

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

Facoltà di Medicina e Chirurgia.
Dipartimento di Anatomia Patologica e Citopatologia

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMORFOLOGICHE E FUNZIONALI
(XXII CICLO)**

**Espressione immunoistochimica del
CD 166 (ALCAM) nel Glioblastoma**

Tutor:

Prof. Guido Pettinato

Candidata:

Dott. Stefania Garofalo

INDICE

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1: CELLULE STAMINALI NEL SNC

**CAPITOLO 2 : CD 166 (ALCAM): MARCATORE DI
“CANCER STEM CELL”**

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

3.1 Procedimento per il CD 166 (ALCAM)

CAPITOLO 4 : RISULTATI

CAPITOLO 5 : DISCUSSIONE

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

I gliomi , i più comuni tumori primitivi del Sistema Nervoso Centrale sono classificati considerando l'aspetto istologico e il profilo immunofenotipico espresso.

Il sistema di grading attualmente adottato è lo schema proposto dalla **WHO**(*World Health Organization, 2007*) che si basa fundamentalmente sull'osservazione delle caratteristiche morfologiche.

Esistono numerosi tipi e sottotipi di tumori cerebrali, l'articolato elenco di genotipi neoplastici è la manifestazione di alcune alterazioni nella fisiologia cellulare che risultano essere essenziali nel processo di trasformazione delle cellule normali in cellule maligne, deviazione dello sviluppo cellulare, alterazione della via di segnale dei fattori di crescita, mancato arresto del ciclo cellulare, illimitato potenziale replicativo, sottrazione all'apoptosi, angiogenesi ed invasione.

Il Glioblastoma che rappresenta circa 1/3 di tutti gli astrocitomi, è una neoplasia altamente maligna, può originare come tale “de novo”, oppure essere il risultato di un processo di evoluzione maligna di un astrocitoma fibrillare diffuso. Si può osservare ad ogni età, con netta prevalenza nei soggetti al di sopra dei 50 anni e di sesso maschile. Istologicamente la necrosi , è una delle caratteristiche più importanti presente nelle aree ipercellulari dove cellule anaplastiche si affollano lungo i margini delle zone necrotiche, determinando le cosiddette

“pseudopalizzate”. Ha la peggiore prognosi tra i tumori primitivi dell'encefalo; la media di sopravvivenza dopo trattamento chemio-radioterapico è di 14,6 mesi, mentre pari al 10% è la sopravvivenza a 2 anni. Recenti studi genetici hanno dimostrato che alcuni sottotipi di glioblastoma mostrano differenti alterazioni genetiche.

CAPITOLO 1

CELLULE STAMINALI NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

E' oggi accettato che tumorigenesi ed organogenesi sono simili per molti aspetti, come, per esempio, nell'omeostasi tissutale, governata da una distinta sottopopolazione di cellule staminali in entrambe le situazioni.

Attualmente c'è crescente evidenza che i gliomi possano derivare da “cancer stem cells”, che condividono con le “neural stem cells”, cioè le cellule staminali normali, la capacità di autorinnovamento e di multipotenzialità.(1,2)

Durante la fase precoce di sviluppo embrionale, le neural stem cells si dividono simmetricamente, conservando le loro proprietà ed espandendo la popolazione cellulare. In una seconda fase neurogenica, le cellule staminali vanno incontro a divisioni asimmetriche, dando origine a nuove staminali ed a precursori proliferanti della linea neuronale. E' solo dopo questa fase che si sviluppa una progenie gliale, con il declino progressivo delle staminali, anche se un piccolo gruppo di neural stem cells persiste in regioni specifiche dell' encefalo adulto, come la zona subventricolare dei ventricoli laterali ed il giro dentato dell' ippocampo.(3,4,5,6)

In passato si era ipotizzato che le cellule tumorali nel Sistema Nervoso Centrale derivassero per lo più dalla trasformazione di cellule neurali mature, astrociti, oligodendrociti e precursori neuronali. Recentemente, invece, questa teoria è

stata abbandonata, dal momento che il concetto di cancer stem cell è stato esteso ai tumori cerebrali.

