

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Eva Wardelmann

Expression von Prostataspezifischem Membran- Antigen (PSMA) in tumorassoziierten Gefäßen beim Synovialsarkom

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Nora Sophie Beller
aus Schweinfurt
2018

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Huss
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Kambiz Rahbar

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2018

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Eva Wardelmann
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Huss
Koreferent: Prof. Dr. med. Kambiz Rahbar
Nora Sophie Beller

Expression von Prostataspezifischem Membran-Antigen (PSMA) in tumorassoziierten Gefäßen beim Synovialsarkom

Zusammenfassung

Ziel: Die tumorassoziierte PSMA-Expression in der Neovaskulatur beim Synovialsarkom soll charakterisiert werden.

Material und Methoden: Von 37 Patienten mit einem Synovialsarkom wurden relevante klinisch-pathologische Parameter erhoben und von Tumorproben Tissue Micro Arrays erstellt. Die Tumoren wurden immunhistochemisch auf ihre Gefäßdichte und das PSMA-Expressionsmuster untersucht. Die Gefäßdichte wurde mittels Micro Vessel Density (MVD) Verfahren bestimmt. Endothelzellen wurden in vivo mittels Western Blot auf eine PSMA-Expression untersucht.

Ergebnisse: Bei 37,1 % der Synovialsarkome konnte eine neovaskuläre PSMA-Expression festgestellt werden. Je höher die tumorassoziierte Gefäßdichte, desto höher war auch die PSMA-Expression (MVD PSMA^{pos} = 160,7 +/- 14,7; MVD PSMA^{neg} = 67,5 +/- 8,5; $p < 0,0001$). Ein PSMA-induzierender Crosstalk zwischen Endothelzellen und Tumorzellen ließ sich in vitro nicht nachweisen.

Schlussfolgerung: Bei vielen Synovialsarkomen wird PSMA in der tumorassoziierten Neovaskulatur exprimiert. Dies kann einen vielversprechenden Ansatz bezüglich Diagnostik, Therapie und Rezidiverkennung bei Synovialsarkomen darstellen.

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2018

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Expression von Prostataspezifischem Membran-Antigen (PSMA) in tumorassoziierten Gefäßen beim Synovialsarkom

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie - Universitätsklinikum Münster

unter der Anleitung von:

Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Huss

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, 12.4.2018

Ort, Datum

Nora Sophie Beller

Name/ Unterschrift

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	i
1. Einleitung	1
1.1 Das Synovialsarkom	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie	2
1.1.3 Klinik, Diagnostik und Therapie	3
1.1.4 Genetik und Biologie des Synovialsarkoms	3
1.2 Grundlagen der Angiogenese	5
1.3 Das Prostataspezifische Membran-Antigen (PSMA)	8
1.4 PSMA als Marker der Tumorneovaskularisation	9
1.5 Ziele der Arbeit	11
2. Material und Methoden	13
2.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben	13
2.1.1 Tissue Microarray	13
2.1.2 Immunhistochemie	13
2.1.3 Bestimmung der PSMA-Expression	14
2.1.4 Bestimmung der Mikrogefäßdichte	15
2.2 Zellkultur	16
2.2.1 Zelllinien	16
2.2.2 Kultivierung von HUVECs	16
2.2.3 Herstellung des tumor-konditionierten Mediums	16
2.2.4 Inkubation von HUVECs mit TKM	17
2.2.5 Inkubation von HUVECs mit DMOG	17

2.3 Methoden der Proteinanalytik	17
2.3.1 Proteinisolation	17
2.3.2 Bradford Assay	18
2.3.3 Gelelektrophorese und Transfer Blotting	18
2.3.4 Antikörperinkubation und Proteindetektion	18
2.4 Auswertung und Statistik	19
2.5 Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien	19
3. Ergebnisse	24
3.1 Patientenkollektiv	24
3.2 Detektion von PSMA <i>in vivo</i>	24
3.2.1 PSMA-Expression in Tumorgewebeproben	24
3.2.2 Korrelation von PSMA-Expression mit klinischen, histologischen und genetischen Parametern	27
3.3 Detektion von PSMA <i>in vitro</i>	30
3.3.1 Endogene und induzierte PSMA-Expression in HUVECs	30
3.3.2 Kultivierung der HUVECs mit DMOG	31
4. Diskussion	32
5. Literatur	40
6. Lebenslauf	52
7. Danksagung	53

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A. bidest.	Aqua bidestillata (zweifach destilliertes Wasser)
cm ²	Quadratcentimeter
cm ³	Kubikcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
C-terminal	Carboxy-terminal
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMOG	Dimethylallylglycine, N-(Methoxyoxoacetyl)-glycine-methyl-ester
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii (und andere)
FCS	Fetal Calf Serum
FFPE Schnitt	Formalin-Fixierte Paraffin-Eingebettete Gewebeschnitte
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HUVEC	Human Endothelial Vein Cell
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilo Dalton
LI	Labelling Index
M	molar
mAb	monoklonaler Antikörper
min	Minute
ml	Milliliter
MVD	Micro Vessel Density
n	nano

PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PSMA	Prostata-spezifisches Membran-Antigen
TMA	Tissue Microarray
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
α	Alpha
β	Beta
μ	mikro (10^{-6})

1. Einleitung

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Tumorentität des Synovialsarkomes und ihrer Eigenschaft, in der tumorassoziierten Neovaskulatur PSMA zu induzieren. Eine Untersuchung dieses Zusammenhangs ist von medizinischer Bedeutung, da sich daraus neue Diagnose- und Therapiemöglichkeiten für Patienten ergeben können, die am Synovialsarkom erkrankt sind. Im Folgenden werden zunächst Hintergrundinformationen über das Synovialsarkom und PSMA gegeben. Anschließend werden die Ziele, Material und Methoden und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dargelegt. Im Schlussteil werden die Ergebnisse diskutiert und in Zusammenhang mit aktuellen Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen gestellt.

1.1 Das Synovialsarkom

Im folgenden Abschnitt wird das Synovialsarkom definiert und hinsichtlich Epidemiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie, sowie Genetik und Biologie genauer charakterisiert.

1.1.1 Definition

Beim Synovialsarkom handelt es sich um eine Tumorentität, die durch eine einzigartige Morphologie, Genetik und ihr klinisches Bild charakterisiert ist. Trotz seines Namens stammt das Synovialsarkom nicht von Synovialgewebe ab, das die innere Oberfläche von Gelenkhüllen, Sehnenscheiden und Schleimbeuteln bildet.¹ Sein genauer zellulärer Ursprung ist bis zum heutigen Tag unbekannt.² Die Namensgebung leitet sich von der in Abbildung 1 dargestellten, mikroskopischen Ähnlichkeit mit sich entwickelndem Synovium ab.

Die Klassifikation erfolgt in vier histologische Hauptgruppen: biphasisch, monophasisch fibrös, monophasisch epithelial und undifferenziert. Der monophasisch fibröse Typ (Abbildung 1A) umfasst nur Spindelzellen. Der biphasische Typ (Abbildung 1B) besteht zu gleichen Teilen sowohl aus einem

spindelzelligen als auch aus einem epithelialen Anteil, der glanduläre Strukturen enthält. Der monophasisch epitheliale Typ setzt sich vor allem aus epithelialen und nur einem sehr geringen Anteil von Spindelzellen zusammen. Der undifferenzierte Typ kann den kleinen, runden Zellen des Ewingsarkoms ähneln (auch primitiver neuroektodermaler Tumor genannt) oder einem großzelligen/epitheloiden oder einem Spindelzelltumor.³ Dennoch lässt sich auch dieser Typ durch seine charakteristische Immunhistologie, sowie seine histologischen und ultrastrukturellen Merkmalen eindeutig dem Synovialsarkom zuordnen. Manchmal tritt es in der Nähe, aber nie innerhalb von Gelenken auf.⁴

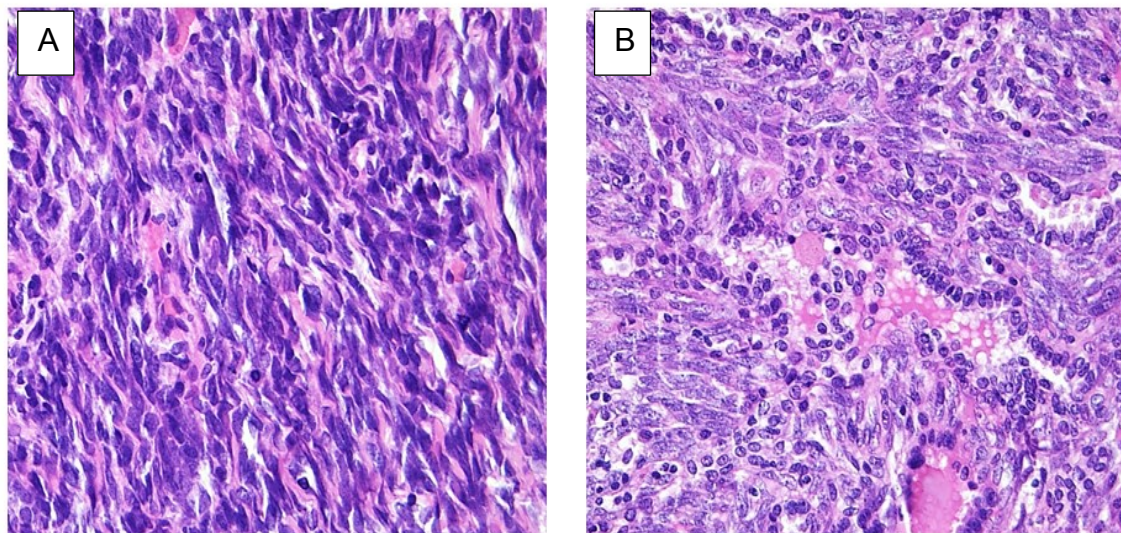


Abbildung 1: Repräsentative Morphologie von Synovialsarkomen. In (A) ist der monophasisch spindelzellige Subtyp gezeigt, in (B) der biphasische Typ mit erkennbaren glandulären Strukturen (je HE-Färbung, 400x).

1.1.2 Epidemiologie

Synovialsarkome machen 10 % bis 20 % aller Weichgewebstumoren bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen aus. Das durchschnittliche Diagnosealter liegt mit 35 Jahren im jungen Erwachsenenalter, dennoch reicht die Spanne des Erkrankungsalters von fünf bis zu 85 Jahren. Männer sind vom Synovialsarkom etwas häufiger betroffen als Frauen (das Verhältnis liegt bei 1,13 : 1).⁵

1.1.3 Klinik, Diagnostik und Therapie

In 70 % der Fälle ist das Synovialsarkom an den Extremitäten lokalisiert. Synovialsarkome weisen eine hohe Metastasierungsrate von bis zu 40 % auf, wobei sich meist Absiedelungen in der Lunge und im Knochen finden.⁵ Erfolgt die Diagnose erst im späten Lebensalter, wirkt sich das negativ auf die Prognose aus. Das Synovialsarkom neigt sowohl zu Früh- als auch zu Spätmetastasen. Die 10-Jahres-Rezidivfreiheit liegt bei 50 %. Meist erfolgt beim Synovialsarkom als Therapie eine weite chirurgische Exzision mit adjuvanter oder neoadjuvanter Radiotherapie.⁶ Diese Therapien bieten eine gute Chance auf Heilung, sofern es sich um ein lokales Synovialsarkom ohne Fernmetastasen handelt. Bei Patienten jedoch, die zum Diagnosezeitpunkt Lungenmetastasen aufweisen, liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate nur bei 0 - 10 %.⁷ Ausschlaggebend für eine günstige Prognose ist vor allem eine geringe Tumorgroße bei Diagnose,⁸ hoher Differenzierungsgrad⁹ und R0-Resektionsstatus bei chirurgischer Intervention.¹⁰ Weiterhin als günstige Prognosefaktoren konnten ein niedriges Erkrankungs- und Diagnosealter (< 35 Jahre) und das Ansprechen auf die First-Line-Chemotherapie identifiziert werden.¹¹ Synovialsarkome vom monophasischen Typ wirken sich prognostisch negativ aus.¹²

1.1.4 Genetik und Biologie des Synovialsarkoms

Prinzipiell liegt der Entstehung von Tumoren eine Änderung des Genoms einer Ursprungszelle zugrunde, welche dieser Zelle gegenüber der übrigen Zellpopulation einen Überlebensvorteil verschafft. Dies kann einerseits eine erhöhte Proliferationskinetik, andererseits eine Hemmung der natürlichen Zellalterung oder des Zelltodes sein. Weiterhin kann die Interaktion der Zelle mit den Nachbarzellen oder der umgebenden Extrazellulärmatrix gestört sein. Ein Tumor kann insbesondere auch dann entstehen, wenn das interzelluläre Zusammenspiel oder die intrazellulären Signalwege gestört sind.¹³

Allgemein stellt die Adhäsion von Zellen zu ihrer extrazellulären Matrix und ihre Fähigkeit mit ihrer Umwelt zu kommunizieren einen wesentlichen Bestandteil

der Proliferationskontrolle, der zellulären Homöostase und der Organentwicklung dar.¹⁴ Die Deregulation von Zelladhäsion ist in einigen Fällen verbunden mit Zellzyklusarrest und Apoptose, in anderen Fällen mit Tumorwachstum und -invasivität.¹⁵ Zelladhäsion ist die Folge eines komplexen und noch unvollständig erforschten Zusammenspiels von Signalwegen, die von der Zelloberfläche ausgehen und ins Zytoplasma übermittelt werden. Dort nehmen diese Signale Einfluss auf Zytoskelett, Zellgestalt und Motilität. Einige dieser Signalwege führen dann zur Aktivierung der Genexpression, die je nach Zielgen tumor- oder motilitätsfördernd wirken kann.¹⁶

