlich.

1.4 Gesamtkonklusion

Das Prostatakarzinom stellt mit ungefähr 1,5 Millionen Neudiagnosen im Jahr 2022 und etwa 14 Prozent aller Krebsneudiagnosen bei Männern die zweithäufigste Tumorerkrankung der männlichen Bevölkerung weltweit dar. Im gleichen Jahr wurden etwa 400.000 Prostatakarzinom-assoziierte Todesfälle verzeichnet. (Bray et al., 2024)

Die Risikostratifikation sowie die daraus resultierenden Therapieempfehlungen sind von verschiedenen Faktoren wie dem Patientenalter, dem Staging-Ergebnis und dem histologischen Ergebnis des Prostataresektates abhängig. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe & AWMF, 2024) Das PSA-basierte Screening wird immer häufiger durchgeführt und birgt neben den Chancen der Früherkennung auch die Gefahr einer Übertherapie von Patienten mit einem niedrig-aggressiven Tumor-Subtyp, welcher im Rahmen der natürlichen Lebenserwartung des Patienten asymptomatisch geblieben wäre. (Hugosson et al., 2010) Die im Falle einer Übertherapie eintretenden Therapienebenwirkungen können die Lebensqualität eines Patienten, der ohne Diagnose nie entsprechende Symptome verspürt hätte, erheblich beeinträchtigen. Die Herausforderung bei der Therapieentscheidung liegt somit in der Einschätzung der Aggressivität des Tumors sowie der Stratifizierung des Progressions- und Metastasierungsrisikos, um Übertherapie auf der einen Seite sowie Tumorprogress und Metastasierung auf der anderen Seite zu vermeiden.

Bisher sind keine molekularen Marker etabliert, die eine Beurteilung der Aggressivität und eine entsprechende Anpassung der Therapieempfehlungen ermöglichen. (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2021) Daher besteht der dringende Bedarf, die mit der Metastasierung assoziierten molekularen Veränderungen besser zu verstehen, um entsprechende Marker identifizieren und für die Diagnostik sowie die Therapieplanung nutzen zu können. Wir haben im Rahmen der hier dargestellten Studien die Genexpression des ossär sowie pulmonal metastasierten Prostatakarzinoms untersucht und mit der von primären Prostatakarzinomen verglichen. Ziel dieser Arbeiten war es, die metastasierungsassoziierten genomischen Veränderungen zu analysieren und so die diesen auf molekularer Ebene zugrunde liegenden Mechanismen besser zu

verstehen, um potenzielle Biomarker zu identifizieren, die auf einen aggressiveren Tumorphänotyp hinweisen können.

Dazu haben wir zu Beginn, wie in der ersten dargestellten Publikation beschrieben, die Methodik der Genexpressionsanalyse aus mRNA, die wir zuvor aus dFFPE-Material extrahiert haben, mit Hilfe des *NanoString nSolver*®-Systems etabliert. Wir konnten demonstrieren, dass die angewandte Methode reliable und reproduzierbare Ergebnisse generiert. Darüber hinaus konnten wir mit der dargestellten Methode eine sichere und ubiquitär anwendbare Möglichkeit eröffnen, (d)FFPE-Gewebeblöcke zur RNA-Extraktion und anschließenden Analyse der gewonnenen RNA zu nutzen. Dadurch wird die Auswertung zahlreicher bisher ungenutzter Ressourcen aus Krankenhausarchiven für die genomische Gewebeanalyse ermöglicht.

Unter Anwendung dieser etablierten Methodik konnten wir für die beiden untersuchten metastatischen Entitäten verschiedene DEGs identifizieren, die die Metastasierungsfähigkeiten von Tumorzellen beeinflussen könnten.