Ad oggi, sono stati proposti due modelli di organizzazione per spiegare la proliferazione neoplastica: il **modello stocastico**, secondo cui le cellule di un tumore hanno potenziale tumorogenico simile, ma attivato asincronamente ed a bassa frequenza, ed il **modello gerarchico**, secondo cui solo un subset di cellule ha significativa capacità proliferativa ed il potere di generare un nuovo tumore simile al primitivo. L'ipotesi gerarchica correla con la teoria delle cellule staminali maligne, ora supportata da dati sempre più numerosi che mostrano come il cancro, così come il tessuto normale, possa essere mantenuto da una organizzazione gerarchica che include cellule staminali, precursori e cellule differenziate. (1,2,7)

La piccola frazione di cellule gliomatose dotate degli aspetti di cellule progenitrici e della funzione di inizio della tumorigenesi, è caratterizzata dalla capacità di formare in vitro neurosfere, la cui tumorigenicità non è influenzata né dall'adesione al substrato, né dalla presenza di fattori di crescita e di medium con siero, tutti fattori che, invece, inducono la differenziazione nelle cellule staminali neurali. (3)

Questa è, fino ad oggi, l'unica differenza riscontrabile tra cellule staminali neurali e cellule staminali gliomatose: in un glioblastoma, infatti, i due cellulari sono fenotipicamente indistinguibili, mostrando la stessa capacità di

autorinnovarsi e di differenziarsi, ed attivando gli stessi pathways coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare e della sopravvivenza.

CAPITOLO 2

CD 166(ALCAM): MARCATORE DI “CANCER STEM CELLS”

Studi recenti hanno valutato l'espressione di vari marcatori di linea cellulare staminale neuronale con lo scopo di dimostrare che:

- 1) i differenti tumori cerebrali contengono precursori neuronali indifferenziati capaci di rispondere ad alcuni mitogeni;
- 2) le cellule tumorali simil-staminali posseggono alcune delle caratteristiche molecolari delle cellule staminali.

Si è osservato, infatti, che le cellule staminali esprimono sia il gene CD133 che quello per il CD 166. Il primo codifica per una glicoproteina transmembrana, presente sia dalle cellule staminali delle tre linee embrionali che in numerosi tumori tra cui il glioblastoma multiforme. Risulta invece down-regolata nelle cellule differenziate.

Il secondo noto anche come ALCAM (Activated leukocyte adhesion molecole) codifica per una glicoproteina transmembrana di tipo 1. E' espressa dalle cellule di tutti e tre i foglietti embrionali, con funzione di regolazione, crescita e migrazione cellulare mentre è poco presente nelle cellule dei tessuti adulti.

E' coinvolta nei processi di adesione cellulare e di ancoraggio al citoscheletro.

(3) Il meccanismo d'azione postulato per tale glicoproteina è quello di sensore di superficie cellulare controllando il passaggio tra la locale proliferazione cellulare e l'invasione tissutale. Il CD166 è un membro di una superfamiglia di immunoglobuline, presenta un caratteristico dominio strutturale della regione

variabile, l'estremità NH₂-terminale che ripiegata, costituisce un modulo captante il ligando, mentre l'estremità C-terminale ripiegata è di membrana. Tali strutture contribuiscono alla formazione dell'alta affinità ed avidità della rete molecolare che promuove i legami cellula-cellula. (8)

Variazioni nell'espressione genica dell'estremità amino-terminale osservate in alcune neoplasie quali il melanoma ed il carcinoma mammario, determinerebbero una over-espressione molecolare di tale frammento (sALCAM), con conseguente inibizione dell'attivazione esercitata su specifiche proteasi chiamate metalloproteinasi-2 (MMP-2).(9)

Quest'ultime sono infatti proteinasi Zn-dipendenti, di matrice, la cui espressione è implicata sia in processi fisiologici coinvolgenti la crescita e la migrazione cellulare, che in quelli neoplastici quali invasione tissutale, metastasi ed angiogenesi.(8).

Esse sono sintetizzate come proenzimi (MMPs) ed attivate da processi proteolitici, con formazione di un complesso ternario intermedio di membrana tipo 1 MMP (MT1-MMP/MMP-14), inibitore tissutale di metalloproteinasi-2 (TIMP-2) e pro-MMP-2 alla superficie cellulare. Alterazione nell'espressione genica dell'ALCAM, determinano, sebbene non siano ancora noti tutti i meccanismi implicati, inibizione dell'attivazione di tali metalloproteinasi con conseguente crescita tumorale. (8,9)

Recenti studi effettuati sia con metodiche immunohistochimiche che con PCR quantitativa, hanno mostrato una variabile alterazione della sua espressione in

alcune neoplasie quali il melanoma, il carcinoma mammario ed il carcinoma del colon-retto.(10,11,12)