Auch beim Synovialsarkom führt das Zusammenwirken eines veränderten Genoms und der daraus resultierenden veränderten Proteinexpression zu veränderter Proliferation und Interaktion der betroffenen Zellen. Die charakteristische genetische Ursache von Synovialsarkomen ist eine balancierte chromosomale Translokation $t(X; 18)(p11.2;q11.2)$. Dies führt zu einer Fusion des SYT Genes auf Chromosom 18 (auch als SS18 bezeichnet) mit dem SSX1 oder SSX2 Gen auf Xp11.2 und schließlich zu der Produktion des chimären SYT-SSX Proteins.¹⁷ Hierbei fusionieren alle außer den 8 carboxy-terminalen (C-terminalen) Aminosäuren des SS18 zu den C-terminalen 78 Aminosäuren des SSX-Partners. In weniger als 1 % aller Synovialsarkome lässt sich eine analoge Translokation von SSX4 finden.⁵

Nach Kato *et al.*¹⁷ stellen die veränderte Lokalisierung des SYT-SSX (beziehungsweise SS18-SSX) Proteins und anderer damit verbundenen Eiweiße vermutlich den der Entstehung des Synovialsarkoms zugrundeliegenden Mechanismus dar. Dieses Fusionsgen ist in mehr als 90 % aller Synovialsarkome zu finden, was auf dessen essentielle Bedeutung für die Tumorentstehung hindeutet.¹⁸

Eid *et al.*¹⁸ beschreiben als Ursache für die Entstehung des Synovialsarkoms das Zusammenwirken des oben beschriebenen Protoonkogens SYT mit dem Protein p300, welches eigentlich tumorsuppressive Wirkung besitzt. Bei p300

handelt es sich um einen Co-Aktivatoren verschiedener Transkriptionsfaktoren, der eine essentielle Bedeutung für verschiedenste zelluläre Prozesse hat, wie beispielsweise Reparatur beschädigter DNS, zelluläres Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Migration.¹⁹

Ein weiterer Mechanismus, der bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des Synovialsarkoms eine entscheidende Rolle spielt, ist nach Wakamatsu *et al.*⁷ die erhöhte Sekretion des Wachstumsfaktors „vascular endothelial growth factor“ (VEGF). Nach Bohn *et al.*²⁰ führt die oben beschriebene chromosomale Translokation SS18-SSX dazu, dass auch in Synovialsarkomzellen eine erhöhte Produktion von VEGF vorliegt, die zu Tumorgenese und -erhaltung beiträgt. Der Wachstumsfaktor führt in *in vitro* Synovialsarkom-Kulturen, welche die SS18-SSX Translokation aufweisen, zu zellulärem und sphäroidartigem Wachstum.⁷

Weiterhin kann das SYT-SSX Gen in Tumorzellen zu einem geringeren Adhäsionspotential dieser Zellen führen, wie in Adhäsionsassays gezeigt werden konnte.¹⁸ Zum anderen konnte die Wirksamkeit einer auf VEGF abzielenden anti-angiogenetischen Therapie gegen Synovialsarkome bewiesen werden. Der genaue Mechanismus, der dem VEGF-Signalweg zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das oben genannte Fusionsprodukt dazu führt, dass VEGF zu zellulärem Wachstum statt zu Differenzierung führt.⁷ Auf die Bedeutung des vom Synovialsarkom sezernierten VEGF auf die durch den Tumor angeregte Gefäßneubildung (Angiogenese) wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.2 Grundlagen der Angiogenese

Als Angiogenese wird das Aussprossen und die dichotome Verzweigung von bereits existierenden Blutgefäßen bezeichnet, wodurch sich die Gefäßdichte in einem gegebenen Gewebeareal vermehrt.

Physiologische Angiogenese während der Embryogenese, Skelettwachstum und Reproduktion unterliegt zu großen Teilen dem Schlüsselregulator VEGF.²¹ Endothelzellen werden durch VEGF dazu stimuliert, bestimmte Plasminogenaktivatoren und Proteasen auszuschütten. Diese Proteine führen zu einer Zersetzung der Basalmembran der Gefäße. So können die Zellen in die umgebende Matrix auswandern und sich hier nach erfolgter Migration, Proliferation und Differenzierung zu neuen Gefäßstrukturen mit eigenen Basalmembranen zusammenlagern.²² Physiologisch unterliegt das Wachstum und Aussprossen von Endothelzellen einem strengen Regelkreis. Entscheidend ist das Überwiegen von entweder pro- oder kontraangiogenen Faktoren wie beispielsweise enger Kontakt zur Nachbarzelle, Vorhandensein bestimmter Komponenten der extrazellulären Matrix oder endogener oder pharmakologischer VEGF-Inhibitoren.²³

Im Falle der pathologischen Neoangiogenese wird dieser strenge Regelkreis außer Kraft gesetzt. Hier erfolgt die Gefäßneubildung unkontrolliert von äußeren Einflussfaktoren. Diese Situation von unkontrollierter und desorganisierter Angiogenese findet man beispielsweise bei rheumatoider Arthritis, Diabetes und bei malignen Tumoren.²²

Laut Folkman²⁴ ist Neoangiogenese der essentielle Baustein beim Wachstum maligner Tumoren sowie deren metastatischer Ausbreitung. Er bezeichnet den Ausbruch des Tumors aus der streng geregelten Balance zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren als „angiogenen Switch.“ Tumoren, die diesen Switch noch nicht durchlaufen haben, befinden sich in einem frühen Stadium des Tumorwachstums. Sie werden im Falle epithelialer Tumoren auch „carcinoma in situ“ genannt, wachsen also noch nicht invasiv oder metastasierend, da sie die Basalmembran noch nicht durchbrochen haben. Der proangiogenetische Schalter steht also noch auf „off.“ Erfolgt dann dieser Switch aufgrund von Hypoxie, Onkogenaktivierung oder Tumorsuppressorinaktivierung, wechselt der Tumor in den proangiogenen Phänotyp „on.“ Der Tumor ist dann in das Gefäß-Rekrutment gewechselt und

überexprimiert proangiogenetische Faktoren wie VEGF. Hier lagern sich die Tumorzellen mehrschichtig an Mikrogefäße an und regen diese über die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel VEGF zur Angiogenese und verstärkter Endothelverzweigung an.

Bei der pathologischen Angiogenese ist die Gefäßneubildung nicht nur, wie beispielsweise bei der physiologischen Wundheilung im Erwachsenenalter transient, sondern dauerhaft aktiviert. Das führt dazu, dass normalerweise ruhende Gefäße kontinuierlich aussprossen und zum Tumorüberleben beitragen, indem sie die erforderlichen Nährstoffe liefern.²⁵

Neben der Neoangiogenese, die durch Wachstumsfaktoren wie VEGF induziert wird,²⁶ stellt die Hypoxie einen weiteren wichtigen Mechanismus für Gefäßneubildung dar. Ursache für die lokalisierte Gewebshypoxie stellen ein enormer Sauerstoffbedarf sowie schlechte Zirkulation dar.²⁷ Beides sind Situationen, wie sie in einem schnell wachsenden Tumor zu finden sind. Die Regulation der zellulären Antwort auf Hypoxie erfolgt überwiegend durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche „hypoxieinduzierbare Faktoren“ (HIF) genannt werden und stress- und hypoxiebedingte Zellsignalwege beeinflussen.²⁷ Nach Fong²⁸ steht die Akkumulation der aus heterodimeren Untereinheiten (α und β) bestehenden hypoxieinduzierten Faktoren in engem Zusammenhang mit Angiogenese. Bei der β -Untereinheit von HIF handelt es sich um ein konstitutiv exprimiertes Molekül. Die α -Untereinheit wird sauerstoffabhängig gebildet.²⁹ Unter Normoxie wird die α -Untereinheit dem Proteasom zur Degradation und somit zum Abbau übermittelt.³⁰ Unter Hypoxie stabilisiert sich sowohl die α - als auch die β -Untereinheit und formt die HIF.³¹ Sind diese in ausreichender Menge vorhanden, führt dies zur Expression einer Vielzahl proangiogener Proteine und Proteasen wie zum Beispiel VEGF³², Erythropoietin (EPO)³³ und Endothelin-1 (ET-1).³⁴

1.3 Das Prostata-spezifische Membran-Antigen (PSMA)

Prostata-spezifisches-Membranantigen (PSMA) oder Glutamat Carboxypeptidase 2 ist eine Zelloberflächen-Exopeptidase mit einem Molekulargewicht von 100kDa, die ursprünglich auf Prostatazellen sowie Prostatakarzinomzellen und deren Metastasen detektiert wurde.³⁵

Drachenberg *et al.*³⁶ und Israeli *et al.*³⁵ fanden signifikant erhöhte Serum-PSMA-Werte in Patienten mit fortgeschrittenem, nicht therapiertem Prostata-Karzinom als Ausdruck der Hochregulation der PSMA-Expression auf der Zelloberfläche von maligne entarteten Prostatagewebszellen. Diese Tumore wiesen eine starke Korrelation zwischen dem Level der Zelloberflächenexpression von PSMA und einer schlechteren Prognose der zugrundeliegenden Tumorerkrankung auf.

Die Anwendungen von Radioliganden-gebundenen PSMA-Antikörpern spielt heute in der Medizin eine zunehmende Rolle bei Diagnose, Staging, und Evaluation des Therapieansprechens beim Prostatakarzinom.³⁷ So stellt das 68Ga-PSMA PET/CT ein vielversprechendes Werkzeug zur Diagnose eines rezidierten Prostata-Karzinoms dar.³⁸ Kabasakal *et al.*⁴⁰ und Rahbar *et al.*³⁹ beschreiben die Behandlung von Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom mit Lu-177-PSMA-617-Radioligand als mögliche therapeutische Methode. Letztere untersuchten ein Patientenkollektiv mit metastasiertem kastrationsresistenten Prostatakarzinom (mCRPC) und fanden hier unter LU-177-PSMA-617-Radioligand-Therapie eine signifikant gesteigerte Überlebenszeit. In Korrelation zum Ansprechen auf die Antikörper-Therapie konnte auch biochemisch ein Absinken der PSA-Konzentration im Blut der Patienten festgestellt werden. Ahmadzadehfar *et al.*⁴¹ wiesen nach, dass eine solche verringerte PSA-Konzentration bei Patienten mit kastrationsresistentem, metastasierten Prostatakarzinom nach Lu-177-PSMA-617-Radioligand-Therapie mit einem verlängerten Gesamtüberleben einhergeht. Somit erbrachten die Autoren den eindeutigen Nachweis der klinischen Effektivität der Lu-177-PSMA-617-Radioliganden-Therapie.

1.4 PSMA als Marker der Tumorneovaskularisation

PSMA ist jedoch nicht nur im physiologischen sowie im maligne entarteten Prostatagewebe zu finden, sondern steht auch in Zusammenhang mit tumor-assoziiertes Neoangiogenese. Chang *et al.*⁴² fanden eine PSMA-Produktion und Expression in Endothelzellen von tumor-assoziiertes Gefäßneubildung, nicht jedoch in Endothelzellen von Gefäßen in gutartigen Geweben. Eine PSMA-Expression in tumorassoziiertes Neoangiogenese ist beispielsweise gesichert beim Lungenkarzinom⁴³ und beim multiformen Glioblastom.⁴⁴ Die PSMA-Expression konnten auch Chang *et al.*⁴⁵ bei einem großen Spektrum maligner Neoplasien nachweisen. Darstellbar war die Expression bei verschiedenen epithelialen Tumoren (Karzinomen), neuroendokrinen Tumoren, mesenchymalen Tumoren (Weichgewebstumoren), sowie in malignen Melanomen und Gliomen.

Nguyen *et al.*⁴⁶ untersuchten verschiedene Arten von epithelialen Tumoren (Karzinomen) auf ihre *in vitro* Fähigkeit, in tumorassoziiertes Gefäßneubildungen PSMA zu induzieren. Insgesamt induzierten 10 von 14 untersuchten Karzinomarten PSMA in der Neovaskulatur. Hierbei handelte es sich um Karzinomzellen aus Niere, Colon, Mamma, Prostata, Ovar und Lunge. Von den fünf untersuchten Protatakarzinomzelllinien regten vier die umliegenden Endothelzellen zu einer Expression von PSMA an.

Meine Arbeitsgruppe untersuchte in dieser Dissertation vorangehenden Arbeiten die PSMA-Induktion in der Gefäßneubildung bei unterschiedlichen Sarkomarten.⁴⁷ Eine PSMA-Expression konnte in tumorassoziiertes Gefäßen von 151 von 779 (19,4 %) verschiedenen Weichgewebs- und Knochensarkomen nachgewiesen werden. Weiterhin beschäftigten sich Heitkötter *et al.*⁴⁸ mit der neovaskulären PSMA-Expression in Schilddrüsenläsionen. Die PSMA-Expression in 57,1 % aller malignen Tumoren war signifikant höher als in benignen Tumoren (13,2 %). Stock *et al.*⁴⁹ fanden eine neovaskuläre PSMA-Expression bei 53,2 % aller von ihnen untersuchten duktales Adenokarzinome des Pankreas. Tabelle 1 gibt eine aktuelle

Literaturübersicht über die PSMA-Expression in der Neovaskulatur verschiedener Tumorentitäten wieder.