In den ossären Metastasen zeigte sich, verglichen mit den primären Prostatakarzinomen, eine signifikante Überexpression von COL1A1, COL1A2, MPP9, MPP13 und CD36. Andere Forschungsgruppen konnten eine Überexpression dieser Gene auch in anderen Tumorentitäten mit einer erhöhten Aggressivität und Metastasierungsrate korrelieren. Sie gelten bereits als potenzielle Biomarker und therapeutische Targets für das Mamma-, Ovarial- und Kolonkarzinom. Bevor sie jedoch in der klinischen Patientenversorgung genutzt werden können, bedarf es noch weiterer Forschung sowie klinischer Validierung der Ergebnisse. (Deng et al., 2019; Gialeli et al., 2011; He et al., 2018; Jiang et al., 2019; Ladanyi et al., 2018; Li et al., 2020; J. Liu et al., 2018; Yu & Stamenkovic, 2000; Zhang et al., 2018)

Im Vergleich der Genexpression in den Lungenmetastasen mit dem primären Prostatakarzinom wurde eine starke Überexpression von CEACAM6 festgestellt. Eine Inaktivierung von CEACAM6 bewirkte in unseren Zellreihenexperimenten eine erhöhte Apoptoserate sowie eine verringerte Proliferations- und Migrationsrate der Prostatakarzinomzellen. Im Falle einer Überexpression ist entsprechend von einer konträren funktionellen Auswirkung auszugehen. Die Überexpression von CEACAM6 in den Tumorzellen führt damit zu einer verringerten Apoptoserate sowie

zu einer erhöhten Proliferations- und Migrationsrate und damit zu insgesamt verbesserten Metastasierungsfähigkeiten der Zellen. Aufgrund seiner Eigenschaften als Zelloberflächenantigen stellt CEACAM6 daher einen vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkt dar und könnte zudem als diagnostischer Biomarker genutzt werden.

Eine signifikante Überexpression von CEACAM6 ist auch im pulmonalen Adenokarzinom beschrieben worden. Hong et al. konnten im Xenograft-Modell eine Reduktion der Tumorlast unter einer Kombinationstherapie aus einem monoklonalen Anti-CEACAM6-Antikörper und Paclitaxel nachweisen. (Hong et al., 2015) Dennoch bedarf die Adressierung von CEACAM6 als Therapieziel noch weiterer Forschung, insbesondere hinsichtlich der Nebenwirkungen sowie einer klinischen Korrelation der Studienergebnisse. Es ist zudem zu prüfen, ob sich die positiven Therapieeffekte, die im Mausmodell für das pulmonale Adenokarzinom erzielt wurden, auf das humane Prostatakarzinom übertragen lassen.

Setzt man die Genexpression in den Lungenmetastasen in Relation zu der in den Knochenmetastasen, fällt vor allem eine erhöhte pulmonale Expression von Genen auf, die die Immunreaktion beeinflussen und Makrophagen rekrutieren. Die Beteiligung des Immunsystems an der Entwicklung und Progression maligner Erkrankungen ist in der Literatur belegt und scheint insbesondere bei der Vorbereitung des Mikromilieus im Rahmen der Metastasierung eine wichtige Rolle zu spielen. (Chimal-Ramírez et al., 2013) Es ist daher möglich, dass Patienten mit einem pulmonal metastasierten Prostatakarzinom besser auf eine Immuntherapie ansprechen als Patienten mit ossären Metastasen.

Zusammenfassend konnten wir mit unseren Arbeiten wichtige Gene und Signalwege identifizieren, die zu der allgemeinen und organspezifischen Metastasierung des Prostatakarzinoms beitragen. Dies identifiziert neue potenzielle diagnostische sowie therapeutische Targets, die aggressive Tumortypen detektieren sowie eine entsprechend modifizierte Therapiestrategie ermöglichen könnten. Ein Teil dieser Gene ist auch in anderen Tumorentitäten bereits als möglicher Angriffspunkt aufgefallen und derzeit Gegenstand weiterer Studien. Auch im Falle einer erfolgreichen medikamentösen Adressierung der Targets ist noch umfassende Forschung mit größeren Kohorten und klinischer Datenkorrelation

sowie hinsichtlich möglicher Therapienebenwirkungen erforderlich, bevor klinische Studien durchgeführt werden können.