Nel melanoma si è osservata una differenza nell'espressione del CD166 tra i melanomi primari e quelli metastatizzanti. Infatti una aumentata espressione di tale recettore è vista in quei melanomi con fase di crescita verticale (Breslow ≥ 1) ed in quelli con fenotipo più aggressivo (metastasi) (7). Pertanto il CD166(ALCAM) avrebbe un ruolo importante nell'invasione cellulare e nella progressione tumorale. Tutto ciò modificherebbe la classica ipotesi secondo la quale il melanoma originerebbe da melanociti maturi e differenziati, sottoposti ad una serie di alterazioni genetiche di geni soppressori ed oncogeni e pertanto si potrebbe ipotizzare l'esistenza di una "cancer stem cell".(7) Nel carcinoma del colon-retto, studi effettuati di correlazione tra il CD166(ALCAM) ed i parametri clinicopatologici hanno mostrato invece che una diversa espressione immunohistochimica (citoplasmatica e di membrana) è correlata con un diverso indice di sopravvivenza del paziente. Infatti una positività citoplasmatica rifletterebbe una condizione fisiologica dell'espressione del CD166(ALCAM), essendo comunque presente nella parte basale delle cripte della normale mucosa colonica e nell'adenoma colonico, invece una intensa positività di membrana sarebbe associata ad una ridotta sopravvivenza del paziente. Tutto ciò supporterebbe l'ipotesi che l'up-regolazione genica del CD166(ALCAM) sia un evento precoce nella trasformazione neoplastica e quindi nella carcinogenesi colonica.(9,10).

Nel carcinoma mammario, studi condotti con metodo della PCR, hanno mostrato invece come ridotti livelli di trascritti di CD166(ALCAM) nel tumore primario siano correlati con il coinvolgimento linfonodale, alto grado di malignità e un più alto stadio di TNM.

Pertanto una ridotta espressione nei livelli di CD166(ALCAM) sarebbe espressione di un fenotipo più aggressivo, di una maggiore incidenza di metastasi scheletriche e quindi di una scarsa prognosi (13,14).

Non esistono sino a tutt'oggi studi che valutano e dimostrano il reale ruolo dell'ALCAM nelle neoplasie maligne del Sistema Nervoso Centrale in particolare nel Glioblastoma.

Oggetto di questo studio è stata quindi, la valutazione del profilo immunohistochimico del CD166, quale marcatore di "cancer stem cell", ciò con lo scopo di poter ipotizzare una origine di tipo staminale e pertanto di considerare la possibilità dell'esistenza di uno specifico immunofenotipo tumorale quale target per una terapia mirata.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

Presso il Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali, Sezione di Anatomia Patologica e Citopatologia dell'Università di Napoli "Federico II" sono stati selezionati 15 *casì di Glioblastoma multiforme* di pazienti operati presso la Clinica Neurochirurgica, con età compresa tra 52 e 75 anni.

Per ogni neoplasia è stata effettuata la valutazione immunohistochimica del CD 166. La tecnica immunohistochimica utilizzata è definita **LSAB** (Labeled Streptavidin-Biotin), in cui l'anticorpo secondario biotinilato riconosce l'anticorpo primario legato all'antigene. L'aggiunta del coniugato (Streptavidina-Perossidasi) sfrutta l'alta affinità della biotina per la streptavidina, per dare una reazione specifica, che, all'aggiunta del substrato diaminobenzidina (DAB), comporterà la colorazione del sito dell'antigene target, rilevabile microscopicamente.

La tecnica immunohistochimica si è avvalsa dei seguenti anticorpi:

- Ab primario **CD166(ALCAM)** "Mouse Monoclonal antibody" (clone MOG/7)

- Ab secondario “**LINK-immunoglobuline anti-mouse e anti-rabbit biotinilate**”.

Come controllo positivo è stata utilizzata una sezione di cute con espressione di CD166, sia citoplasmatica che di membrana rilevabile in corrispondenza degli annessi cutanei ove sono presenti le cellule dello strato germinativo.

3.1 Procedura immunoistochimica per CD166

Tutti i campioni sono stati fissati in formalina neutra tamponata al 10%, successivamente inclusi in paraffina e tagliati al microtomo ad uno spessore di 3-4 μm .

La diagnosi istopatologica è stata formulata su sezioni colorate con Ematossilina- Eosina.