Tumorlokalisation	Tumorentität	Neovaskuläre PSMA-Expression
Pankreas	Duktales Adenokarzinom	39/61 (Stock <i>et al.</i> ⁴⁹ 2017)
Nebenniere	Adrenocorticales Karzinom	12/15 (Crowley <i>et al.</i> ⁵⁰ 2016)
Knochen	Osteosarkom	21/45 (Zeng <i>et al.</i> ⁵¹ 2012)
	Ewingsarkom	23/183 (Heitkötter <i>et al.</i> ⁴⁷ 2017)
Brust	Invasives duktales Karzinom/ duktales carcinoma in situ	82/106 (Wernicke <i>et al.</i> ⁵² 2014)
Kopf und Hals	Plattenepithelkarzinom	72/96 (Haffner <i>et al.</i> ⁵³ 2012)
Darm	Kolorektales Adenokarzinom	75/100 (Abdel-Hadi <i>et al.</i> ⁵⁴ 2014)
Niere	Klarzelliges Nierenzellkarzinom	188/288 (Spatz <i>et al.</i> ⁵⁵ 2017)
	Chromophobes Nierenzellkarzinom	9/15 (Al-Ahmadie <i>et al.</i> ⁵⁶ 2008)
Leber	Hepatozelluläres	38/42 (Denmeade <i>et</i>

	Karzinom	<i>al.</i> ⁵⁷ 2012)
Lunge	Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom	74/87 (Wang <i>et al.</i> ⁴³ 2015)
Haut	Melanom	25/44 (Denmeade <i>et al.</i> ⁵⁷ 2012)
Weichgewebe	Multiple benigne und maligne Weichgewebstumoren	151/779 (Heitkötter <i>et al.</i> ⁴⁷ 2017)
Magen	Adenokarzinom	79/119 (Haffner <i>et al.</i> ⁵⁸ 2009)
Schilddrüse	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	61/120 (Bychkov <i>et al.</i> ⁵⁹ 2017)
	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	24/58 (Battifora ⁶⁰ 2017)
Harnwege und Blase (außer Niere)	Urothelkarzinom der Harnblase	6/6 (Chang <i>et al.</i> ⁴⁵ 1999b)

Tabelle 1: PSMA-Expression in tumorassoziierter Neovaskularisation.

1.5 Ziele der Arbeit

Eine PSMA-Expression findet sich gemäß aktuellen Forschungsergebnissen nicht nur in Prostata- oder Prostatakarzinomgewebe, sondern auch in der Neovaskulatur unterschiedlicher Tumoren. Dieses Phänomen konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits vorab bei unterschiedlichen soliden Tumoren (Lungenkarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, Pankreaskarzinomen) und unterschiedlichen Weichgewebstumoren (Sarkomen) beschrieben werden.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen, soll in dieser Arbeit zunächst die PSMA-Expression der Neovaskulatur in einem Probenkollektiv von Synovialsarkomen bestimmt werden. Hierzu wird zunächst ein Kollektiv von Synovialsarkom-Gewebeproben in Tissue Micro Arrays (TMA) überführt. Die Bestimmung der PSMA-Expression soll immunhistochemisch durchgeführt werden. Über eine Co-Expression von CD31, einem Gefäßmarker, soll die PSMA-Expression in den tumorassoziierten Gefäßen lokalisiert werden. Alle Schnittpräparate sollen dann digitalisiert werden. Die Ergebnisse werden sowohl semi-quantitativ als auch computergestützt erfasst. Zusätzlich sollen alle relevanten klinisch-pathologischen Daten der Tumor-Proben zusammengetragen werden, um mögliche Korrelationen aufzudecken.

In einem weiteren Schritt soll eine mögliche PSMA-Induktion in tumorassoziierten Gefäßneubildungen *in vitro* weitergehend untersucht werden. Hierzu werden Endothelzellmodelle etabliert, mit denen die Hypothese überprüft werden soll, ob Synovialsarkomzellen über „Crosstalk“ in diesen Endothelzellen eine PSMA-Expression induzieren, und ob eine PSMA-Expression in Endothelzellen durch Hypoxie induzierbar ist.

2. Material und Methoden

Im Folgenden wird ein Überblick über die angewandten Materialien und Methoden gegeben.

2.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben

Nach Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen Wilhelms-Universität wurde ein Kollektiv von 37 an einem Synovialsarkom erkrankten Patienten im Alter von neun bis 77 Jahren zusammengestellt (Ethikantrag „PSMA in soliden Tumoren“, AZ: 2016-445-f-S). Von jedem dieser Patienten stand Tumorgewebe als formalinfixiertes (FFPE)-Material zur Verfügung.

2.1.1 Tissue Microarray

Die Technik des Tissue Microarrays (TMA), erstmals beschrieben von Battifora⁶⁰, erlaubt es, kleine repräsentative Gewebeausschnitte verschiedener Fälle auf einen einzigen Objektträger aufzutragen und diese mit hohem Durchsatz zeitgleich zu analysieren. Zur Herstellung der TMAs wurden zunächst zylindrische Gewebstücke (Cores) mit einem Durchmesser von 1mm aus verschiedenen Paraffinblöcken ausgestanzt, und anschließend an genau definierten Stellen auf einen Microarray-Paraffinblock aufgetragen. Pro Patientengewebeprobe wurden mindestens zwei repräsentative Gewebeareale bestimmt und gestanzt. Als Negativkontrollen wurden die Zelllinien SYO-1, CME-1, HS-SYII, FUJI und 1273/99 verwendet. Zwei erfahrene Pathologen beaufsichtigten die korrekte Gewebeentnahme und überprüften, ob die TMAs richtig angelegt wurden. Von den erhaltenen TMAs wurden dann Leerschnitte angefertigt für die immunhistochemische Färbung der Zielstrukturen.

2.1.2 Immunhistochemie

Mithilfe des immunhistochemischen Färbeautomaten von Ventana BenchMark (Ventana Medical System, Ventana, USA) wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte gemäß Herstellerangaben gefärbt. Die Schnitte wurden zunächst mit Xylen

deparaffiniert und mithilfe einer absteigenden Ethanolreihe bei Raumtemperatur rehydriert. Die Inkubation der Schnitte mit den Primärantikörpern erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Folgende Verdünnungen wurden verwendet: monoklonaler Maus-Anti-PSMA-Antikörper (Klon 3E6, Ventana, Deutschland) in 1:50 Verdünnung und monoklonaler Anti-CD31-Antikörper (Klon QBEnd10, Ventana, Deutschland) in einer gebrauchsfertigen Konzentration von 0,8 µm/ml. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen und mit den biotinylierten Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur inkubiert. Visualisiert wurden die Immunreaktionen mit dem Substrat 3-Amino-9-Ethylcarbazole (Ventana Optiview DAB IHC detection KIT, Ref: 760-700, Deutschland). Als Positiv-Kontrolle diente Prostatakarzinomgewebe.

2.1.3 Bestimmung der PSMA-Expression

Hierbei wurden die tumorassoziierten Gefäße auf die Expression von PSMA untersucht. Um zu verifizieren, dass es sich bei dem Gewebe tatsächlich um Endothel handelt, wurden die Proben mit dem Oberflächenmarker Anti-CD31 gegengefärbt. Zum einen wurde der Anteil der PSMA-anfärbenden Gefäße an der Gesamtheit der Gefäße in drei Gruppen unterteilt. Hier wurde zwischen dem Anteil der gefärbten Gefäße in den Kategorien > 5 %, < 5 % oder 0 % unterschieden. Zum anderen wurde eine semiquantitative Einteilung nach der Färb-Intensität in vier Kategorien vorgenommen: 3 steht für hohe, 2 für mittlere, 1 für geringe und 0 für keine Intensität. Handelte es sich um ein heterogenes Färbemuster, wurde das Muster ausgewählt, das anteilmäßig vorherrschend war. Aus diesen Rohdaten wurde ein Färbeindex (Labelling Index „LI“) ermittelt. Eine schwache (1) oder moderate (2) Färbeintensität in < 5 % der Neovaskulatur und eine schwache (1) Färbeintensität in > 5 % der Neovaskulatur wurde der Gruppe „geringe Expression“ (PSMA LI 1) zugeordnet. Eine moderate (2) Anfärbung in > 5 % der Neovaskulatur und eine starke (3) Anfärbung der Neovaskulatur wurde der Gruppe „starke Expression“ (PSMA LI 2) zugeordnet. Diese semi-quantitative Auswertemethode wurde bereits an anderen Probenkollektiven etabliert.⁴⁷

2.1.4 Bestimmung der Mikrogefäßdichte

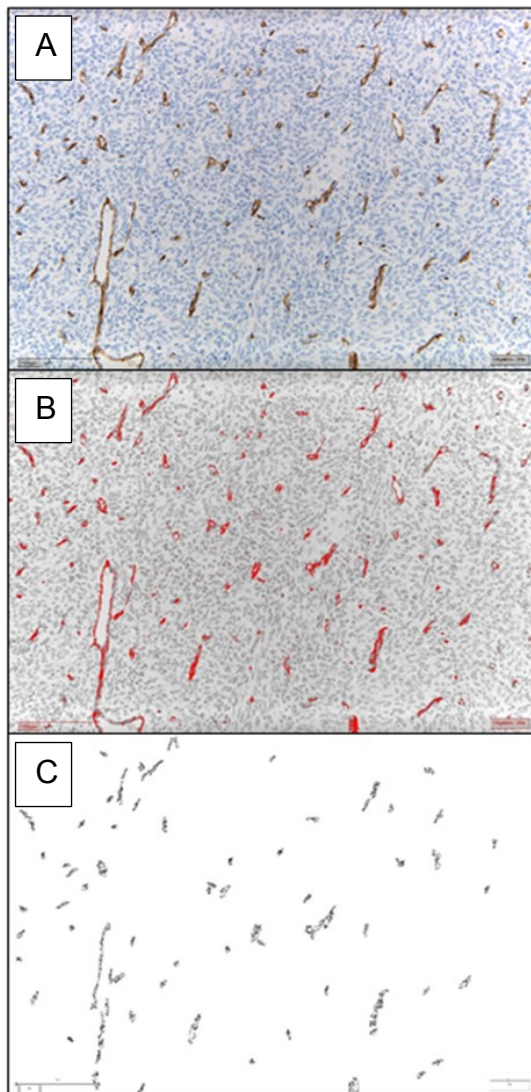


Abbildung 2: Bestimmung der Mikrogefäßdichte an den immunhistochemisch gefärbten Präparaten.

Für die Korrelation von neovaskulärer Expression von PSMA und der Dichte der tumorassoziierten Gefäße, wurde zunächst die Mikrogefäßdichte bestimmt. Abbildung 2 zeigt exemplarisch die Methodik der Bestimmung. Dafür wurden die CD31-gefärbten TMAs mit einem digitalen Scanner (Leica SCN400) automatisiert gescannt (Abbildung 2A). Die Mikrogefäßdichte pro TMA-Core wurde mit Image J (NIH, Maryland, USA) bestimmt und quantifiziert. Bei dem benutzten Protokoll wurden zunächst die Farbkanäle gesplittet und dann die Umrisse von CD31-positiven Gefäßen detektiert (Abbildung 2B). Im Anschluss wurden Objekte, die den vordefinierten Kriterien entsprachen (Größe,

Rundheit), automatisch für die Fläche des gesamten TMA-Core (0,785 cm²) ausgewertet (Abbildung 2C).⁴⁷

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

Die Zelllinie Syo-1 (Synovialsarkomzelllinie) wurde in DMEM + GlutaMAX-1 mit 10 % FBS kultiviert. CME (Synovialsarkomzelllinie), 22RV1 und PC-3 (Prostatakarzinomzelllinien) wurden in RPMI + GlutaMAX-1 mit 10 % FBS kultiviert (alle Reagenzien von GIBCO Life Technologies).

2.2.2 Kultivierung von HUVECs

HUVECs wurden in Endothelial Cell Growth Medium + SupplementMix kultiviert. Das Endothezellmedium setzte sich insgesamt zusammen aus Fetal Calf Serum (0.02 ml/ml), Endothelial Cell Growth Supplement (0.004 ml/ml) Epidermal Growth Factor (recombinant human; 0.1 ng/ml), Basic Fibroblast Growth Factor (recombinant human; 1ng/ml), Heparin (90 µg/ml) und Hydrocortisone (1 µg/ml). Alle Zellen wurden bei 37°C in einem feuchten Klima mit 5 % CO₂ in einem Brutschrank inkubiert und bei subkonfluenter Kultur (ca. 70 % Zelldichte) passagiert.

2.2.3 Herstellung des tumor-konditionierten Mediums

Mit Hilfe der folgenden Zelllinien wurde tumorkonditioniertes Medium (TKM) hergestellt: Syo-1, CME, 22RV1 und PC-3. Zur Herstellung von TKM wurde die jeweilige Tumorzellart in Zellkulturflaschen (75 cm²) kultiviert bis sich ein 90-100 % konfluenter Monolayer ausbildete. Mit 15 ml frischem, supplementiertem Medium wurden die Zellen anschließend weitere 72 h kultiviert. Danach wurde das konditionierte Medium abgenommen und bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das TKM wurde entweder sofort verwendet oder bei -20°C gelagert. Das TKM wurde 1:1 mit Endothelial Cell Growth Medium + Supplement Mix verwendet.

2.2.4 Inkubation von HUVECs mit TKM

HUVECs wurden mit einer Zellzahl von circa 100.000 in 6-Well-Platten ausgesät und in einem Verhältnis von 1:1 in supplementiertem Endothelial Cell Growth Medium und TKM, welches gemäß der oben erläuterten Theorie PSMA-induzierende Wachstumsfaktoren enthielt, inkubiert. Nach 96 h wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst. Es folgten zwei Waschschrte mit supplementiertem Medium und PBS. Nachfolgend wurden die Zellen für die Proteinisolierung und den anschließenden Western Blot auf Eis gelagert.