Um schließlich individuelle Therapiekonzepte entwickeln zu können, ist ein tiefgehendes Verständnis der molekularen Eigenschaften des Prostatakarzinoms einschließlich seiner Veränderungen im Metastasierungsprozess und seines Mikromilieus erforderlich. Mit unseren Studien haben wir einen wichtigen Beitrag zum Verständnis dieses komplexen biologischen Prozesses geleistet.

1.5 Abkürzungsverzeichnis

CCK-8	Cell Counting Kit 8
dFFPE	Dekalzifiziert, Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EZM	Extrazelluläre Matrix
FDA	Federal Drug Association
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FOV	Field of view
HE	Hämatoxylin-Eosin
MACNP(-L)	Manually annotated and curated Nanostring-Data Platform (for Lungmetastases)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
TBS-T Puffer	Tris-buffered saline with Tween20
TGF	Transforming growth factor

1.6 Literaturangaben

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>

Chimal-Ramírez, G. K., Espinoza-Sánchez, N. A., & Fuentes-Pananá, E. M. (2013). Protumor activities of the immune response: Insights in the mechanisms of immunological shift, oncotraining, and oncopromotion. *Journal of Oncology*, 2013, 835956. <https://doi.org/10.1155/2013/835956>

Coleman, R. E. (2001). Metastatic bone disease: Clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treatment Reviews*, 27(3), 165–176. <https://doi.org/10.1053/ctrv.2000.0210>

Cui, P.-F., Cong, X.-F., Gao, F., Yin, J.-X., Niu, Z.-R., Zhao, S.-C., & Liu, Z.-L. (2020). Prognostic factors for overall survival in prostate cancer patients with different site-specific visceral metastases: A study of 1358 patients. *World Journal of Clinical Cases*, 8(1), 54–67. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v8.i1.54>

Deng, M., Cai, X., Long, L., Xie, L., Ma, H., Zhou, Y., Liu, S., & Zeng, C. (2019). CD36 promotes the epithelial–mesenchymal transition and metastasis in cervical cancer by interacting with TGF- β . *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 352. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2098-6>

Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie & Geburtshilfe (DGGG). (2021, Juni). *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe (DKH). https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.4/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.4.pdf

Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. (2021, Oktober). *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 6.2, 2021, AWMF Registernummer: 043/022OL*. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/>

Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, & AWMF. (2024, Mai). *S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 7.0, 2024, AWMF-Registernummer: 043-022OL*. Leitlinienprogramm Onkologie. https://register.awmf.org/assets/guidelines/043-022OLI_S3_Prostatakarzinom_2024-06.pdf

Eggerer, S. E., Rumble, R. B., Armstrong, A. J., Morgan, T. M., Crispino, T., Cornford, P., van der Kwast, T., Grignon, D. J., Rai, A. J., Agarwal, N., Klein, E. A., Den, R. B., & Beltran, H. (2020). Molecular Biomarkers in Localized Prostate Cancer: ASCO Guideline. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(13), 1474–1494. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02768>

Gandaglia, G., Abdollah, F., Schiffmann, J., Trudeau, V., Shariat, S. F., Kim, S. P., Perrotte, P., Montorsi, F., Briganti, A., Trinh, Q.-D., Karakiewicz, P. I., & Sun, M. (2014). Distribution of metastatic sites in patients with prostate cancer: A population-based analysis. *The Prostate*, 74(2), 210–216. <https://doi.org/10.1002/pros.22742>

Gialeli, C., Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting: MMPs as potential targets in malignancy. *FEBS Journal*, 278(1), 16–27. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x>

