



**Abschlussbericht für das Stipendienprogramm der Hamburger Krebsgesellschaft zur  
Förderung der medizinischen Doktoranden im Bereich Krebsforschung**

Thema

**Die Rolle von Zelladhäsionsmolekülen auf die Hirnmetastasierung des nicht-  
kleinzelligen Bronchialkarzinoms**

Stipendiatin  
**Justine Münsterberg**

Doktormutter  
**Dr. habil. Harriet Wikman-Kocher**

Institut für Tumorbiologie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Universität Hamburg  
Martinistraße 52  
20246 Hamburg

## Abschlussbericht Hamburger Krebsgesellschaft e.V.

### **1. Kurze Darstellung des Projektes**

Die Diagnose Lungenkrebs ist infaust mit einem 5-Jahres-Überleben von nur 16 %. 40-50 % der Patienten mit nicht-kleinzeligem Bronchialkarzinom (*non-small cell lung cancer, NSCLC*) entwickeln im Verlauf ihrer Erkrankung Gehirnmetastasen. In diesem Projekt wurde die Rolle der Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules, CAMs*) ALCAM (*activated leukocyte cell adhesion molecule*), sowie CEACAM 1, 5 und 6 (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules 1, 5 and 6*) auf die Gehirnmetastasierung des NSCLC untersucht. Dabei fanden sowohl Untersuchungen an der DNA-Kopienzahl als auch der Proteinexpression von Primärtumoren sowie deren Hirnmetastasen statt. Anschließend wurden die Expressionsdaten mit klinischen Daten korreliert. Nach Evaluation wird nun das Kandidatenprotein ALCAM auf zirkulierenden Tumorzellen und im Serum weiter untersucht.

### **2. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungs- Analysen von 3q13 und 19q13**

Mit einer Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurde die DNA-Kopienzahl der jeweiligen Proben aus Lungen-, Lymphknoten- und Hirngewebe (n=109) untersucht. Für *ALCAM*, *CEACAM5* und 6 ließen sich keine wesentlichen DNA-Zuwachse oder -Verluste ermitteln. Somit bestätigte die FISH-Analyse nicht die zuvor in einer viel kleineren Patientenkohorte mittels Array-CGHs (Komparative genomische Hybridisierung, *comparative genomic hybridisation*) ermittelten Amplifikationen. DNA-Amplifikationen scheinen ein seltenes Ereignis darzustellen.

### **3. Immunhistochemische Analysen von ALCAM, CEACAM 1, 5 und 6**

Die mit einem spezifischen ALCAM-Antikörper immunhistochemisch gefärbten *Tissue Micro Arrays* (TMAs), bestehend aus Bronchialkarzinom- (n=51), Lymphknoten- (n=15) und Hirnmetastasengewebe (n=76), wurden mit den erhobenen Patientendaten mittels SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) korreliert, um zu prüfen ob signifikante Zusammenhänge zwischen einer Hochregulation oder einem Fehlen von ALCAM und klinisch-histologischen Faktoren bestehen. Eine erhöhte ALCAM-Expression in Gehirnmetastasen zeigte einen signifikanten Zusammenhang zu einem oligo-metastatischen Status (ausschließlich Hirnmetastasen) ( $p=0,020$ ). Zudem zeigten

diejenigen Hirnmetastasen, welche bereits zeitgleich zur Erstdiagnose des Primärtumors festgestellt wurden, eine erhöhte ALCAM-Expression ( $p=0,037$ ). Eine moderate bis starke Expression im Primärtumor ging mit einem positiven Lymphknotenstatus einher ( $p=0,019$ ). Außerdem bestand eine inverse Korrelation hinsichtlich des Gesamtüberlebens und der Höhe der ALCAM-Expression (Expression in der Lunge:  $p=0,017$ ; Expression in der Gehirnmetastase:  $p=0,038$ ).

Es zeigte sich, dass die ALCAM-Expression in den Gehirnmetastasen signifikant zunimmt im Vergleich zu den Primärtumoren ( $p=0,038$ ). Auch eine zusätzliche Analyse von korrespondierenden Gewebepaaren, bestehend aus dem Bronchialkarzinomtumor und dazu gehöriger Gehirnmetastase ( $n=9$ ), bestätigte diese Beobachtung. In 33 % der Fälle wurde eine *de novo* Expression von ALCAM in der jeweiligen Gehirnmetastase gefunden.

Dieselben TMAs und Gewebepaare wurden ferner auf ihre CEACAM-Expression hin untersucht. Generell zeigten CEACAM5 und 6 eine stabile Expression im Metastasierungsprozess. In den entsprechenden Gewebepaaren zeigte sich eine leichte Deregulation in 22 % der Fälle. Beide wurden häufiger in Tumoren vom Adenom-Typ vorgefunden. Eine Hirn-assoziierte Korrelation ließ sich in diesem Fall nicht finden. Hingegen zeigte CEACAM1 eine *de novo* Expression in 33 % der Hirnmetastasen innerhalb der korrespondierenden Gewebepaare. Zudem trat ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer positiven Expression und einem oligo-metastatischen Status auf (nur Hirnmetastasen) ( $p=0,046$ ).