2.2.5 Inkubation von HUVECs mit DMOG

In 6-Well-Platten ausgesäte HUVECs wurden bei einer Konfluenz von ungefähr 70 % mit PBS gewaschen und mit Medium ohne Supplemente kultiviert. Diese Phase des Serumentzugs wurde über Nacht aufrechterhalten. Anschließend wurde das Medium entfernt und zur Hypoxieinduzierung durch 171 mM DMOG (Dimethyloxalylglycine, N-(Methoxyoxoacetyl)-glycine-methyl-ester) gelöst in DMSO (Konzentration von DMOG in der DMOG-DMSO-Stock-Lösung: 30 mg/ml) und Endothelial Cell Growth Medium, ersetzt. Bei der Kontrollgruppe wurde das Medium durch DMSO und Endothelial Cell Growth Medium ersetzt. Die Inkubationsphase mit diesem Medium betrug 24 beziehungsweise 48 h. Aus den Zellen wurden anschließend Proteinlysate gewonnen, die mittels eines Western Blots analysiert wurden.

2.3 Methoden der Proteinanalytik

Das folgende Kapitel legt die verwendeten Methoden zur Proteinanalytik dar.

2.3.1 Proteinisolation

Zunächst wurden die 70 – 80 % konfluent gewachsenen Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mittels Cell Lysis Buffer (10x) und Protease/Phosphatase Inhibitor (100x) abgelöst. Das gewonnene Proteinlysate wurde für 10 min auf Eis inkubiert und dann für 10 min bei 16.000 rpm und 4°C

zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt.

2.3.2 Bradford Assay

Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Lysate erfolgte mittels Bradford Assay. Hierbei wurde 1 µl Proteinlysate in 100 µl Bradford-Reagenz verdünnt und nach einer 10-minütigen Inkubationsphase im GloMax-Multi Detection System gemessen.

2.3.3 Gelelektrophorese und Transfer Blotting

Nach erfolgter Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate und Versetzen mit 4x Bolt LDS Sample Buffer und 10x Bolt Sample Reducing Agent (beides Thermo Fisher) wurden die Proben bei 95°C für 5 min erhitzt. Die Proben wurden auf ein SDS-Page-Gel (4-12 % Bis-Tris Plus; Invitrogen) aufgetragen. Pro Well wurden dabei vergleichbare Mengen Protein (zwischen 15-25 ng) eingesetzt. Die Gelelektrophorese wurde bei 150 Volt für 80 Minuten durchgeführt. Anschließend erfolgte das Transfer Blotting auf eine Nitrocellulose-Membran bei 20 Volt für 150 min. Der erfolgreiche Proteintransfer wurde mithilfe der Ponceau-Rot-Färbung überprüft.

2.3.4 Antikörperinkubation und Proteindetektion

Die Membranen wurden mit 5 % Trockenmilch/TBST für 60 Minuten geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Der Primärantikörper Prostate specific membrane antigen (D4S1F; rabbit mAb) wurde in der Verdünnung 1:1000 über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde der peroxidase-gekoppelte anti-rabbit-Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:5000 in Trockenmilch/TBST für eine Stunde auf die Membran gegeben. Nach erneutem Waschen mit TBST erfolgte die Detektion mit dem Signal Fire ECL Reagenz im Molecular Imager ChemiDoc XRS System. Die Loadingkontrolle der einzelnen Proteinlysate erfolgte durch die simultane Detektion von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) der jeweiligen Proben.

2.4 Auswertung und Statistik

Zum Vergleich kontinuierlicher, normalverteilter Variablen zwischen zwei Gruppen wurde der studentische T-Test, zwischen mehr als zwei Gruppen die Varianzanalyse mit multiplen Gruppenvergleichen (Tukey/Kruskal-Wallis-Test) durchgeführt. Die Untersuchung auf dichotome Variablen erfolgte mittels Chi-Quadrat- bzw. exaktem Fisher-Test. Für alle statistischen Analysen wurde die Software GraphPadPrism (GraphPad, LaJolla, USA) verwendet. Als obere Grenzwelle für Signifikanz wurde ein p-Wert von 0.05 festgelegt.

2.5 Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

Die Tabellen 2 bis 4 fassen die verwendeten Geräte, Materialien und Chemikalien zusammen.

Gerät	Hersteller
Autoklav VX-150	Systec GmbH, Deutschland
Binokular-Mikroskop IX73	Olympus Deutschland GmbH, Deutschland
Glow-Max Multi Detection System	Promega Corporation, USA
Heizblock ThermoMixerC	Eppendorf AG, Deutschland
Immunhistochemischer Färbeautomat Ventana BenchMark	Ventana Medical System, Ventana, USA
Invitrogen Novex XCell SureLock Mini-Cell and XCell II Blot Module (SDS-Page)	Thermo Fisher Scientific, USA
Kryo-Gefrierbehälter 5100-0001	Thermo Fisher Scientific, USA

Leica SCN400	Leica Biosystems Nußloch GmbH, Deutschland
Mikroskop System IX73	Olympus Deutschland GmbH, Deutschland
Mini Gel Tank (Blotting)	Thermo Fisher Scientific, USA
Molecular Imager ChemiDoc XRS System	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG, Deutschland
Thermal Cycler C1000 Touch	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Vacusafe	INTEGRA Biosciences, Schweiz
Vortexer	IKA Werke GmbH und Co. KG, Deutschland
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Deutschland
Wasserfilteranlage (bidest. H ₂ O) Elix 5	Merck Millipore, Deutschland
Wippschüttler, Shaker DRS-12	Neolab, Deutschland
Zentrifuge (5415R, 5804R)	Eppendorf AG, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Geräte

<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>
Cryo-Tubes, 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific, USA

Desinfektionsmittel pursept A Xpress	Schülke & Mayr, Deutschland
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich
HUVEC-c pooled	PromoCell, Deutschland
Pasteurpipetten (150 mm, 230 mm)	Brand GmbH und Co. KG, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt, Deutschland
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning incorporated, USA
Zellkulturflasche (250 ml, 75 cm ²)	Greiner Bio-One International GmbH, Österreich

Tabelle 3: Verwendete Materialien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
0,25 % Trypsin-EDTA	GIBCO Life Technologies, USA
3-Amino-9-Ethylcarbazole	Ventana, Deutschland
Biotinylierte Sekundärantikörper	Ventana, Deutschland
Blotting Grade Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) (Human IgG Adsorbed) Horseradish Peroxidase Conjugate (1:5000) in Milch (5 % in TBST)	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, USA

DMEM + GlutaMAX-I (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	GIBCO Life Technologies, USA
DMSO (Dimethyl Sulfoxide for cell culture)	AppliChem GmbH, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium + SupplementMix	PromoCell GmbH, Deutschland
Ethanol (EtOH 100 %)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland
Fetal Calf Serum	GIBCO Life Technologies, USA
DMOG (Dimethyloxalyglycine N-(Methoxyoxoacetyl)-glycine-methyl-ester)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)-Antikörper	Cell Signaling Technology, USA
Milchpulver Blotting grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Monoklonaler Anti-CD31-Antikörper (Klon QBEnd10)	Ventana, Deutschland
Monoklonaler Maus-Anti-PSMA-Antikörper (3E6)	Ventana, Deutschland
MOPS SDS Running Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific, USA
Pierce 20X TBS Tween 20 Buffer	Thermo Fisher Scientific, USA
Prostate Specific Membrane Antigen (D4S1F) Rabbit mAb (1:1000) in	Cell Signaling Technology, USA

Milch (5 % in TBST)	
Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)	Cell Signaling Technology, USA
RPMI + GlutaMAX-I	GIBCO Life Technologies, USA
SignalFire ECL Reagent	Cell Signaling Technology, USA
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	GIBCO Life Technologies, USA
SignalFire Elite ECL Reagent	Cell Signaling Technology, USA
Xylen	Carl Roth GmbH & Co.KG, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit dargestellt.

3.1 Patientenkollektiv

Bei den untersuchten Proben handelt es sich um 38 Tumorpräparate, die von 37 an einem Synovialsarkom erkrankten Patienten stammen. Die Altersspanne des Patientenkollektivs lag zwischen neun und 77 Jahren, wobei das Durchschnittsalter 43,3 Jahre betrug. Zur Untersuchung lagen die Proben von 21 männlichen (56,8 %) und 16 weiblichen Patienten (43,2 %) vor. Histologisch lag in 18 Fällen (48,6 %) ein monophasisches, in sieben Fällen (18,9 %) ein biphasisches und in 12 Fällen (32,4 %) ein nicht differenziertes Synovialsarkom vor.

Bei den untersuchten Proben handelt es sich um Synovialsarkome unterschiedlicher Lokalisation. Bei 20 Fällen (54,1 %) handelt es sich um proximal am Rumpf gelegene Neoplasien in Pharynx, Omentum, Lunge, Leber, Niere, Becken, Thoraxwand, Schulter, Herz, Bauchdecke und Gesäß. 13 Fälle (35,1 %) betrafen Extremitäten (Fuß, Ober- und Unterarm, Ober- und Unterschenkel).

3.2 Detektion von PSMA *in vivo*

3.2.1 PSMA-Expression in Tumorgewebeproben

Die PSMA-Expression wurde an allen Tumorproben immunhistochemisch bestimmt. Abbildung 3 zeigt repräsentative Färbeergebnisse.

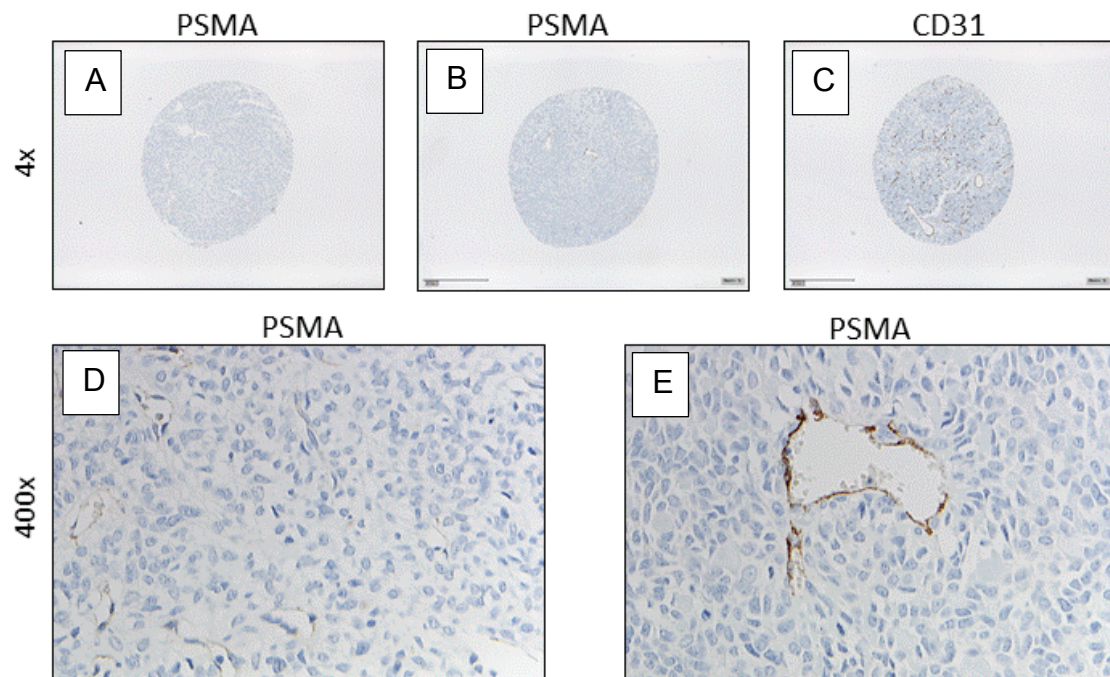


Abbildung 3: Repräsentative immunhistochemische Färberegebnisse der Studie. In (A) und (D) erkennt man praktisch keine PSMA-Expression (=negatives Färberegebnis). In (B) und (E) sieht man eine starke neovaskuläre PSMA-Expression (=positives Färberegebnis). In (C) ist eine Gegenfärbung mit Antikörpern gegen CD31 (als Gefäßmarker) gezeigt.

Eine geringe PSMA-Expression (PSMA LI 1 siehe Seite 17) wurde in 22,9 % der Proben in der Neovaskulatur nachgewiesen. Eine starke PSMA-Expression (LI 2) zeigte sich in 12,5 % der untersuchten Synovialsarkomproben. Insgesamt wurde in 65,7 % der Proben keine PSMA-Expression in der Neovaskulatur und somit ein LI von 0 festgestellt. Zwei Proben waren aufgrund von unzureichender Qualität nicht auswertbar (NA). Bei den Tumorzellen selbst konnte keine PSMA-Expression festgestellt werden. Tabelle 5 zeigt eine detaillierte fallbezogene Auswertung.

Fallnummer	Anteil PSMA-positiver Neovaskulatur	Intensität der PSMA-Färbung* der Neovaskulatur	Labelling Index** der Neovaskulatur
1	> 5 %	3	2
2	> 5 %	3	2
3	< 5 %	3	2
4	> 5 %	3	2
5	< 5 %	2	1
6	< 5 %	2	1
7	< 5 %	1	1
8	< 5 %	1	1
9	< 5 %	1	1
10	< 5 %	1	1
11	< 5 %	1	1
12	< 5 %	1	1
13 - 35	0	0	0
36, 37	NA	NA	NA

Tabelle 5: Immunhistochemisches Expressionsmuster von PSMA in den Gewebeproben.