Halabi, S., Kelly, W. K., Ma, H., Zhou, H., Solomon, N. C., Fizazi, K., Tangen, C. M., Rosenthal, M., Petrylak, D. P., Hussain, M., Vogelzang, N. J., Thompson, I. M., Chi, K. N., de Bono, J., Armstrong, A. J., Eisenberger, M. A., Fandi, A., Li, S., Araujo, J. C., ... Small, E. J. (2016). Meta-Analysis Evaluating the Impact of Site of Metastasis on Overall Survival in Men With Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 34(14), 1652–1659. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.65.7270>

- He, W., Zhang, H., Wang, Y., Zhou, Y., Luo, Y., Cui, Y., Jiang, N., Jiang, W., Wang, H., Xu, D., Li, S., Wang, Z., Chen, Y., Sun, Y., Zhang, Y., Tseng, H.-R., Zou, X., Wang, L., & Ke, Z. (2018). CTHRC1 induces non-small cell lung cancer (NSCLC) invasion through upregulating MMP-7/MMP-9. *BMC Cancer*, *18*(1), 400. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4317-6>
- Hong, K. P., Shin, M. H., Yoon, S., Ji, G. Y., Moon, Y. R., Lee, O.-J., Choi, S.-Y., Lee, Y.-M., Koo, J. H., Lee, H.-C., Lee, G. K., Kim, S. R., Lee, K. H., Han, H.-S., Choe, K. H., Lee, K. M., Hong, J.-M., Kim, S.-W., Yi, J. H., ... Song, H. G. (2015). Therapeutic effect of anti CEACAM6 monoclonal antibody against lung adenocarcinoma by enhancing anoikis sensitivity. *Biomaterials*, *67*, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.012>
- Hugosson, J., Carlsson, S., Aus, G., Bergdahl, S., Khatami, A., Lodding, P., Pihl, C.-G., Stranne, J., Holmberg, E., & Lilja, H. (2010). Mortality results from the Göteborg randomised population-based prostate-cancer screening trial. *The Lancet. Oncology*, *11*(8), 725–732. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70146-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70146-7)
- Jiang, M., Wu, N., Xu, B., Chu, Y., Li, X., Su, S., Chen, D., Li, W., Shi, Y., Gao, X., Zhang, H., Zhang, Z., Du, W., Nie, Y., Liang, J., & Fan, D. (2019). Fatty acid-induced CD36 expression via O-GlcNAcylation drives gastric cancer metastasis. *Theranostics*, *9*(18), 5359–5373. <https://doi.org/10.7150/thno.34024>
- Koch-Institut, R. (2023). *Krebs in Deutschland für 2019/2020*. <https://doi.org/10.25646/11357>
- Ladanyi, A., Mukherjee, A., Kenny, H. A., Johnson, A., Mitra, A. K., Sundaresan, S., Nieman, K. M., Pascual, G., Benitah, S. A., Montag, A., Yamada, S. D., Abumrad, N. A., & Lengyel, E. (2018). Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis. *Oncogene*, *37*(17), 2285–2301. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0093-z>
- Li, M., Wang, J., Wang, C., Xia, L., Xu, J., Xie, X., & Lu, W. (2020). Microenvironment remodeled by tumor and stromal cells elevates fibroblast-derived COL1A1 and facilitates ovarian cancer metastasis. *Experimental Cell Research*, *394*(1), 112153. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112153>
- Lin, S., Sun, L., Lyu, X., Ai, X., Du, D., Su, N., Li, H., Zhang, L., Yu, J., & Yuan, S. (2017). Lactate-activated macrophages induced aerobic glycolysis and epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by regulation of CCL5-CCR5 axis: A positive metabolic feedback loop. *Oncotarget*, *8*(66), 110426–110443. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22786>
- Liu, D., Kuai, Y., Zhu, R., Zhou, C., Tao, Y., Han, W., & Chen, Q. (2020). Prognosis of prostate cancer and bone metastasis pattern of patients: A SEER-based study and a local hospital based study from China. *Scientific Reports*, *10*(1), 9104. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64073-6>
- Liu, J., Shen, J.-X., Wu, H.-T., Li, X.-L., Wen, X.-F., Du, C.-W., & Zhang, G.-J. (2018). Collagen 1A1 (COL1A1) promotes metastasis of breast cancer and is a potential therapeutic target. *Discovery Medicine*, *25*(139), 211–223.
- Robert Koch-Institut. (2016). *Berichts zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. <https://doi.org/10.17886/RKIPUBL-2016-014>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *72*(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- van den Bergh, G. P. A., Kuppen, M. C. P., Westgeest, H. M., Mehra, N., Gerritsen, W. R., Aben, K. K. H., van Oort, I. M., van Moorselaar, R. J. A., Somford, D. M., van den Eertwegh, A. J. M., Bergman, A. M., van den Bergh, A. C. M., & Uyl-de Groot, C. A. (2023). Incidence and survival of castration-resistant prostate cancer patients with visceral metastases: Results from the Dutch CAPRI-registry. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, *26*(1), 162–169. <https://doi.org/10.1038/s41391-022-00605-7>