## Weitere Analysen

Aufgrund dessen, dass insbesondere ALCAM mit der Hirnmetastasierung assoziiert zu sein scheint, werden momentan weitere Analysen mit diesem CAM durchgeführt. Ziel ist es, ALCAM als möglichen Marker für die Hirnmetastasierung des NSCLC zu untersuchen.

- a) Es wird versucht zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells, CTCs*) aus Blutproben von NSCLC Patienten zu isolieren und diese auf ihre ALCAM- Expression hin zu untersuchen (siehe Abb. 1).

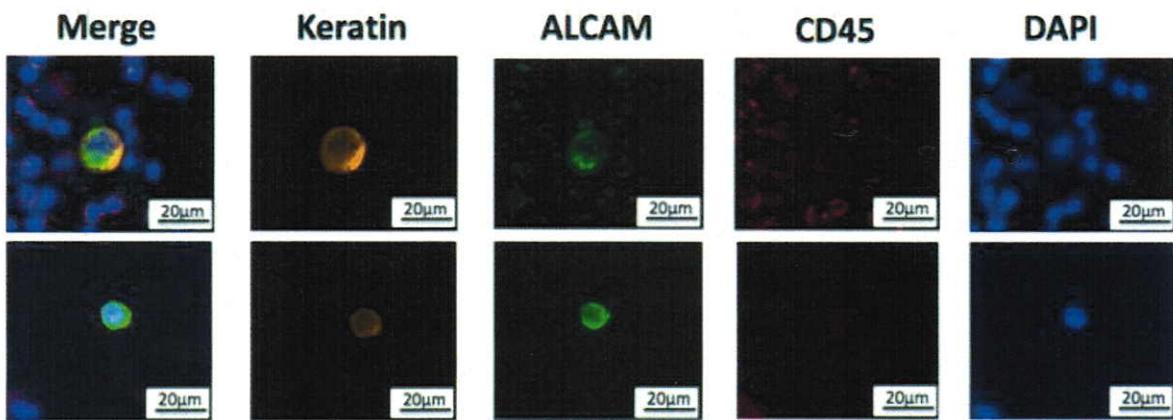


Abbildung 1: ALCAM Expression auf CTCs von zwei verschiedenen NSCLC Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung.

- b) Zusätzlich wird im Patientenserum von 62 Patienten in einem NSCLC Frühstadium, 34 Patienten in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und 24 Patienten mit Hirnmetastasen die lösliche ALCAM Konzentration mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) analysiert. Die Messungen wurden bereits vorgenommen und müssen noch mit den Patientendaten korreliert werden.

## Zusammenfassung

1. CEACAMs werden häufiger in Adenokarzinomen exprimiert.
2. Die CAM-Expression kann sich während des Metastasierungsprozesses verändern.
3. Die ALCAM- und CEACAM1-Expression ist mit Metastasierung assoziiert.
4. ALCAM ist signifikant hochreguliert in NSCLC Gehirnmetastasen.
5. Eine starke ALCAM-Expression korreliert mit einem kürzeren Überleben.
6. ALCAM ist ein möglicher Marker für die NSCLC Gehirnmetastasierung.

## Ausblick

Die vorläufigen Daten wurden in Form eines Posters auf dem „International Symposium on Minimal Residual Cancer“ (2016) präsentiert (siehe Anhang). Zudem wurde bereits mit dem Niederschreiben der Ergebnisse für eine Publikation begonnen. Ziel ist eine Publikations-basierte Promotion. Dazu werden in nächster Zeit weitere identifizierte Gewebepaare immunhistochemisch analysiert sowie die durchgeführten ELISA-Assays ausgewertet.

## The role of cell adhesion molecules in non-small cell lung cancer brain metastases

Justine Münsterberg<sup>1</sup>, Michaela Wrage<sup>1</sup>, Jolanthe Kropidlowski<sup>1</sup>, Andrea Kristina Horst<sup>2</sup>, Yogesh Vashist<sup>3</sup>, Christian Bernreuther<sup>4</sup>, Markus Glatzel<sup>4</sup>, Klaus Pantel<sup>1</sup>, Harriet Wikman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Department of Tumor Biology, <sup>2</sup>) Inst. Experimental Immunology and Hepatology, <sup>3</sup>) General, Visceral and Thoracic Surgery Department, <sup>4</sup>) Department of Neuropathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

### Introduction

Lung cancer is the most common cause of cancer-related deaths, with a 5-year-survival rate of only 16%. Up to 40% of patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) develop brain metastases. The brain is a unique site of metastasis as the tumor is protected by the blood-brain barrier. Cell adhesion molecules (CAMs) of the immunoglobulin superfamily (IgSF) are involved in the process of metastasis in different tumor entities. In breast cancer CAMs have been shown to be involved in brain metastasis formation. Activated leucocyte cell adhesion molecule (ALCAM) and carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules 1 (CEACAM1), 5 (CEACAM5) and 6 (CEACAM6) are all members of the IgSF. In this study we investigated their role in NSCLC brain metastasis.