*Intensität der PSMA-Anfärbung: negativ (0), schwach (1 = kaum wahrnehmbare Färbung bei High-Power-Vergrößerung; 400x), moderat (2 = leichte Färbung bei Low-Power-Vergrößerung; 40x), oder stark (3)

**Labelling Index: Eine schwache (1) oder moderate (2) Färbeintensität in < 5 % der Neovaskulatur und eine schwache (1) Färbeintensität in > 5 % der Neovaskulatur wurde der Gruppe „geringe Expression“ (PSMA LI = 1), wohingegen eine moderate (2) Anfärbung in > 5 % der Neovaskulatur und eine starke (3) Anfärbung der Neovaskulatur der Gruppe „starke Expression“ (PSMA LI = 2) zugeordnet wurde; NA: nicht auswertbar.

3.2.2 Korrelation von PSMA-Expression mit klinischen, histologischen und genetischen Parametern

Nach der immunhistochemischen Expressionsauswertung wurde geprüft, ob es mögliche Zusammenhänge zwischen den als PSMA-positiven und -negativen klassifizierten Tumoren und verschiedenen klinischen, histomorphologischen und genetischen Parametern vorliegen. Die untersuchten Charakteristika sind in Abhängigkeit vom PSMA-Expressionsniveau in Tabelle 6 dargestellt.

In der untersuchten Patientengruppe besteht kein Zusammenhang zwischen Patientenalter und PSMA-Expression, wie es in Abbildung 4 zu sehen ist. Weiterhin ließ sich keine Korrelation zwischen den Parametern Patientengeschlecht, Histologie und Breakpoint der Tumoren und PSMA-Expression nachweisen.

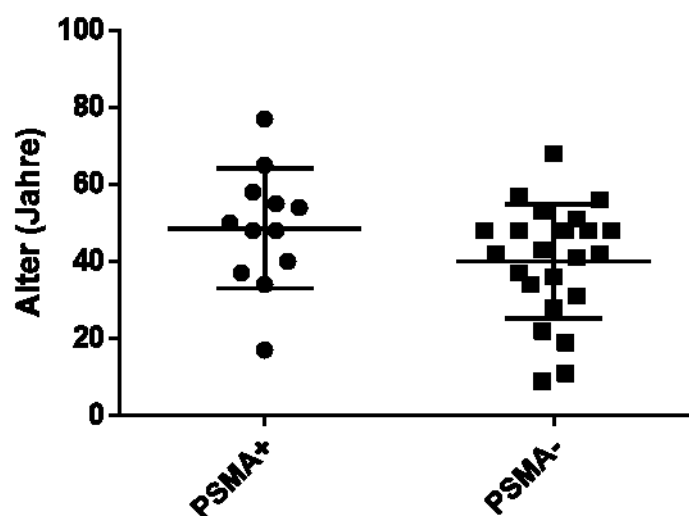


Abbildung 4: Vergleich zwischen PSMA-Expression und Patientenalter.

Abbildung 5 zeigt, dass zwischen Tumorgöße und PSMA-Expression der Trend zu einer höheren neovaskulären Expression von PSMA in größeren Tumoren besteht. Die Größe eines durchschnittlichen PSMA-positiven Tumors betrug 2650 cm^3 , somit das 9,4-fache Volumen eines durchschnittlichen PSMA-

negativen Tumors, welches 285 cm^3 betrug. Dieser Zusammenhang war aber nicht statistisch signifikant ($p=0,0935$).

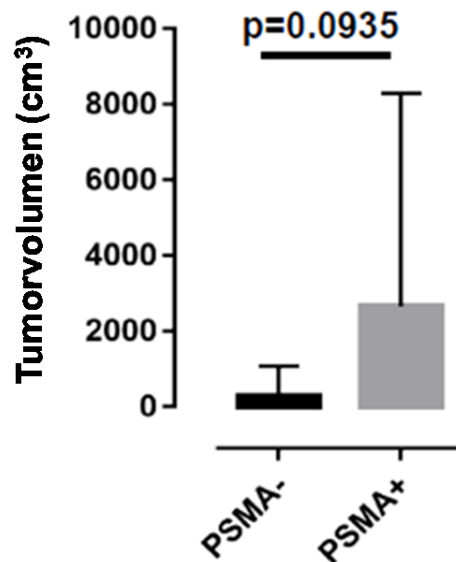


Abbildung 5: Vergleich zwischen PSMA-Expression und Tumorvolumen.

Weiterhin wurde überprüft, ob eine Korrelation zwischen der Dichte der tumorassoziierten Gefäße und deren PSMA-Expression besteht. Die PSMA-positiven Proben wiesen eine durchschnittliche Mikrogefäßdichte von $160,7 \pm 14,7$ pro Core auf. Die gemittelte Mikrogefäßdichte der PSMA-negativen Neovaskulatur betrug hingegen nur $67,5 \pm 8,5$ pro Core. Dieser Unterschied war, wie in Abbildung 6 dargestellt, statistisch signifikant. Je höher die Gefäßdichte ist, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit für PSMA-positive Gefäße.

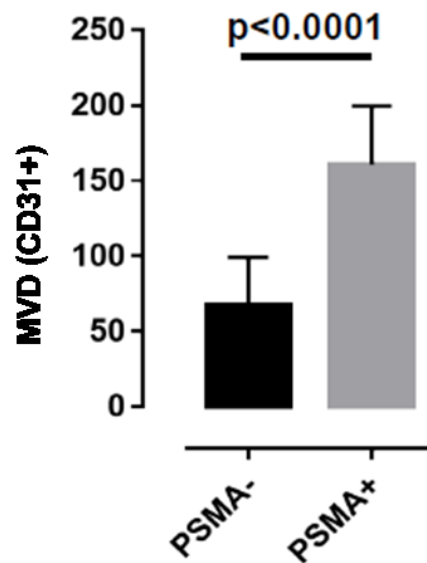


Abbildung 6: Vergleich zwischen PSMA-Expression und Mikrogefäßdichte.

Charakteristika	PSMA-positiv	PSMA-negativ	p-Wert
<u>Proben</u>	13	22	-
<u>Alter</u>			
Mittelwert	48,2	39,9	0,1186
Median	48	42	
Altersspanne	17 - 77	9 - 68	
<u>Geschlecht</u>			
Männlich	10	10	0,0891
Weiblich	3	12	
<u>Histologie</u>			
Monophasisch	8	9	0,66
Biphasisch	2	4	
Nicht differenziert	3	9	

<u>Breakpoint</u>			
SSX1	6	10	0,4341
SSX2	5	4	
Nicht differenziert	0	6	
<hr/>			
<u>Tumorzvolumen</u>	2650 +/- 2304 cm ³	282 +/- 191 cm ³	0,0935
<hr/>			
<u>Mikrogefäßdichte</u>	161 +/- 15 Gefäße/Core	68 +/- 8 Gefäße/Core	< 0,0001
<hr/>			

Tabelle 6: Korrelation von neovaskulärer PSMA-Expression mit verschiedenen klinischen, histomorphologischen und genetischen Parametern.

3.3 Detektion von PSMA *in vitro*

Mithilfe der nachfolgend beschriebenen Experimente wurde anschließend versucht, aufbauend auf den vorangegangenen TMA-Beobachtungen, in der Zellkultur PSMA in HUVECs zu induzieren. Die Detektion von PSMA auf Proteinebene erfolgte mithilfe von Western Blots. Die Sensitivität und Spezifität des PSMA-(D4S1F)-Antikörpers wurde anhand von Proteinlysate der PSMA-positiven Prostatakarzinomzelllinie 22RV1 validiert, welches im Folgenden als Positivkontrolle diente.

3.3.1 Endogene und induzierte PSMA-Expression in HUVECs

Zunächst wurde mittels Western Blot Analyse nachgewiesen, dass HUVECs keine endogene PSMA Expression aufweisen (Abbildung 7). Wie weiterhin dargestellt, konnte PSMA auch in den mit TKM-inkubierten HUVECs nicht nachgewiesen werden.

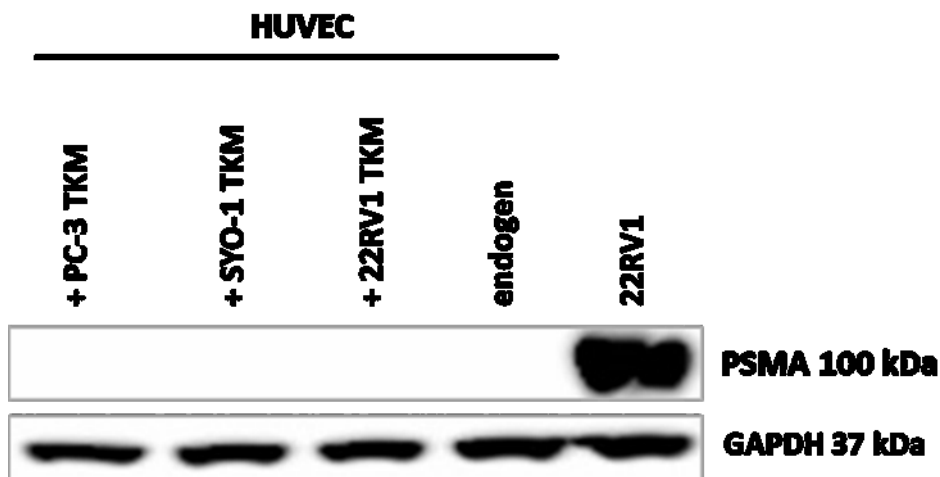


Abbildung 7: Western Blot HUVECs-Inkubation mit TKM.

3.3.2 Kultivierung der HUVECs mit DMOG

HUVECs wurden über 24 h beziehungsweise 48 h mit DMOG (Dimethyloxallylglycine N-(Methoxyoxoacetyl)-glycine-methyl-ester) und entsprechendem HUVEC-Medium inkubiert. DMOG ist ein zellgängiger Prolyl-4-Hydroxylase-Inhibitor, welcher HIF (hypoxie-induzierbarer Faktor) intrazellulär hochreguliert. Über diesen chemischen Mechanismus wird in der Zelle Hypoxie simuliert. Anschließend wurde das HUVECs-Proteinlysate mittels Western Blot auf PSMA untersucht. Bei der Auswertung des Western Blots wurde, wie in Abbildung 8 zu sehen ist, kein PSMA in den Proteinlysaten der mit DMOG inkubierten HUVECs nachgewiesen.

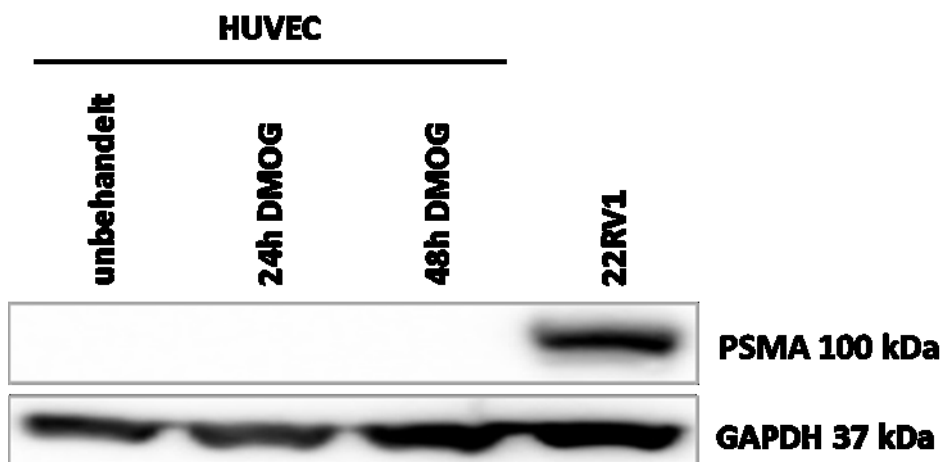


Abbildung 8: Western Blot HUVECs-Inkubation unter Hypoxie.

4. Diskussion

PSMA (prostataspezifisches Membran-Antigen) ist ein transmembranäres Oberflächenmolekül mit organspezifischen enzymatischen Eigenschaften. Das Molekül wird physiologisch in Zellen der Prostata exprimiert.³⁵ Eine starke Zunahme der PSMA-Oberflächenmoleküle findet bei einer karzinomatösen Umwandlung des Prostatagewebes statt und korreliert mit einem PSA-Anstieg.^{61,62} Seit kurzer Zeit wird Radionuklid-konjugiertes-PSMA in der urologischen Nuklearmedizin zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken bei Patienten mit einem metastasierten Prostatakarzinom eingesetzt (sog. „PSMA-Therapie“).⁶³

Aktuellere Studien konnten PSMA auch in der tumorassoziierten Neovaskulatur von epithelialen Tumoren (Karzinomen), neuroendokrinen Tumoren, mesenchymalen Tumoren (Weichgewebstumoren) sowie in malignen Melanomen⁵⁷ und Gliomen⁶⁴ wie dem Glioblastoma multiforme⁶⁵ nachweisen. Unter den Karzinomen wurde dieser Effekt für Pankreas^{66,67}, Niere^{55,56,67} und Blase^{45,67}, Schilddrüse⁶⁸, Mamma⁵², Ovar, Cervix und Endometrium⁶⁹ und Lunge⁷⁰ nachgewiesen. Der genaue Mechanismus dieser Überexpression ist noch unverstanden, eine Rolle von VEGF und anderen Angiogenesefaktoren wird jedoch diskutiert; es wird vermutet, dass PSMA für die Invasion von Endothelzellen im Rahmen der Gefäßneubildung benötigt wird.^{71,72}

Prinzipiell ergibt sich aus der Expression die Fragestellung, ob die PSMA-Expression auch bei anderen Tumoren als dem Prostatakarzinom für diagnostische und/oder therapeutische Zwecke genutzt werden kann.