Yu, Q., & Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development*, *14*(2), 163–176.

Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, J., Zhong, J., & Yang, R. (2018). COL1A1 promotes metastasis in colorectal cancer by regulating the WNT/PCP pathway. *Molecular Medicine Reports*.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8533>

1.7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich besonders meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Verena Sailer danken, die diese Arbeit betreut hat. Die stets freundlich-zugewandten sowie fachlichen und konstruktiven Gespräche haben mir den Einstieg in die Forschung und das wissenschaftliche Arbeiten enorm erleichtert. Ich möchte mich an dieser Stelle auch für die konstruktiven Rückmeldungen und Ermutigungen bedanken, die mir sowohl hinsichtlich dieser Arbeit als auch persönlich sehr weitergeholfen haben. Mein Dank gilt weiterhin Alireza Saraji, der mir immer hilfsbereit beiseite stand und mir geholfen hat, den Einstieg in das wissenschaftliche Schreiben und Denken zu bewältigen.

Des Weiteren danke ich Janine Stegemann-Frehse für die geduldige Einarbeitung und Hilfestellung bei sämtlichen Tätigkeiten im Labor und für die detaillierte Beantwortung aller meiner Fragen.

Ich danke außerdem allen Mitgliedern der Forschungsgruppe für die kollegiale, nette und zielorientierte Zusammenarbeit sowie Eva Dreyer für die technische Unterstützung.

3. Publikationen und Kongressbeiträge

06/2021

Posterpräsentation zum Thema „Gene Expression Analysis of Prostate Cancer Lung Metastases“

Virtuelle Pathologietage der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 2021

09/2021

Cracking it- successful mRNA extraction for digital gene expression analysis from decalcified, formalin-fixed and paraffin-embedded bone tissue

Plos One

09/2022

The Gene Expression Landscape of Prostate Cancer Bone Metastasis Reveals Close Interaction with the Bone Microenvironment

International Journal of Molecular Sciences

06/2023

Vortrag zum Thema „Comprehensive transcriptomic Analysis of Prostate Cancer Lung Metastases“

106. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Leipzig

05/2024

CEACAM6 Promotes Lung Metastasis via Enhancing Proliferation, Migration and Suppressing Apoptosis of Prostate Cancer Cells

Cancer Genomics and Proteomics

08/2024

Comprehensive transcriptomic analysis of prostate cancer lung metastases

Plos One

4. Verzeichnis der Publikationen

4.1 Cracking it – successful mRNA extraction for digital gene expression

analysis from decalcified, formalin-fixed and paraffin-embedded bone tissue

Autoren: Alireza Saraji, Anne Offermann, Janine Stegmann-Frehse, Katharina Hempel, Duan Kang, Rosemarie Krupar, Christian Watermann, Danny Jonigk, Mark Philipp Kühnel, Jutta Kirfel, Sven Perner, Verena Sailer