### Results

**Summary:** ALCAM expression in brain metastatic tissue significantly correlates with an oligo (brain) metastatic state ( $p=0.020$ ) and the presence of brain metastases at initial diagnosis ( $p=0.037$ ). Strong or moderate ALCAM expression in the primary NSCLC tumors is accompanied by a lymph node positive status ( $p=0.019$ ) (Table 1). The ALCAM expression changes during the process of metastasis and is significantly higher in brain metastases than in the primary tissue ( $p=0.038$ ). In 33% of matched pairs *de novo* expression of ALCAM in the corresponding brain metastases was found (Figure 1). Survival analysis showed a correlation between ALCAM expression and overall survival (Figure 2). ALCAM expression was also detected on CTCs (Figure 3).

CEACAM1 was associated with adenocarcinoma and an oligo (brain) metastatic state of patients (Table 2). Furthermore in 33% of matched pairs an upregulation of CEACAM1 was found (Figure 4). CEACAM5 and 6 were also more commonly expressed in adenocarcinoma but no association to brain metastases was found.

Table 1. Clinical correlation of ALCAM expression

ALCAM					
	total n	%	negative	moderate	strong
<b>Brain metastases</b>					
All	56	14.3	28.6	57.1	
Histology					n.s.
AC	41	9.7	29.3	61.0	
SCC	7	28.5	28.6	42.9	
other	5	40.0	40.0	20.0	
Oligometastasis					0.020
no	9	44.4	33.3	22.2	
yes	28	7.1	32.1	60.7	
BM at diagnosis					0.037
no	27	22.2	37.0	40.7	
yes	12	16.0	16.7	83.3	
<b>Primary tumors</b>					
All	48	12.5	60.4	27.1	
Histology					n.s.
AC	21	9.5	71.4	20.0	
SCC	17	11.1	61.1	27.8	
other	9	11.1	44.4	44.4	
Tumor					
pT1+2	35	8.6	62.9	28.6	n.s.
pT3+4	12	16.7	58.3	25.0	
LN status					
negative	22	9.1	81.8	9.1	0.019
positive	25	12.0	44.0	44.0	
Stage					
1+2	27	11.1	74.1	14.8	n.s.
3+4	19	10.5	47.4	42.1	

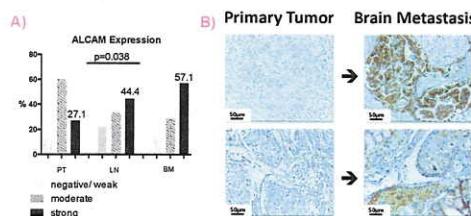


Figure 1. A) ALCAM expression in primary NSCLC tumors (PT), lymph node metastases (LN) and brain metastases (BM). ALCAM expression increases significantly with brain metastasis. B) Matched pairs of corresponding primary tumors and NSCLC brain metastases. *De novo* expression was found in 33% of cases.

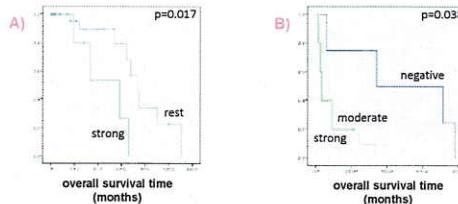


Figure 2. Survival analysis. ALCAM expression in A) primary tumors (n=46) as well as in B) brain metastases (n=21) correlates with shorter overall survival.

### Materials & Methods

#### Patient Material

Different tissue micro arrays (TMAs) of formalin fixed, paraffin embedded (FFPE) tissue were used including 51 primary lung tumors, 15 lymph nodes and 76 lung cancer brain metastases. Additionally, nine whole sections from matched pairs of the primary lung tumor tissue and the corresponding lung cancer brain metastases were analyzed.

#### Immunohistochemical Analysis

The following primary antibodies were used: ALCAM (1:400, Vector laboratories), CEACAM1 (own), CEACAM5 (1:50, R&D Systems) and CEACAM6 (1:100, Santa Cruz Biotechnology). The TMAs were rehydrated in xylene and alcohol, followed by antigen retrieval in citra plus solution (Biogenex) and primary antibody incubation (4°C, o/n). Staining was visualized using the Dako REAL Detection Kit. The staining results were graded negative, moderate or strong for ALCAM and negative or positive for CEACAMs.

#### ALCAM expression on CTCs

Ficoll density centrifugation of peripheral blood was performed for PBMC enrichment followed by a multi-colour immunofluorescence staining against Keratin (AE1/AE3-eFluor570, Biolegend), CD45 (1:150, Biolegend) and ALCAM (1:50, Bio Sciences).

### Conclusions

- CEACAMs are more commonly expressed in adenocarcinomas
- CAM expression can change during cancer progression
- ALCAM and CEACAM1 expression is associated with metastasis
- ALCAM is significantly upregulated in lung cancer brain metastasis
- A strong ALCAM expression correlates with shorter OS
- **ALCAM is a potential marker for NSCLC brain metastasis**

### Acknowledgements

This work has been supported by



HAMBURGER  
KREBSGESELLSCHAFT E.V.

justine.muensterberg@icloud.com

<http://www.uke.de/tumorbiology/wikman>