Le rimanenti sezioni sono state montate su vetrini caricati elettrostaticamente superfrost per le indagini di *immunoistochimica*, utilizzando l’anticorpo CD166(ALCAM).

Nel nostro studio si è utilizzata la tecnica definita **LSAB** (Labeled Streptavidin-Biotin), in cui l’anticorpo secondario biotinilato riconosce l’anticorpo primario legato all’antigene.

L’aggiunta del coniugato (Streptavidina-Perossidasi) sfrutta l’alta affinità della biotina per la streptavidina, per dare una reazione specifica che, all’aggiunta del substrato diaminobenzidina (DAB), comporterà la colorazione del sito dell’antigene target, rilevabile microscopicamente.

Il procedimento si articola in diverse fasi:

1. Allestire i vetrini con sezioni di 3-4 μm ottenute tagliando al microtomo campioni inclusi in paraffina. Si utilizzano per far aderire le sezioni in modo più stabile ed evitare così che possa essere persa nelle fasi successive, vetrini caricati elettrostaticamente di tipo superfrost.
2. Lasciare asciugare il vetrino in stufa a 60°C per 24 ore.
3. *Sparaffinare* con passaggi consecutivi in tre cambi di xilolo per 20 minuti, necessari ad eliminare la paraffina ed *idratare* con la serie decrescente degli alcoli (da assoluto al 70%) e poi in acqua distillata per 10 minuti.
4. *Bloccare la per ossidasi endogena*, immergendo il preparato in perossido di idrogeno al 10% (10 minuti), per evitare reazioni aspecifiche e quindi falsi positivi.
5. Effettuare lo *smascheramento antigenico* mediante tre passaggi in soluzione tampone citrato a ph 6.0 della durata di 5 minuti e alla potenza di 650 Watt ciascuno, nel forno a microonde.
6. Lavare in TRIS mediante 1 passaggio della durata di 10 minuti.
7. Asciugare il vetrino sul retro ed intorno alla sezione con successiva *circostrizione* dell'area con *PAP-pen (DAKO)*, per impedire il diffondersi dei reagenti.

8. Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente con anticorpo primario **CD166(ALCAM)** “Mouse Monoclonal antibody”(clone MOG/7) diluito 1/20, tale anticorpo riconosce l’antigene “target” e si lega ad esso.

9. Lavare in TRIS (5 minuti) per eliminare l’eccesso di anticorpo che non ha reagito. Incubare (20 minuti) in camera umida con anticorpo secondario –“*LINK-immunoglobuline anti-mouse e anti-rabbit biotinilate*” che riconosce il frammento cristallizzabile dell’anticorpo primario legandosi ad esso.

10. Lavare in TRIS (10 minuti) per eliminare l’eccesso di anticorpo che non ha reagito

11. Incubare (20 minuti) in camera umida con complesso *Streptavidina-Biotina-Perossidasi*.

Questo passaggio serve per aggiungere nel sito dell’antigene l’enzima che successivamente modificherà la struttura del substrato cromogeno, generando così il segnale rilevabile al microscopio ottico.

12. Lavare in TRIS (10 minuti).

13. Rilevare l’avvenuta reazione mediante l’aggiunta del substrato cromogeno, fase che prevede *l’incubazione con DAB* (diaminobenzidina) in camera umida (10”) monitorando la reazione al microscopio.

Tale procedura è stata effettuata sotto cappa a flusso laminare per evitare esalazioni nocive.

- 14.** Lavare in acqua corrente (10 minuti).
- 15.** Contrastare i nuclei con *Ematossilina di Mayer* (1 minuto).
- 16.** Far virare l'Ematossilina in acqua corrente (10 minuti).
- 17.** *Disidratare* in serie crescente di alcoli (da 70% ad assoluto) e *diafanizzare* in tre cambi di xilene (20 minuti).
- 18.** *Montare* i vetrini con Eukitt e osservare il preparato al microscopio ottico.

CAPITOLO 4

RISULTATI

La reattività per CD166(ALCAM) si è manifestata con colorazione giallo-brunastra citoplasmatica di tipo granulare e di membrana.

La valutazione della colorazione al microscopio ottico viene effettuata selezionando le aree tumorali più intensamente colorate di ogni sezione.

Per la valutazione dell'espressione del CD166(ALCAM), la positività è stata quantitativamente interpretata come focale (<15% di tutte le cellule della lesione) o diffusa (>15% di tutte le cellule della lesione).