Zeitschrift: PLOS ONE, Jahrgang 16, Heft 9

Datum der Veröffentlichung: 16.09.2021

Artikelnummer: e0257416

DOI: 10.1371/journal.pone.0257416

Abstract:

With the advance of precision medicine, the availability of tumor tissue for molecular analysis has become a limiting factor. This is particularly the case for bone metastases which are frequently occurring in cancer types such as prostate cancer. Due to the necessary decalcification process it was long thought that transcriptome analysis will not be feasible from decalcified formalin-fixed, paraffin-embedded (DFFPE) in a large manner. Here we demonstrate that mRNA extraction from DFFPE is feasible, quick, robust and reproducible and that decalcification does not hamper subsequent gene expression analysis. This might assist in implementing transcriptome analysis from DFFPE into every day practice.

4.2 The Gene Expression Landscape of Prostate Cancer BM Reveals Close Interaction with the Bone Microenvironment

Autoren: Anne Offermann, Alireza Saraji, Kang Duan, Christian Watermann, Katharina Hempel, Marie C. Roesch, Rosemarie Krupar, Janine Stegmann-Frehse, Danny Jonigk, Mark Philipp Kühnel, Wolfgang Klapper, Axel S. Merseburger, Jutta Kirfel, Sven Perner, Verena Sailer

Zeitschrift: International Journal of Molecular Sciences, Jahrgang 23, Heft 21

Datum der Veröffentlichung: 27. Oktober 2022

Artikelnummer: 13029

DOI: 10.3390/ijms232113029

Abstract:

Bone metastatic (BM) prostate cancer (PCa) belongs to the most lethal form of PCa, and therapeutic options are limited. Molecular profiling of metastases contributes to

the understanding of mechanisms defining the bone metastatic niche. Our aim was to explore the transcriptional profile of PCa BM and to identify genes that drive progression. Paraffin-embedded tissues of 28 primary PCa and 30 BM were submitted to RNA extraction and analyzed by RNA sequencing using the Nanostring nCounter gene expression platform. A total of 770 cancer-related genes were measured using the Nanostring™ PanCancer progression panel. Gene Ontology (GO), KEGG, Reactome, STRING, Metascape, PANTHER, and Pubmed were used for data integration and gene annotation. We identified 116 differentially expressed genes (DEG) in BM compared to primaries. The most significant DEGs include *CD36*, *FOXC2*, *CHAD*, *SPP1*, *MMPs*, *IBSP*, and *PTX3*, which are more highly expressed in BM, and *ACTG2*, *MYH11*, *CNN1*, *FGF2*, *SPOCK3*, and *CHRD1*, which have a lower expression. DEGs functionally relate to extracellular matrix (ECM) proteoglycans, ECM-receptors, cell-substrate adhesion, cell motility as well as receptor tyrosine kinase signaling and response to growth factors. Data integration and gene annotation of 116 DEGs were used to build a gene platform which we termed “Manually Annotated and Curated Nanostring-data Platform”. In summary, our results highlight the significance of certain genes in PCa BM to which essential pro-metastatic functions could be ascribed. Data from this study provide a comprehensive platform of genes that are related to PCa BM and provide evidence for further investigations.

4.3 CEACAM6 Promotes Lung Metastasis via Enhancing Proliferation, Migration and Suppressing Apoptosis of Prostate Cancer Cells

Autoren: Alireza Saraji, Katharina Wulf, Janine Stegmann-Frehse, Duan Kang, Anne Offermann, Gevorg Shaghoyan, Danny Jonigk, Mark Philipp Kühnel, Sven Perner, Jutta Kirfel, Verena Sailer

Zeitschrift: Cancer Genomics & Proteomics, Jahrgang 21, Heft 4

Datum der Veröffentlichung: 29. Juni 2024

Artikelnummer: 405-413

DOI: 10.21873/cgp.20459

Abstract:

Background/aim: Metastatic prostate cancer (mPCa) results in high morbidity and mortality. Visceral metastases in particular are associated with a shortened survival.