Lange Zeit war hinsichtlich der Expression von PSMA bei Weichgewebstumoren nur wenig bekannt. In Münster gibt es ein Referenzzentrum für Weichgewebs- und Sarkompathologie und es kann auf eine große Kohorte von bereits klassifizierten, teilweise sehr seltenen Tumoren zurückgegriffen werden. Kürzlich untersuchten Heitkötter *et al.*⁴⁷, ob es bei Weichgewebstumoren und Sarkomen eine Expression von PSMA gibt. Eine

Tumorzellexpression konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch gab es häufig eine PSMA-Expression in der Neovaskulatur der Tumore. Hierbei zeigte sich, dass der Anteil stark PSMA-exprimierender tumorassoziierter Gefäße beim Synovialsarkom am höchsten war.

Beim Synovialsarkom handelt es sich um einen malignen Weichgewebstumor, der vor allem junge Erwachsene mit einem durchschnittlichen Diagnosealter von 35 Jahren betrifft.⁷³ Die Früh- und Spätmetastasierungsrate ist beim Synovialsarkom relativ hoch, wobei die Therapiemöglichkeiten, abgesehen von einer R0-Resektion bei lokalem Tumor, und deren Effektivität sehr begrenzt sind.⁷⁴ Auf Grundlage der oben genannten Forschungsergebnisse von Heitkötter *et al.*⁴⁷ ist die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation, die neovaskuläre PSMA-Expression bei Synovialsarkomen zu charakterisieren.

Im ersten Teil der hier vorliegenden Dissertation sollte daher an einer neuen Fallkohorte von Patienten mit einem Synovialsarkom (n=37) die Expression von PSMA und CD31 in tumorassozierten Gefäßen untersucht und mit den klinisch-pathologischen Daten korreliert werden. Dieses neu erstellte Kollektiv (n=37) war hinsichtlich seiner Altersverteilung (neun - 77 Jahre), der Geschlechterverteilung (21 männliche und 16 weibliche Erkrankte) gemäß einer großangelegten amerikanischen Studie von 1983 bis 2005 als repräsentativ für eine durchschnittliche Patientengruppe des Synovialsarkoms anzusehen.⁷⁵

Zunächst wurde die Mikrogefäßdichte mittels Micro Vessel Density Assessment bei den Synovialsarkomproben gemessen. Anschließend wurden die Ergebnisse mit der PSMA-Expression korreliert. Hierbei konnte eine signifikante Korrelation zwischen zunehmender Gefäßdichte und zunehmender PSMA-Expression in tumorassoziierter Neoangiogenese ermittelt werden. Dieses Ergebnis kann darauf hinweisen, dass die Tumorzellen über eine Art „Crosstalk“ mit Endothelzellen in Verbindung stehen. Möglicherweise sind die Krebszellen also in der Lage, in der Neovaskulatur plastische Veränderung auszulösen. Pinto *et al.*⁷⁶ wiesen schon 1996 nach, dass PSMA eine Folat-Hydrolase-

Aktivität aufweist. Dieser Folat-Hydrolase-Aktivität von PSMA maßen Samplaski *et al.*⁷⁷ und Pinto *et al.*⁷⁶ eine entscheidende Rolle zur Entstehung von Neovaskulatur bei verschiedenen Subtypen des Blasenkarzinoms bei. Die Autoren gehen davon aus, dass PSMA als Mediator fungiert, der dazu anregt, dass Gefäßzellen, welche sich in der Umgebung der Tumorzellen befinden, besser aussprossen und proliferieren können. Dies deckt sich mit der von uns beschriebenen Beobachtung, dass sich bei erhöhter PSMA-Expression eine signifikant erhöhte Mikrogefäßdichte im Micro Vessel Density Assessment nachweisen lässt.

Zusätzlich wurde die immunhistochemische PSMA-Expression in den einzelnen Proben mit verschiedenen Patientendaten und Gewebeparametern wie Alter und Geschlecht des Patienten sowie Größe, Typ des genetischen Breakpoints und Histologie des Tumors in Relation gesetzt. Bei der statistischen Auswertung zeigte sich folgender Trend: größere Tumoren induzierten eher PSMA in der Neovaskulatur als kleinere. Hierfür ursächlich lässt sich vermuten, dass bei den untersuchten größeren Tumoren es sich auch gleichzeitig um Tumoren handeln könnte, die besonders schnell wachsen. Dies hat möglicherweise zur Folge, dass die Tumorzellen sowie die umliegenden und im Tumor lokalisierten Endothelzellen durch die schnelle Tumorphiliferation nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. Folglich werden die Endothelzellen - getriggert durch Hypoxie - dazu angeregt, PSMA zu exprimieren. Dies führt dann zu einer veränderten Gefäßaussprossung. Diesen Zusammenhang, dass Hypoxie zu einer erhöhten PSMA-Expression und folglich zu einer veränderten Gefäßaussprossung Endothelzellen führt, konnten auch Grant *et al.*⁷¹ in ihrem Versuch bei okulärer Gefäßneubildung zeigen. Die Arbeitsgruppe benutzte ein sauerstoff-induziertes Retinopathie-Modell. Hierbei wurde unter hypoxischen Bedingungen zunächst ein Abfall an retinaler PSMA mRNA festgestellt, nach einiger Zeit der relativen Hypoxie jedoch ein steter Anstieg dieser mRNA. Anschließend wurde die Gefäßbildung unter diesem Zustand der relativen Hypoxie in PSMA-Null-Mäusen beobachtet. Diese bildeten normales retinales Gefäßgewebe aus. PSMA-Wildtyp-Mäuse jedoch zeigten eine veränderte

Gefäßaussprossung. Bei ihnen fand vor allem in der retinalen Peripherie ein übermäßiges Wachstum an weniger physiologisch geformten und nicht funktionellen Gefäßen. Es kann daher angenommen werden, dass PSMA in der pathologischen angiogenen Antwort der Endothelzellen eine zentrale Rolle spielt. Der Mangel an PSMA in den PSMA-Null-Mäusen führte gemäß den Untersuchungen nicht zu einer Mangelproduktion an proangiogenen Faktoren (wie beispielsweise VEGF) als Antwort auf die Hypoxie. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass die abgeschwächte pathologische Angiogenese in PSMA-Null-Mäusen Resultat eines endothelzell-intrinsischen VEGF-unabhängigen Defekts ist.

Auch Conway *et al.*⁷² beschreiben PSMA als wichtigen Mediator in der Neoangiogenese. Diese Forschungsgruppe untersuchte Endothelzellen von Wildtyp- bzw. PSMA-Null-Versuchstieren. Dies wurde anhand eines *in vitro* Migrationsassays sowie anhand von *in vivo* Migrationsstudien demonstriert. Hier migrierten die Wildtyp-Endothelzellen signifikant schneller als die PSMA-Null-Gefäßzellen.

Im nächsten Versuchsteil der Dissertation sollten die morphologischen Beobachtungen anhand der von meiner Arbeitsgruppe angenommenen zugrundeliegenden Hypothesen im *in vitro* Modell nachgestellt werden. Ziel war es, einen Zusammenhang zwischen wachstumsfaktor- beziehungsweise hypoxie-stimulierten HUVECs und der daraus resultierenden Expression von PSMA nachzuweisen. Nach Etablierung zweier Zellkulturmodelle wurde versucht, die Interaktion zwischen Tumor- und Endothelzellen in der Zellkultur nachzustellen.

Das erste Zellkulturmodell bezog sich auf die These, dass Tumorzellen an ihre Umgebung Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel VEGF abgeben. Diese induzieren dann in den umliegenden Gefäßzellen PSMA, was zu einer vermehrten Proliferationsfähigkeit der Gefäßzellen führt. Als Tumorzellen dienten zwei verschiedene Synovialsarkom-Zelllinien, welche für drei Tage mit

demselben Medium inkubiert wurden. Nach der langen Inkubationszeit sollten sich Wachstumsfaktoren in dem abgenommenen, tumorkonditionierten Medium (TKM) befinden. Mit diesem Medium erfolgte die HUVEC-Inkubation und anschließend die Untersuchung des Proteinlysates auf PSMA per Western Blot. In keiner der mit den verschiedenen mit TKM inkubierten HUVECs-Zelllinien war jedoch PSMA nachweisbar. Nguyen *et al.*⁴⁶ beschreiben eine Induktion von PSMA in HUVECs unter anderem für die Prostatakarzinomzelllinie PC-3. Wir nutzten auch diese Zelllinie um ein TKM zu erhalten. Aber auch mit dem TKM dieser Zelllinie konnte keine PSMA-Induktion festgestellt werden. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Induktion von PSMA in HUVECs nicht auf einzelne Faktoren, sondern auf ein hochkomplexes Zusammenspiel aus der Kombination von mehreren stimulierenden Faktoren zurückzuführen ist. Nguyen *et al.*⁴⁶ nutzten ein spezielles Matrigel für ihre Inkubation. Die Autoren beschreiben, dass sich hier Endothelzellen zu kleinen Schläuchen (Tubes) formieren können. Möglicherweise sind HUVECs nur in dieser Tube-Formation fähig, durch Wachstumsfaktoren stimuliert zu werden und PSMA zu exprimieren.

Im zweiten Zellkulturmodell der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, HUVECs durch Inkubation unter Hypoxiebedingungen zu einer PSMA-Expression zu stimulieren. Hierfür wurde chemisch ein hypoxischer Zustand durch Zufügen von DMOG zum Medium der Sarkomzellen hergestellt. Dieser Versuch erfolgte aufgrund der Theorie, dass vor allem bei schnell wachsenden Tumoren im menschlichen Körper ein hypoxischer Zustand zu finden ist, da die tumorversorgenden Gefäßzellen nicht mit dem raschen Wachstum des Tumolvolumens „mithalten“ können und der Tumor somit einen Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen hat. Auch mit diesem Versuch ließ sich jedoch kein PSMA nachweisen. Möglicherweise liegt die fehlende Reaktion auch hier daran, dass HUVECs nur in einer Tube-Formation (d.h. in einem speziellen Matrigel-Assay) fähig sind, durch Wachstumsfaktoren stimuliert zu werden und PSMA zu exprimieren.

Auch wenn im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Crosstalk zwischen Endothelzellen und Tumorzellen in Synovialsarkomen nicht weiter aufgeklärt werden konnte, so konnte immunhistochemisch eine PSMA-Expression in der tumorassoziierten Neovaskulatur von 34 % nachgewiesen werden. Diese Beobachtung sowie der Zusammenhang zwischen hohen PSMA-Werten und einer hohen Gefäßdichte lassen möglicherweise auf zukünftige Diagnose- und Therapieoptionen bei Synovialsarkomen schließen.

Bei metastasierten Prostatakarzinomen wird bereits eine Radioligand-Therapie mit (z.B. Lu-177-PSMA-617) als neuartige Therapie für metastasierte Prostata-Karzinome getestet.⁷⁸ Eine solche Therapie scheint nach neuesten Untersuchungen nur geringe Nebenwirkungen zu haben und relativ sicher zu sein. Die Therapie führte in 70 % der Fälle zu einem fallenden PSA-Wert im Sinne einer biochemischen (Partial-)Remission. Guler *et al.*⁷⁹ untersuchten retrospektiv die Effektivität und Toxizität von Ga-68-PSMA-HBED-CC, einer PET-CT-gesteuerten Radiotherapie von oligometastasierten Prostatakarzinomen. Hierbei konnte eine niedrige Rate an Lokalrezidiven, eine niedrige Toxizität und ein gutes progressionsfreies Überleben festgestellt werden. Dies deutet auf eine potentielle zukünftige Behandlungsmöglichkeit eines oligometastasierten Prostatakarzinoms durch die GA-68-PSMA PET-CT gesteuerten Radiotherapie hin. Emmett *et al.*⁶³ betrachten die PSMA-Therapie in einer Metastudie bezüglich Ansprechrate, Toxizität und Sicherheit als zukünftige und nicht mehr wegzudenkende Therapiemethode beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom, sobald weitere kontrolliert randomisierte Studien durchgeführt werden.

Zwei kürzlich durchgeführte Studien evaluierten eine PSMA-Therapie in verschiedenen anderen soliden Tumoren als dem Prostatakarzinom. In einer Phase I Studie untersuchten Milowsky *et al.*⁸⁰, ob die tumor-assoziierte Neovaskulatur mit einem Radionuklid beladenen Antikörper als therapeutisches Ziel anvisiert werden kann. Wenngleich hier die Daten der visualisierenden Bildgebung vielversprechend waren (7/10 Nierenzellkarzinome, 4/4 kolorektale

Karzinome, 3/3 Lungenkarzinome, 1/1 Blasenkarzinom, 3/3 Pankreaskarzinome, 1/1 malignes Melanom zeigten eine Expression), so konnte durch die Behandlung keine objektivierbare Tumorregression nachgewiesen werden. Eine weitere Phase I – Studie evaluierte ein gegen PSMA gerichtetes Docetaxel-gekoppeltes Nanopartikel (BIND-014).⁸¹ In einigen Fällen (z.B. bei einer Patientin mit einem Zervixkarzinom) konnte hier ein Ansprechen auf die Therapie gezeigt werden. Insgesamt wurde BIND-014 gut toleriert und wies eine vorhersehbare und gut zu handhabende Toxizität auf.