L'intensità di colorazione è stata valutata mediante uno score come: assente=0, lieve=1, moderata=2, intensa=3.(15)

Il parametro di riferimento per tale valutazione immunostochimica è stata la cute (controllo interno) ove intensa positività di membrana e citoplasmatica di tipo granulare è stata riscontrata nelle cellule germinali degli annessi cutanei.

In tutti i casi selezionati, è stata riscontrata nell'ambito della popolazione neoplastica, una intensa positività citoplasmatica ed una moderata-intensa positività di membrana nelle cellule di taglia medio-grande definite come cellule pleomorfe, con nuclei bizzarri ed angolati ed ampio citoplasma di aspetto "glassy"; mentre negatività sia di membrana che citoplasmatica è stata riscontrata nelle cellule di piccola taglia, con nucleo ipercromatico e citoplasma scarsamente

rappresentato. Si è osservata inoltre diffusa positività citoplasmatica nel background fibrillare del tumore e positività di membrana nelle cellule dei capillari glomeruloidi della neoplasia.

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE

Il CD166(ALCAM) è una glicoproteina transmembrana di tipo 1, è espressa nelle cellule staminali di tutti e tre i foglietti embrionali, con funzione di regolazione, crescita e migrazione cellulare mentre è poco presente nelle cellule dei tessuti adulti. Il meccanismo d'azione postulato per tale glicoproteina è quello di sensore di superficie cellulare controllando il passaggio tra la locale proliferazione cellulare e l'invasione tissutale. Tale funzione è effettuata grazie all'inibizione esercitata su specifiche proteasi chiamate metalloproteinasi-2 (MMP-2), implicate in processi sia fisiologici coinvolgenti la crescita e migrazione cellulare che in quelli neoplastici quali invasione tissutale, metastasi ed angiogenesi.(8,9)

Lo studio effettuato su tale glicoproteina, è stato ottenuto utilizzando un anticorpo monoclonale.

I risultati hanno evidenziato una variabile espressione immunohistochimica nell'ambito della proliferazione cellulare neoplastica espressione delle differenze citomorfologiche osservate.

Infatti in tutti i casi selezionati si osserva da un punto di vista istologico sia la presenza di cellule di taglia medio-grande, pleomorfe, con nuclei ipercromatici, talora multipli o multilobati e con ampio citoplasma di aspetto “ glassy” e focale arrangiamento perivascolare, sia cellule di piccola taglia con scarso citoplasma ed alone chiaro perinucleare .

Le prime hanno mostrato da un punto di vista immunofenotipico intensa

positività citoplasmatica di tipo granulare e lieve-moderata positività di membrana per CD166(ALCAM).

La presenza di una ridotta espressione del CD166(ALCAM) score 1, osservata in tre dei quindici casi studiati potrebbe essere spiegata come una delocalizzazione dalla membrana cellulare al citoplasma di tale proteina e quindi interpretabile come una probabile espressione alla progressione tumorale e pertanto associata ad una diversa prognosi.

Le seconde invece hanno mostrato negatività sia citoplasmatica che di membrana. Ciò rafforza l'ipotesi che quest'ultima frazione cellulare presente nell'ambito della popolazione cellulare del glioblastoma rappresenti una componente più differenziata e pertanto non esprime positività per il CD166(ALCAM).

Invece la frazione di cellule di taglia medio-grande e con citoplasma di aspetto “glassy” rappresenterebbe quella meno differenziata e pertanto immunofenotipicamente positiva al CD166(ALCAM).

Tali dati supporterebbero l'ipotesi di Farin relativa alla esistenza di “cancer stem cells”, che “neural stem cells”.(1,2)

Infatti entrambi i tipi cellulari mostrano la stessa capacità di autorinnovarsi e di differenziarsi, attivando gli stessi pathways coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare e della sopravvivenza.

L'unica differenza si è osservata in vitro ove la piccola frazione di cellule gliomatose dotate degli aspetti di cellule progenitrici e della funzione di inizio della

tumorogenesi, ha la capacità di formare in vitro neurosfere, la cui tumorigenicità non è influenzata né dall'adesione al substrato, né dalla presenza di fattori di crescita e di medium con siero, tutti fattori che, invece, inducono la differenziazione nelle staminali neurali.(1)

Si rafforzerebbe pertanto l'ipotesi del **modello gerarchico**, secondo la quale il cancro, così come il tessuto normale, possa essere mantenuto da una organizzazione gerarchica che include cellule staminali, precursori e cellule differenziate.(1,2,7)

Oggetto di questo studio è stato quindi dimostrare come sia possibile distinguere nell'ambito della popolazione neoplastica del glioblastoma, sottotipi cellulari esprimenti un diverso profilo immunohistochimico.