Our aim was to unravel the molecular mechanisms that underly pulmonary spread in mPCa.

Materials and methods: We performed a comprehensive transcriptomic analysis of PCa lung metastases, followed by functional validation of candidate genes. Digital gene expression analysis utilizing the NanoString technology was performed on mRNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue from PCa lung metastases. The gene expression data from primary PCa and PCa lung metastases were compared, and several publicly available bioinformatic analysis tools were used to annotate and validate the data.

Results: In PCa lung metastases, 234 genes were considerably up-regulated, and 78 genes were significantly down-regulated when compared to primary PCa. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) was identified as suitable candidate gene for further functional validation. CEACAM6 as a cell adhesion molecule has been implicated in promoting metastatic disease in several solid tumors, such as colorectal or gastric cancer. We showed that siRNA knockdown of CEACAM6 in PC-3 and LNCaP cells resulted in decreased cell viability and migration as well as enhanced apoptosis. Comprehensive transcriptomic analyses identified several genes of interest that might promote metastatic spread to the lung.

Conclusion: Functional validation revealed that CEACAM6 might play an important role in fostering metastatic spread to the lung of PCa patients via enhancing proliferation, migration and suppressing apoptosis in PC-3 and LNCaP cells. CEACAM6 might pose an attractive therapeutic target to prevent metastatic disease.

4.4 Comprehensive Transcriptomic Analysis of prostate cancer lung metastases

Autoren: Alireza Saraji*, Katharina Wulf*, Janine Stegmann-Frehse, Duan Kang, Anne Offermann, Danny Jonigk, Mark Philipp Kühnel, Jutta Kirfel, Sven Perner, Verena Sailer

* geteilte Erstautorenschaft

Zeitschrift: PLOS ONE, Jahrgang 19, Heft 8

Datum der Veröffentlichung: 15. August 2024

Artikelnummer: e0306525

[DOI: 10.1371/journal.pone.0306525](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0306525)

Abstract:

Metastatic prostate cancer (mPCa) is a widespread disease with high mortality. Unraveling molecular mechanisms of disease progression is of utmost importance. The microenvironment in visceral organs and the skeletal system is of particular interest as a harbinger of metastatic spread. Therefore, we performed a comprehensive transcriptomic analysis of prostate cancer lung metastases with a special focus on differentially expressed genes attributable to the microenvironment. Digital gene expression analysis using the NanoString nCounter analysis system was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue from prostate cancer (PCa) lung metastases (n = 24). Data were compared to gene expression data from primary PCa and PCa bone metastases. Bioinformatic analysis was performed using several publicly available tools. In comparison to prostate cancer bone metastases, 209 genes were significantly upregulated, and 100 genes were significantly downregulated in prostate cancer lung metastases. Among the up-regulated genes, the top 10 genes with the most significant P-value were HLA-DPB1, PTPRC, ITGB7, C3, CCL21, CCL5, ITGAM, SERPINA1, MFAP4, ARAP2 and among the down-regulated genes, the top 10 genes with the most significant P-value were FOXC2, TWIST1, CDK14, CHAD, IBSP, EPN3, VIT, HAPLN1, SLC44A4, TBX1. In PCa lung metastases genes associated with immunogenic responses were upregulated while genes associated with epithelial-mesenchymal transition were down-regulated. We also showed that CXCR3/CXCL10 axis plays a significant role in prostate cancer lung metastases in comparison to bone metastases. In this study, we comprehensively explored transcriptomic alterations in PCa lung metastases in comparison to primary PCa and PCa bone metastases. In PCa lung metastases genes associated with immunogenic responses are upregulated while genes associated with epithelial-mesenchymal transition are down-regulated. This points to a more immunogenic phenotype of PCa lung metastases thus potentially making patients more susceptible to immunotherapeutic approaches.