Für Sarkome gibt es nach derzeitiger Datenlage noch keine Evaluation einer möglichen PSMA-Therapie. Insgesamt stellt sich die Gruppe der Sarkome bezüglich molekularer Genese, Histologie, Klinik und Therapieansprechen sehr heterogen dar. Dies macht die Behandlung von Sarkomen derzeit immer noch sehr schwer.⁸²

Für Patienten, die am Weichgewebssarkom leiden, stellt die chirurgische Resektion fakultativ in Kombination mit Radiotherapie eine Chance auf Heilung dar, wobei fast die Hälfte rezidivierend erkrankt.⁸³ Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt bei makroskopischer Metastasierung 10 – 20 % und das mittlere Überleben liegt bei 11 Monaten.⁸⁴ Der Nutzen der Behandlung mit Chemotherapeutika ist momentan noch sehr limitiert und führt üblicherweise nicht zur Kuration sondern wird als palliative Behandlung eingesetzt. Außerdem ist der Einsatz von Chemotherapeutika kontrovers und kritisch zu sehen, da in fortgeschrittenen Weichgewebstumoren die Ansprech-Rate nicht von denselben Faktoren bestimmt wird wie die Gesamtüberlebensrate.⁸⁵ Chemotherapeutika der Wahl sind Doxorubicin, wobei auch hier bei fortgeschrittenen Weichgewebstumoren die mittlere Überlebenszeit bei 12,8 Monaten liegt (bei Kombinationstherapie mit Doxorubicin und Ifosfamid ist diese Zeit nicht signifikant erhöht).⁸⁶ Auch die Ansprechrate mit 25 % ist hier sehr gering. Bei Nicht-Ansprechen auf diese Therapie steht als second-line noch die Kombination aus Gemcitabine und Docetaxel zur Verfügung. Bei weiterhin fehlendem Therapieansprechen sind die chemotherapeutischen Behandlungsmöglichkeiten weitgehend ausgeschöpft.

Zusammenfassend stellen die aktuell verfügbaren Therapiemethoden bei Weichgewebssarkom (einschließlich des Synovialsarkoms) weder vielversprechende Chancen auf Ansprechen der Patienten dar, noch zeigen sie sich ausreichend effektiv. Unter diesen Gesichtspunkten erscheint es sinnvoll, mögliche therapeutische Alternativen weiter zu untersuchen.

Auch wenn im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Crosstalk zwischen Endothelzellen und Tumorzellen in Synovialsarkomen nicht weiter aufgeklärt werden konnten, so konnte doch immunhistochemisch eine PSMA-Expression in der tumorassoziierten Neovaskulatur von 34 % der untersuchten Synovialsarkome nachgewiesen werden. Weiterhin ließ sich eine Assoziation zwischen erhöhter PSMA-Expression und hoher Mikrogefäßdichte nachweisen. Dieser Zusammenhang legt nahe, dass Sarkomzellen und Gefäßzellen über eine Art „Crosstalk“ in Verbindung stehen. Potentiell stellt diese Verbindung auch einen Angriffspunkt mittels antianginöser Radioligand-Therapien dar. Grundsätzlich erscheint es daher möglich, dass auch Patienten mit einem Synovialsarkom von einer PSMA-gerichteten Therapie profitieren könnten. So stellen die oben angesprochenen auf PSMA-Antikörpern basierten Diagnose- und Therapieoptionen nach weiterer ausführlicher Testung auf Wirksamkeit, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik sowie Neben- und Wechselwirkungen zukünftig potentielle Methoden in der antiangiogenen Therapie dar.⁶³

5. Literatur

1. Rosa I., Marini M., Guasti D., Ibba-Manneschi L., Manetti M., Morphological evidence of telocytes in human synovium. *Scientific Reports*, 8, 3581 (2018).
2. Zhou Y., Chen D., Qi Y., Liu R., Li S., Zou H., Lan J., Ju X., Jiang J., Liang W., Shen Y., Pang L., Li F., Evaluation of expression of cancer stem cell markers and fusion gene in synovial sarcoma: Insights into histogenesis and pathogenesis. *Oncol. Rep.*, 37, 3351–3360 (2017).
3. Olofson A. M., Linos, K., Primary Intraprostatic Synovial Sarcoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 141, 301–304 (2017).
4. Murphey M. D., Gibson M. S., Jennings B. T., Crespo-Rodríguez A. M., Fanburg-Smith J., Gajewski D. A., Imaging of Synovial Sarcoma with Radiologic-Pathologic Correlation. *RadioGraphics*, 26(5), 1543-1565 (2006).
5. Nielsen T. O., Poulin N. M., Ladanyi M., Synovial Sarcoma: Recent Discoveries as a Roadmap to New Avenues for Therapy. *Cancer Discovery*, 5(2), 124 (2015).
6. Al-Hussaini H., Hogg D., Blackstein M. E., O'Sullivan B., Catton C. N., Chung P. W., Griffin A.M., Hodgson D., Hopyan S., Kandel R., Ferguson P.C., Wunder J.S., Gupta A. A., Clinical Features, Treatment, and Outcome in 102 Adult and Pediatric Patients with Localized High-Grade Synovial Sarcoma. *Sarcoma*, 7 (2011).
7. Wakamatsu T., Naka N., Sasagawa S., Tanaka T., Takenaka S., Araki N., Ueda T., Nishizawa Y., Yoshikawa H., Itoh K. Deflection of vascular endothelial growth factor action by SS18-SSX and composite vascular endothelial growth factor- and chemokine (C-X-C motif) receptor 4-targeted therapy in synovial sarcoma. *Cancer science*, 105(9), 1124-1134 (2014).
8. Brodsky J. T., Burt M. E., Hajdu S. I., Casper E. S., Brennan M. F., Tendosynovial sarcoma. Clinicopathologic features, treatment, and prognosis. *Cancer*, 70(2),

- 484-489 (1992).
9. Folpe, A. Tumors of Miscellaneous Type or Uncertain Lineage. *Tumors of Miscellaneous Type or Uncertain Lineage*, 13 (2010).
 10. Spillane A. J., A'Hern R., Judson I. R., Fisher C., Thomas J. M., Synovial sarcoma: A clinicopathologic, staging, and prognostic assessment. *Journal of Clinical Oncology*, 18(22), 3794-3803 (2000).
 11. Spurrell E. L., Fisher C., Thomas J. M., Judson I. R., Prognostic factors in advanced synovial sarcoma: An analysis of 104 patients treated at the royal marsden hospital. *Annals of Oncology*, 16(3), 437-444 (2005).
 12. Bianchi G., Sambri A., Righi A., Dei Tos A. P., Picci P., Donati D., Histology and grading are important prognostic factors in synovial sarcoma. *European Journal of Surgical Oncology*, 43(9), 1733-1739 (2017).
 13. Ruoslahti E., Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Advances in cancer research*, 76, 1-20 (1999).
 14. Mecham, R. *The Extracellular Matrix: an Overview*, S 166-168, Springer, Heidelberg Dordrecht London New York. (2011)
 15. Giancotti, F. G. Deregulation of cell signaling in cancer. *FEBS Lett.* 588, 2558–2570 (2014).
 16. Lester B. R., McCarthy J. B., Tumor cell adhesion to the extracellular matrix and signal transduction mechanisms implicated in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 11, 31–44 (1992).
 17. Kato H., Tjernberg A., Zhang W., Krutchinsky A. N., An W., Takeuchi T., Ohtsuki Y., Sugano S., de Bruijn D. R., Chait B. T., Roeder R. G., Syt associates with human snf/swi complexes and the c-terminal region of its fusion partner ssx1 targets histones. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 5498-5505 (2002).
 18. Eid J. E., Kung A. L., Scully R., Livingston D. M., P300 interacts with the nuclear proto-oncoprotein syt as part of the active control of cell adhesion. *Cell*, 102(6),

- 839-848 (2000).
19. Liao Z.-W., Zhao L., Cai M.-Y., Xi M., He L.-R., Yu F., Zhou T.-C., Liu M.-Z., P300 promotes migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a nasopharyngeal carcinoma cell line. *Oncology letters*, 13(2), 763-769 (2017).
 20. Bohn K. A., Adkins C. E., Nounou M. I., Lockman P. R., Inhibition of vegf and angiopoietin-2 to reduce brain metastases of breast cancer burden. *Frontiers in pharmacology*, 8, 193-193 (2017).
 21. Ferrara N., Gerber H.-P., LeCouter J., The biology of vegf and its receptors. *Nature Medicine*, 9, 669 (2003).
 22. Cross M. J., Claesson-Welsh L., Fgf and vegf function in angiogenesis: Signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(4), 201-207 (2001).
 23. Adams R. H., Alitalo K., Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 464 (2007).
 24. Folkman J., Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology*, 29(6, Supplement 16), 15-18 (2002).
 25. Hanahan D., Weinberg Robert A., Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674 (2011).
 26. Coultas L., Chawengsaksophak K., Rossant J., Endothelial cells and vegf in vascular development. *Nature*, 438, 937 (2005).
 27. Hashimoto T., Shibasaki F., Hypoxia-inducible factor as an angiogenic master switch. *Frontiers in Pediatrics*, 3(33) (2015).
 28. Fong G.-H., Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis*, 11, 121-140 (2008).
 29. Gao X., Hicks K. C., Neumann P., Patel T. B., Hypoxia inducible factors regulate the transcription of the sprouty2 gene and expression of the sprouty2 protein. *Plos one*, 12(2) (2017).

30. Ziello J. E., Jovin I. S., Huang Y., Hypoxia-inducible factor (hif)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *The Yale journal of biology and medicine*, 80(2), 51-60 (2007).
31. Kosyna Friederike K., Nagel M., Kluxen L., Kraushaar K., Depping R. The importin α/β -specific inhibitor ivermectin affects hif-dependent hypoxia response pathways. *Biological Chemistry*, 396, 1357 (2015).
32. Pe'er J., Shweiki D., Itin A., Hemo I., Gnessin H., Keshet E., Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab. Invest.*, 72, 638–645 (1995).
33. Wang G. L., Semenza, G. L., Molecular basis of hypoxia-induced erythropoietin expression. *Curr. Opin. Hematol.*, 3, 156–162 (1996).
34. Hu J., Discher D. J., Bishopric N. H., Webster K. A., Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 245(3), 894-899 (1998).
35. Israeli R. S., Powell C. T., Fair W. R., Heston W. D. W., Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. *Cancer Research*, 53(2), 227 (1993).
36. Drachenberg D. E., Elgamal A.-A. A., Rowbotham R., Peterson M., Murphy G. P., Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *The Prostate*, 41(2), 127-133 (1999).
37. Kallur K. G., Ramachandra P. G., Rajkumar K., Swamy S. S., Desai I., Rao R. M., Patil S. G., Sridhar P. S., Madhusudhan N., Krishnappa R. S., Bhadrasetty V., Kumara H. M., Santhosh S. D., Ajaikumar B. S., Clinical utility of gallium-68 psma pet/ct scan for prostate cancer. *Indian journal of nuclear medicine*, 32(2), 110-117 (2017).
38. Fitzpatrick C., Lynch O., Marignol L., 68Ga-PSMA-PET/CT Has a Role in

- Detecting Prostate Cancer Lesions in Patients with Recurrent Disease. *Anticancer Res.*, 37 (2017).
39. Rahbar K., Ahmadzadehfar H., Boegemann M., 177lu-psma-617 radioligand therapy in mcrpc: Ready for phase iii trial? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 45(3), 513-514 (2018).
40. Kabasakal L., Toklu T., Yeyin N., Demirci E., Abuqbeith M., Ocak M., Aygün A., Karayel E., Pehlivanoğlu H., Alan Selçuk N., Lu-177-psma-617 prostate-specific membrane antigen inhibitor therapy in patients with castration-resistant prostate cancer: Stability, bio-distribution and dosimetry. *Molecular imaging and radionuclide therapy*, 26(2), 62-68 (2017).
41. Ahmadzadehfar H., Schlolaut S., Fimmers R., Yordanova A., Hirzebruch S., Schlenkhoff C., Gaertner F. C., Awang Z. H., Hauser S., Essler M., Predictors of overall survival in metastatic castration-resistant prostate cancer patients receiving [(177)lu]lu-psma-617 radioligand therapy. *Oncotarget*, 8(61), 103108-103116 (2017).
42. Chang S. S., O'Keefe D. S., Bacich D. J., Reuter V. E., Heston W. D. W., Gaudin P. B., Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. *Clinical Cancer Research*, 5(10), 2674 (1999).
43. Wang H.-l., Wang S.-s., Song W.-h., Pan Y., Yu H.-p., Si T.-g., Liu Y., Cui X.-n., Guo Z., Expression of prostate-specific membrane antigen in lung cancer cells and tumor neovasculature endothelial cells and its clinical significance. *Plos one*, 10(5) (2015).
44. Wernicke A. G., Edgar M. A., Lavi E., Liu H., Salerno P., Bander N. H., Gutin P. H., Prostate-specific membrane antigen as a potential novel vascular target for treatment of glioblastoma multiforme. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(11), 1486-1489 (2011).