Cellule tumorali nervose con positività per il CD166(ALCAM) che potrebbero essere considerate di origine staminale e cellule neoplastiche CD166(ALCAM) negative interpretate quali cellule neoplastiche più differenziate.

Le implicazioni pratiche di tutto ciò sarebbero quelle di considerare la positività di membrana al CD166(ALCAM) come un fattore biologicamente rilevante e di significato prognostico sfavorevole da un punto di vista clinico e patologico nell'evoluzione della neoplasia.

Tuttavia, anche la sola colorazione citoplasmatica potrebbe esprimere una diversa fase di sviluppo della popolazione cellulare neoplastica.

Tali studi necessitano tuttavia di ulteriori approfondimenti e conferme, prima di poter considerare il CD166(ALCAM) quale nuovo marker prognostico per

la sopravvivenza dei pazienti affetti da glioblastoma e di target per nuovi approcci terapeutici.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Farin A, Liu CY, Elder JB, Langmoen IA, Apuzzo MLJ:** The Biological Restoration of Central Nervous System Architecture and Function: Part-1 Foundations and Historical Landmark in Contemporary Stem Cell Biology. *Neurosurgery* **64:15-39, 2009**
- 2. Vescovi A.L., Galli R. Reynold B.A** Brain tumor stem cells *Nature Reviews Cancer* **6**, 425-436 (June 2006).
- 3. Singh, S.K, Clarke I.D., Terasaki M, Bonn V.E., Hawkins C, Squire J, Dirks P.B.** Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors *Cancer Research* **63**, 5821-5828, September 15(2003) 2003.
- 4. Sanai N et al.** Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* **427**, 740-744 (2004)
- 5. Sanai N, Alvarez-Buylla, A. & Berger,** Neural stem cells and the origin of gliomas. *N.Engl.J.Med.* **353**, 811-822(2005)
- 6. Quinones-Hinojosa, A et al.** Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: A niche of neuronal stem cells. *J.Comp.Neurol.* **494**, 415-434 (2006)
- 7. Reya T., Morrison S.J., Clarke, M.F & Weissman I.** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111(2001)
- 8. Lunter P C, van Kilsdonk J W J, van Beeh H, Cornelissen I M.H.A., Bergers M, Willems P H.G.M., van Muijen G N.P., Swart G W.M.**

Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a Novel Actor in Invasive Growth, Controls Matrix Metalloproteinase Activity..*Cancer Res* 2005; **65**(19), October 1 (2005)

9. van Kilsdonk J.W.J, Wilting R H, Bergers M, van Muijen G N.P., Schalkwijk J, van Kempen L C.L.T., Swart G W.M. Attenuation of Melanoma Invasion by Secreted Variant of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule. *Cancer Res*2008; **68** (10), May 15, (2008)

10. Klein W,M, Wu B.P., Zhao Shuping, Wu H, Klein-Szanto A JP, ahan S,R. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma *Modern Pathology* **20**,102-107 (2007)

11. Weichert W, Knosel T, Bellach J, Dietel M, and Kristiansen G . ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol.* **57**(11): 1160-1164 (November 2004)

12. Horst d, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung . A Prognostic Significance of the Cancer Stem Cell Marker CD133, CD44, and CD166 in Colorectal Cancer. *Cancer Investigation* **27**: 8, 844-850 (2009)

13. Ihnen M, Muller V, Wirtz RM, Schroder C, Krenkel S, Witzel I, Lisboa BW, Janicke F, Milde-Langosch K. Predictive impact of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **112**(3): 419-427 (Dec 2008).

14. Davies S.R, Dent C, Watkins G, King JA, Mokbel K and Jiang W.

Expression of the cell adhesion molecule, ALCAM, in breast cancer patients and the potential link with skeletal metastasis. *Oncology Reports* **19**:555-561(2008).

15. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissman C, Kaiser S, Bruemmendorf T, Roepeke S, Dahl E, Hinzmann H, Specht T, Pervan J, Stephan C,

Loening S, Dietel M, Rosenthal A. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patients survival. *J.Pathol* **205c**:359-376(2005)