45. Chang S. S., Reuter V. E., Heston W. D. W., Bander N. H., Grauer L. S., Gaudin P. B., Five different anti-prostate-specific membrane antigen (psma) antibodies confirm psma expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Research*, 59(13), 3192 (1999).
46. Nguyen D. P., Xiong P. L., Liu H., Pan S., Leconet W., Navarro V., Guo M., Moy J., Kim S., Ramirez-Fort M. K., Batra J. S., Bander N. H., Induction of psma and internalization of an anti-psma mab in the vascular compartment. *Molecular Cancer Research*, 14(11), 1045 (2016).
47. Heitkötter B., Trautmann M., Grünewald I., Bögemann M., Rahbar K., Gevensleben H., Wardelmann E., Hartmann W., Steinestel K., Huss S., Expression of psma in tumor neovasculature of high grade sarcomas including synovial sarcoma, rhabdomyosarcoma, undifferentiated sarcoma and mpnst. *Oncotarget*, 8(3), 4268-4276 (2016).
48. Heitkötter, B. et al. Neovascular PSMA expression is a common feature in malignant neoplasms of the thyroid. *Oncotarget*, 9, 9867-9874 (2018).
49. Stock K., Steinestel K., Wiesch R., Mikesch J.-H., Hansmeier A., Trautmann M., Beller N., Rehkämper J., Wardelmann E., Heitkötter B., Hartmann W., Sperveslage J., Huss S., Neovascular prostate-specific membrane antigen expression is associated with improved overall survival under palliative chemotherapy in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *BioMed Research International*, 2017, 8 (2017).
50. Crowley M. J. P., Scognamiglio T., Liu Y.-F., Kleiman D. A., Beninato T., Aronova A., Liu H., Jhanwar Y. S., Molina A., Tagawa S. T., Bander N. H., Zarnegar R., Elemento O., Fahey I. I. T. J., Prostate-specific membrane antigen is a potential antiangiogenic target in adrenocortical carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(3), 981-987 (2016).
51. Zeng C., Ke Z.-F., Yang Z., Wang Z., Yang S.-C., Luo C.-Q., Wang L.-T., Prostate-

- specific membrane antigen: A new potential prognostic marker of osteosarcoma. *Medical Oncology*, 29(3), 2234-2239 (2012).
52. Wernicke A. G., Varma S., Greenwood E. A., Christos P. J., Chao K. S. C., Liu H., Bander N. H., Shin S. J., Prostate-specific membrane antigen expression in tumor-associated vasculature of breast cancers. *APMIS*, 122(6), 482-489 (2013).
53. Haffner M. C., Laimer J., Chaux A., Schäfer G., Obrist P., Brunner A., Kronberger I. E., Laimer K., Gurel B., Koller J.-B., Seifarth C., Zelger B., Klocker H., Rasse M., Doppler W., Bander N. H., High expression of prostate-specific membrane antigen in the tumor-associated neo-vasculature is associated with worse prognosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Modern Pathology*, 25, 1079 (2012).
54. Abdel-Hadi M., Ismail Y., Younis L., Prostate-specific membrane antigen (psma) immunoexpression in the neovasculature of colorectal carcinoma in egyptian patients. *Pathology - Research and Practice*, 210(11), 759-763, (2014).
55. Spatz S., Tolkach Y., Jung K., Stephan C., Busch J., Ralla B., Rabien A., Feldmann G., Brossart P., Bundschuh R. A., Ahmadzadehfar H., Essler M., Toma M., Müller S. C., Ellinger J., Hauser S., Kristiansen G., Comprehensive evaluation of prostate specific membrane antigen expression in the vasculature of renal tumors: Implications for imaging studies and prognostic role. *The Journal of Urology*, 199(2), 370-377 (2018).
56. Al-Ahmadie H. A., Olgac S., Gregor P. D., Tickoo S. K., Fine S. W., Kondagunta G. V., Scher H. I., Morris M. J., Russo P., Motzer R. J., Reuter V. E., Expression of prostate-specific membrane antigen in renal cortical tumors. *Modern Pathology*, 21, 727 (2008).
57. Denmeade S. R., Mhaka A. M., Rosen D. M., Brennen W. N., Dalrymple S., Dach I., Olesen C., Gurel B., DeMarzo A. M., Wilding G., Carducci M. A., Dionne C. A., Møller J. V., Nissen P., Christensen S. B., Isaacs J. T., Engineering a prostate-specific membrane antigen-activated tumor endothelial cell prodrug for cancer

- therapy. *Science Translational Medicine*, 4(140), 140ra186 (2012).
58. Haffner M. C., Kronberger I. E., Ross J. S., Sheehan C. E., Zitt M., Mühlmann G., Öfner D., Zelger B., Ensinger C., Yang X. J., Geley S., Margreiter R., Bander N. H., Prostate-specific membrane antigen expression in the neovasculature of gastric and colorectal cancers. *Human Pathology*, 40(12), 1754-1761 (2009).
 59. Bychkov A., Vutrapongwatana U., Tepmongkol S., Keelawat S., PsmA expression by microvasculature of thyroid tumors – potential implications for psmA theranostics. *Scientific Reports*, 7(1), 5202 (2017).
 60. Battifora, H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab. Invest.* 55, 244–248 (1986).
 61. Chang, S. S. Overview of prostate-specific membrane antigen. *Rev. Urol.* 6 Suppl 10, S13–8 (2004).
 62. Uprimny C., Kroiss A. S., Decristoforo C., Fritz J., von Guggenberg E., Kendler D., Scarpa L., di Santo G., Roig L. G., Maffey-Steffan J., Horninger W., Virgolini I. J., 68ga-psma-11 pet/ct in primary staging of prostate cancer: Psa and gleason score predict the intensity of tracer accumulation in the primary tumour. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 44(6), 941-949 (2017).
 63. Emmett L., Willowson K., Violet J., Shin J., Blanksby A., Lee J., Lutetium (177) psma radionuclide therapy for men with prostate cancer: A review of the current literature and discussion of practical aspects of therapy. *Journal of medical radiation sciences*, 64(1), 52-60 (2017).
 64. Salas Fragomeni R. A., Menke J. R., Holdhoff M., Ferrigno C., Laterra J. J., Solnes L. B., Javadi M. S., Szabo Z., Pomper M. G., Rowe S. P., Prostate-specific membrane antigen-targeted imaging with [18f]dcfpyl in high-grade gliomas. *Clinical nuclear medicine*, 42(10) (2017).
 65. Wernicke A. G., Edgar M. A., Lavi E., Liu H., Salerno P., Bander N. H., Gutin P. H., Prostate-specific membrane antigen as a potential novel vascular target for

- treatment of glioblastoma multiforme. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(11), 1486-1489 (2011).
66. Ren H., Zhang H., Wang X., Liu J., Yuan Z., Hao J., Prostate-specific membrane antigen as a marker of pancreatic cancer cells. *Medical Oncology*, 31(3), 857 (2014).
67. Chang S. S., O'Keefe D. S., Bacich D. J., Reuter V. E., Heston W. D. W., Gaudin P. B., Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. *Clinical Cancer Research*, 5(10), 2674 (1999).
68. Moore M., Panjwani S., Mathew R., Crowley M., Liu Y.-F., Aronova A., Finnerty B., Zarnegar R., Fahey T. J., Scognamiglio T., Well-differentiated thyroid cancer neovasculature expresses prostate-specific membrane antigen—a possible novel therapeutic target. *Endocrine Pathology*, 28(4), 339-344 (2017).
69. Wernicke A. G., Kim S., Liu H., Bander N. H., Pirog E. C., Prostate-specific membrane antigen (psma) expression in the neovasculature of gynecologic malignancies: Implications for psma-targeted therapy. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 25(4), 271-276 (2017).
70. Wang H.-l., Wang S.-s., Song W.-h., Pan Y., Yu H.-p., Si T.-g., Liu Y., Cui X.-n., Guo Z., Expression of prostate-specific membrane antigen in lung cancer cells and tumor neovasculature endothelial cells and its clinical significance. *Plos one*, 10(5) (2015).
71. Grant C. L., Caromile L. A., Durrani K., Rahman M. M., Claffey K. P., Fong G.-H., Shapiro L. H., Prostate specific membrane antigen (psma) regulates angiogenesis independently of vegf during ocular neovascularization. *Plos one*, 7(7) (2012).
72. Conway R. E., Petrovic N., Li Z., Heston W., Wu D., Shapiro L. H., Prostate-specific membrane antigen regulates angiogenesis by modulating integrin signal transduction. *Molecular and cellular biology*, 26(14), 5310-5324 (2006).

73. Ferrari A., Sultan I., Huang T. T., Rodriguez-Galindo C., Shehadeh A., Meazza C., Ness K. K., Casanova M., Spunt S. L., Soft tissue sarcoma across the age spectrum: A population-based study from the surveillance epidemiology and end results database. *Pediatric blood & cancer*, 57(6), 943-949 (2011).
74. Krieg A. H., Hefti F., Speth B. M., Jundt G., Guillou L., Exner U. G., von Hochstetter A. R., Cserhati M. D., Fuchs B., Mouhsine E., Kaelin A., Klenke F. M., Siebenrock K. A., Synovial sarcomas usually metastasize after >5 years: A multicenter retrospective analysis with minimum follow-up of 10 years for survivors. *Annals of Oncology*, 22(2), 458-467 (2011).
75. Sultan I., Rodriguez-Galindo C., Saab R., Yasir S., Casanova M., Ferrari A., Comparing children and adults with synovial sarcoma in the surveillance, epidemiology, and end results program, 1983 to 2005. *Cancer*, 115(15), 3537-3547 (2009).
76. Pinto J. T., Suffoletto B. P., Berzin T. M., Qiao C. H., Lin S., Tong W. P., May F., Mukherjee B., Heston W. D., Prostate-specific membrane antigen: A novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. *Clinical Cancer Research*, 2(9), 1445 (1996).
77. Samplaski M. K., Heston W., Elson P., Magi-Galluzzi C., Hansel D. E., Folate hydrolase (prostate-specific antigen) 1 expression in bladder cancer subtypes and associated tumor neovasculature. *Modern Pathology*, 24, 1521 (2011).
78. Ahmadzadehfar H., Rahbar K., Kürpig S., Bögemann M., Claesener M., Eppard E., Gärtner F., Rogenhofer S., Schäfers M., Essler M., Early side effects and first results of radioligand therapy with (177)lu-dkfz-617 psma of castrate-resistant metastatic prostate cancer: A two-centre study. *EJNMMI research*, 5(1), 114-114 (2015).
79. Guler, O. C. *et al.* Guler O. C., Engels B., Onal C., Everaert H., Van den Begin R., Gevaert T., de Ridder M., The feasibility of prostate-specific membrane antigen

- positron emission tomography(psm PET/CT)-guided radiotherapy in oligometastatic prostate cancer patients. *Clinical and Translational Oncology*, 20(4), 484-490 (2018).
80. Milowsky M. I., Nanus D. M., Kostakoglu L., Sheehan C. E., Vallabhajosula S., Goldsmith S. J., Ross J. S., Bander N. H., Vascular targeted therapy with anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody j591 in advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 25(5), 540-547 (2007).
 81. Von Hoff D. D., Mita M. M., Ramanathan R. K., Weiss G. J., Mita A. C., LoRusso P. M., Burris H. A., Hart L. L., Low S. C., Parsons D. M., Zale S. E., Summa J. M., Youssoufian H., Sachdev J. C., Phase I study of psma-targeted docetaxel-containing nanoparticle bind-014 in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 22(13), 3157 (2016).
 82. Dancsok A. R., Asleh-Aburaya K., Nielsen T. O., Advances in sarcoma diagnostics and treatment. *Oncotarget*, 8(4), 7068-7093 (2016).
 83. Penel N., Van Glabbeke M., Marreaud S., Ouali M., Blay J. Y., Hohenberger P., Testing new regimens in patients with advanced soft tissue sarcoma: Analysis of publications from the last 10 years. *Annals of Oncology*, 22(6), 1266-1272 (2011).
 84. Steen, S. & Stephenson, G. Current treatment of soft tissue sarcoma. *Proc.*, 21, 392–396 (2008).
 85. Van Glabbeke M., van Oosterom A. T., Oosterhuis J. W., Mouridsen H., Crowther D., Somers R., Verweij J., Santoro A., Buesa J., Tursz T., Prognostic factors for the outcome of chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma: An analysis of 2,185 patients treated with anthracycline-containing first-line regimens—a European organization for research and treatment of cancer soft tissue and bone sarcoma group study. *Journal of Clinical Oncology*, 17(1), 150-150 (1999).
 86. Tap W. D., Papai Z., Van Tine B. A., Attia S., Ganjoo K. N., Jones R. L., Schuetze S., Reed D., Chawla S. P., Riedel R. F., Krarup-Hansen A., Toulmonde M., Ray-

Coquard I., Hohenberger P., Grignani G., Cranmer L. D., Okuno S., Agulnik M., Read W., Ryan C. W., Alcindor T., del Muro X. F. G., Budd G. T., Tawbi H., Pearce T., Kroll S., Reinke D. K., Schöffski P., Doxorubicin plus evofosfamide versus doxorubicin alone in locally advanced, unresectable or metastatic soft-tissue sarcoma (th cr-406/sarc021): An international, multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 18(8), 1089-1103 (2017).

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank allen Personen entgegenbringen, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gebührt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Huss, Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Münster, und Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. Konrad Steinestel, Bundeswehrkrankenhaus Ulm für die Initiierung und die Hilfe bei der Umsetzung meiner Dissertation.

Für die Möglichkeit der Laborbenutzung und Unterstützung bedanke ich mich bei Frau Professor Dr. med. Eva Wardelmann, Direktorin des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie sowie Herrn Professor Dr. med. Wolfgang Hartmann, stellvertretender Leiter des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie.

Außerdem waren mir alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des immunhistochemischen Labors des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie eine große Hilfe, wobei ich hier ganz besonders Katharina Stock und Esther-Pia Jansen erwähnen möchte.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern Erna und Friedhelm dafür, dass sie hinter mir stehen, egal was kommt. Meinem Bruder Moritz danke ich, weil er mir hilft, wo er nur kann, und wirklich immer für mich da ist (du bist der beste Bruder der Welt)! Ryan, vielen Dank für all deine Unterstützung. Thanks for being the way you are.